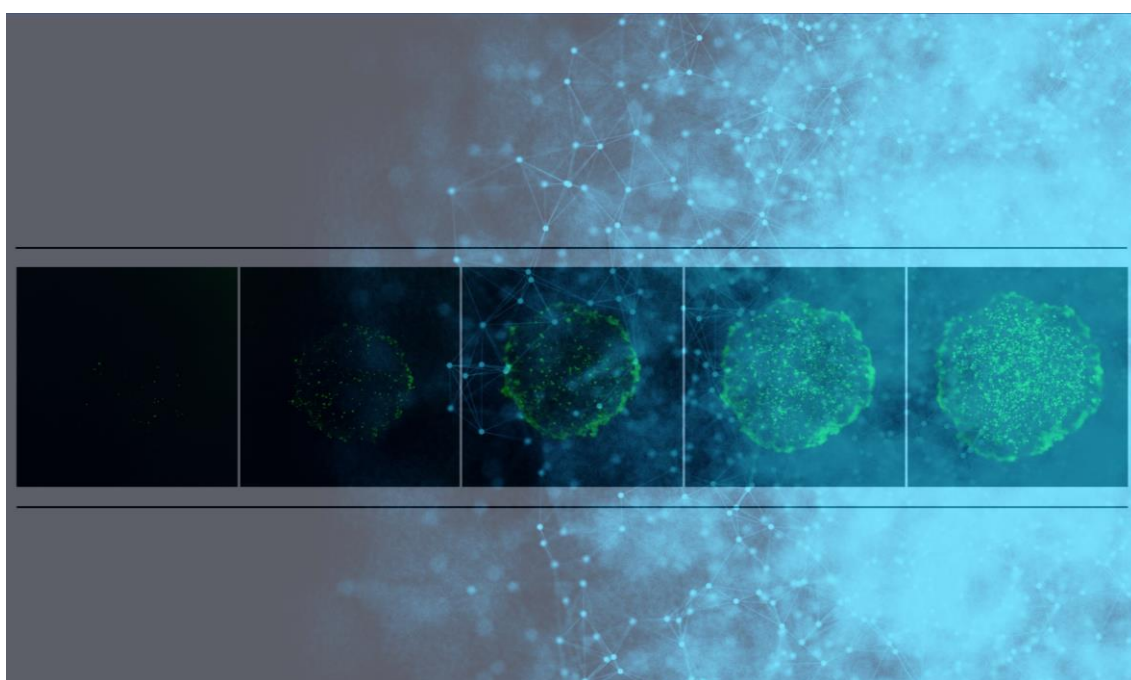


UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



Descubrimiento y evaluación preclínica de  
nuevas entidades químicas bio-inspiradas  
con actividad antitumoral en neoplasias  
hematológicas



---

Tesis Doctoral

Haidée Magdalena Aranda Tavío

---

Programa de doctorado

Investigación Aplicada a las Ciencias Sanitarias

Departamento de Ciencias Clínicas

Las Palmas de Gran Canaria, 2022



## AGRADECIMIENTOS

Tengo que comenzar este apartado confesando que va a ser imposible reunir en unos folios a todas las personas que me han ayudado directa o indirectamente a realizar la tesis doctoral. Han pasado varios años que acumulan todo tipo de experiencias que, indudablemente, se acompañan de muchas enseñanzas. Por ello quiero agradecer:

En primer lugar, a Ángeles Martín Requero y su equipo (en especial a Ana), por enseñarme los “primeros pasos en el laboratorio” y el manejo del cultivo celular. También por dejarme aquellas guías de ocio de Madrid, son detalles que recuerdo muy bien.

A Teresa Acosta por abrirme la puerta en su laboratorio, aunque fuera por un corto periodo de tiempo, me parece una profesora e investigadora excepcional. Por pasarme aquella oferta de trabajo que se convirtió en mi primera experiencia laboral en la investigación y, poco más tarde, en la oportunidad de realizar la tesis.

A mis directores de tesis, Leandro Fernández, Borja Guerra y Carlota Recio, porque son parte fundamental de este trabajo. Gracias por enseñarme cada uno su propio método, creo que la cooperación que hemos tenido ha dado un buen resultado. Quiero destacar la gran dedicación que tienen por su trabajo, y espero que sigan disfrutando de lo que hacen cada día.

Al grupo de la Dra. Ana Estévez en el IUBO, por su colaboración y su participación en este trabajo. Gracias a Pedro y a Priscila por su cercanía y su compañerismo.

Agradezco a la ULPGC los dos primeros contratos laborales que me permitieron acceder a la investigación, el primero de técnico de investigación competitivo (dentro de Garantía Juvenil) y el segundo de investigadora predoctoral. También por concederme la oportunidad de realizar una estancia predoctoral de tres meses en Oxford con la ayuda Erasmus+Prácticas (SMT).

To David Greaves and Gareth Purvis, thank you the confidence you placed in me from the first minute. I would never have imagined that I could learn so much in three months. To the Oxford team, I loved all the time we shared together inside and outside the lab, maybe in some Oxford pubs. I have to thank Lynda for being a friend during this experience and for sharing such amazing moments with me. A Alicia, Rafa y Seb, por ser esa otra parte tan importante de la estancia.

Sin duda alguna, a mis compañeras/os del laboratorio con los que he recorrido este camino. Me siento muy afortunada por haber encontrado a personas tan excepcionales con las que ha merecido la pena compartir cada día. Por nombrar a algunas, empiezo con Patri, por enseñarme todo con tu paciencia y tu humildad, eres un modelo a seguir. A Laura por ser mi medio hermana los primeros años y continuar ahí. A Anita por tu alegría contagiosa y nuestras charlas. A Yera por tu cercanía, tus consejos, y tu ayuda desde el primer momento. A Migue, no puedo explicar todo lo que hemos compartido, sin ti nada hubiera sido igual y me has impulsado a seguir adelante cada día. A Car, te mereces doble agradecimiento porque en la faceta más cercana también me has ayudado infinitamente, por hablar conmigo de ciencia y de la vida. A Joaquín, por tus bromas macabras y tu magnífico humor, espero que hagamos más planes juntos y que alguno sea ¡al fin bucear! A Mercedes, recuerdo muchas de nuestras conversaciones que, con el tiempo, tomaron un gran sentido para mí, gracias. A Elena, Marian, Ester y Henoc, me ha encantado encontrarnos en este proceso, gracias por tantos momentos compartiendo risas y anécdotas, en definitiva, por ser más que compis, espero que lo hagamos muchos años más. A Silvia y a Tina, gracias por compartir su experiencia, las admiro mucho. A Ana R. no olvidaré Irlanda contigo. A Santi y Andrea, me encantó compartir tanto tiempo con ustedes mientras nos formábamos. Hay muchísimas personas que se me quedan en el tintero, pero que me han acompañado desde el CULP hasta el IUIBs (Rosa, Rober, Dácil, Merci, Laura, Cristina, Estrella, Carmen...). Me han enseñado mucho, gracias por todo.

A mis amigas de siempre, por apoyarme y celebrar pequeñas victorias conmigo, haciéndolas muy grandes. A mi gente de Biología, con los que comparto momentos maravillosos y que me inspiran tanto. A mi familia de López Botas, no saben lo importante que han sido para que mantuviera el rumbo. En un apartadito que se abre, a Sara, Isa y Asier por no desistir e intentar sacarme de casa al asadero que nunca llegaba. A Clarou, Nati y Jani, por estar siempre.

Por supuesto, a mi familia, a toda ella. A mis abuelas, mujeres que tanto me han enseñado y que conservo en mis recuerdos. A mi yayo, a tus 99 años aún bromeamos como en los primeros años. A mi hermano, a mi madre y a mi padre. No hay palabras para quienes han estado ahí apoyándome desde el principio, cada día y cada momento, solo eterno agradecimiento y mucho amor.

Por último, a Gabri, por la maravillosa coincidencia de encontrarnos, gracias por compartir tanto conmigo.

## RESUMEN

Las neoplasias hematológicas (NH) constituyen la segunda causa de muerte por tumores malignos en Europa. Aunque los avances terapéuticos han mejorado la calidad de vida de los pacientes, aún existen importantes limitaciones como son los altos costes económicos, la toxicidad a largo plazo o la aparición de resistencia a los tratamientos. Este es el caso del imatinib, el tratamiento de primera línea para la leucemia mieloide crónica (LMC).

El objetivo de esta tesis es el descubrimiento y evaluación preclínica de nuevas entidades de pequeño tamaño molecular con mecanismos de acción alternativos o complementarios a la terapia convencional utilizada en las NH. Para ello, se realizó un cribado de cuatro quimiotecas, basado en cambios fenotípicos en líneas celulares de NH. Así, se seleccionó la quimioteca de análogos del híbrido naftoquinona-cumarina por su interesante relación estructura-actividad. Los estudios predictivos *in silico* de los procesos ADME y de las interacciones moleculares (*docking*) permitieron la selección del híbrido naftoquinona-pirona JKST6, por las siguientes propiedades: 1) características fisicoquímicas y de biodisponibilidad favorables para su desarrollo y 2) valores de *docking* óptimos con BCR-ABL1 y JAK2, dos dianas moleculares implicadas en la carcinogénesis de las NH.

El compuesto JKST6 posee elevada potencia y selectividad frente a células de LMC, caracterizadas por la actividad oncogénica de BCR-ABL1 y STAT5. En este modelo, el compuesto reduce la viabilidad y la proliferación de las células leucémicas, debido en parte a la parada del ciclo celular. El JKST6 provoca dos eventos muy tempranos: un incremento en la poliubiquitinación de proteínas y una respuesta celular al daño genómico que, probablemente, contribuyen a la activación de la apoptosis por vía extrínseca e intrínseca. La base molecular que sustenta los efectos anti-LMC del JKST6 es la inhibición de la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5/ (PIM1, c-MYC), esencial en la supervivencia de estas células. Dicho efecto anti-LMC se asocia con una reducción rápida del nivel proteico de BCR-ABL1. Desde el punto de vista clínico, cabe destacar que el JKST6 potencia la eficacia anti-LMC del imatinib, incluyendo la inhibición de STAT5. En células resistentes a imatinib, el JKST6 mantiene su eficacia antitumoral y, además, restaura la sensibilidad al imatinib en aquellas células cuyo mecanismo de resistencia principal es la sobreexpresión de BCR-ABL1.

En resumen, esta tesis demuestra que el cribado fenotípico e *in silico* de quimiotecas ricas en naftoquinonas representa una estrategia muy eficaz para identificar nuevos moduladores multiquinasa alternativos o complementarios a los inhibidores específicos de BCR-ABL1, con alto potencial para pacientes cuya resistencia al imatinib se debe a la sobreexpresión de BCR-ABL1.

## SUMMARY

Hematological Neoplasms (HN) are the second leading cause of death from malignant tumors in Europe. Despite therapeutic advances have improved the quality of life of patients, there are still important limitations such as high economic costs, long-term toxicity, or emergence of resistance to these treatments. This is the case of imatinib, the first line treatment for chronic myeloid leukemia (CML).

The aim of this thesis is the discovery and preclinical development of new entities with alternative or complementary mechanisms of action to the conventional medication used in HN therapies. To this end, a phenotypic screening of four chemical libraries in human HN cells was performed. In this screening, the naphthoquinone-coumarin hybrid analogues were selected due to their interesting structure-activity relationship. The predictive *in silico* studies of ADME processes and molecular docking allowed the selection of the naphthoquinone-pyrone hybrid (JKST6) with the following properties: 1) advantageous physicochemical and bioavailability properties for its development and 2) optimal docking values with BCR-ABL1 and JAK2, two molecular targets involved in HN carcinogenesis.

The JKST6 compound owns high potency and selectivity against CML cells, characterized by the oncogenic activity of BCR-ABL1 and STAT5. In this model, the compound reduces cell viability and proliferation, due in part to the induction of cell cycle arrest. The JKST6 provokes two early events: an increase of polyubiquitinated proteins and a cell response to genomic damage that may contribute to the activation of extrinsic and intrinsic apoptosis. The molecular basis for the anti-CML effects of JKST6 is the inhibition of the BCR-ABL1/STAT5/(PIM1, c-MYC) signaling pathway, which is essential for the survival of these cells. This anti-CML effect is associated with BCR-ABL1 rapid protein depletion. Clinically relevant, it is worth noting that the JKST6 potentiates the anti-CML efficacy of imatinib, including STAT5 inhibition. In imatinib-resistant cells, JKST6 maintains the anti-tumor efficacy and, in addition, restores sensitivity to imatinib in cells whose primary mechanism of resistance is overexpression of BCR-ABL1.

In summary, this thesis demonstrates that phenotypic and *in silico* screening of naphthoquinone-rich chemical libraries represents a highly effective strategy to identify novel alternative or complementary multikinase modulators to specific BCR-ABL1

inhibitors, with high potential for patients whose resistance to imatinib is due to BCR-ABL1 overexpression.



## ABREVIATURAS

En algunos casos se ha utilizado la abreviatura en inglés por su amplia utilización en el lenguaje científico o por su aparición en las figuras.

|            |   |
|------------|---|
| ACAs       | Aberraciones cromosómicas adicionales                                       |
| ADME       | Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción                            |
| AP         | Fase acelerada  |
| ARG        | Abelson-related gene  |
| ASH        | Sociedad Americana de Hematología   |
| ATP        | Adenosín trifosfato   |
| AUC        | Area Under the Curve/ Área bajo la curva                                    |
| BAD        | Bcl-2-associated agonist of cell death                                      |
| BCL-2      | B cell lymphoma-2   |
| BCR-ABL1   | Breakpoint cluster region- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 |
| BIOS       | Biology-Oriented Synthesis/ Síntesis Orientada Biológicamente               |
| B-LLA      | Leucemia Linfoide Aguda tipo B  |
| BP         | Fase blástica   |
| CAR-T cell | Chimeric Antigen Receptor T cell  |
| CC         | Coiled-coil   |
| CCR        | Complete cytogenetic response/ Remisión citogenética completa               |
| CDK        | Quinasa dependiente de ciclina  |
| CI         | Combination Index/ Índice de Combinación                                    |
| CM         | Conditioned Media/ Medio Condicionado                                       |
| CP         | Fase crónica  |
| Ct         | Cycle Threshold   |
| DMA        | Dimetilacetamida  |
| DMSO       | Dimetilsulfóxido  |
| DOS        | Diversity-Oriented Synthesis/ Síntesis Orientada a la Diversidad            |
| DOXO       | Doxorrubicina   |
| ELN        | European LeukemiaNet  |
| EMA        | Agencia Europea del Medicamento   |

|                     |   |
|---------------------|---|
| ERK1/2              | Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2  |
| FDA                 | Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos  |
| FISH                | Fluorescence <i>in situ</i> hybridization   |
| FLT3 <sup>ITD</sup> | Fms-like tyrosine kinase-3 internal tandem duplications   |
| GAB2                | GRB2-associated binding protein 2   |
| GAP                 | Proteína activadora de GTPasa   |
| GFP                 | Green Fluorescent Protein   |
| GH                  | Growth Hormone/ Hormona de crecimiento  |
| GM-CSF              | Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor/ Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos |
| GRB2                | Growth factor receptor-bound protein 2  |
| 2/3GTKI             | Second/Third Generation Tyrosine Kinase   |
| HCK                 | Hematopoietic cell kinase   |
| HIF                 | Hypoxia induced factors/ Factores inducidos por hipoxia   |
| HSCs                | Hematopoietic stem cells/ Células madre hematopoyéticas   |
| HLA                 | Human leukocyte antigens  |
| hOCT1               | Human organic cation transporter 1  |
| HTS                 | High-throughput screening/ Cribado de alto rendimiento  |
| IFN                 | Interferón  |
| IL                  | Interleucina  |
| Ile                 | Isoleucina  |
| IM                  | Imatinib  |
| iRNA                | interference RNA/ARN interferente   |
| JAK                 | Janus Kinase  |
| JNK                 | c-Jun N-terminal kinase   |
| KD                  | Dominio quinasa   |
| LLA                 | Leucemia linfoide aguda   |
| LMA                 | Leucemia mieloide aguda   |
| LMC                 | Leucemia mieloide crónica   |
| LMMC                | Leucemia mielomonocítica crónica  |
| LNC                 | Leucemia neutrofílica crónica   |
| LPS                 | Lipopolisacárido  |
| LSCs                | Leukemic Stem Cells/ Células madre leucémicas   |
| MAPK                | Mitogen-activated protein kinases   |

|          |  |
|----------|--|
| MC       | Metilcelulosa  |
| MM       | Mieloma múltiple   |
| MPD      | Enfermedad mieloproliferativa  |
| MPNs     | Neoplasias mieloproliferativas clásicas  |
| MSCs     | Células mesenquimales del estroma  |
| mTOR     | Mammalian target of rapamycin  |
| MTT      | Tetrazolium salt 3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide          |
| MYC      | V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog                                  |
| M-bcr    | Major breakpoint cluster region  |
| m-bcr    | Minor breakpoint cluster region  |
| μ-bcr    | Micro breakpoint cluster region  |
| NaPyr    | Sodio Piruvato   |
| NIH/ NCI | National Cancer Institute/ Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU                   |
| NH       | Neoplasias hematológicas   |
| NK       | Célula Natural Killer  |
| NME      | New Molecular Entities/ Nuevas entidades moleculares                                 |
| NO       | Nitric oxide/ Óxido Nítrico  |
| OMS      | Organización Mundial de la Salud   |
| PARP     | Poly (ADP-ribose) polymerase   |
| PBMCs    | Peripheral Blood Mononuclear Cells/ Células mononucleares de sangre periférica       |
| PBS      | Phosphate buffered saline/ Tampón fosfato salino                                     |
| PDB      | Protein Data Bank  |
| PDD      | Phenotypic-Based Drug Discovery/ Descubrimiento de fármacos basado en el fenotipo    |
| PDGFR    | Platelet Derived Growth Factor Receptor/ Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| p-DOS    | Privileged Substructure-based Diversity Oriented Synthesis                           |
| PEG400   | Polietilenglicol 400   |
| PEST     | Penicilina/Estreptomicina  |
| Ph       | Philadelphia (chromosome)/ Filadelfia (cromosoma)                                    |
| PI       | Propidium Iodide/ Yoduro de propidio   |
| PI3K     | Fosfatidilinositol 3-quinasa   |

|       |  |
|-------|--|
| PIP3  | Fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato                                     |
| PML   | Promyelocytic leukemia protein   |
| PN    | Productos naturales  |
| PV    | Policitemia vera   |
| RAS   | Rat Sarcoma Virus  |
| RLU   | Relative Luciferase Units  |
| ROS   | Especies reactivas de oxígeno  |
| SEER  | Surveillance, Epidemiology, and End Results                                |
| SH    | Dominio homólogo de Src  |
| SHP2  | (SH2)-containing protein tyrosine phosphatase 2                            |
| S6K   | Quinasa de S6  |
| SOCS  | Suppressor of cytokine signaling   |
| Src   | Src Proto-Oncogene   |
| STAT  | Signal transducer and activator of transcription                           |
| TBS-T | Tris-buffered saline-Tween   |
| TDD   | Target-based Drug Discovery/ Descubrimiento de fármacos basado en la diana |
| Thr   | Treonina   |
| TKI/s | Inhibidor/es de tirosina quinasa   |
| TME   | Microambiente tumoral  |
| v-ABL | Abelson murine leukemia virus oncogene                                     |
| VEH   | Vehículo   |

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 7  |
| <b>1. Neoplasias hematológicas</b> .....                              | 9  |
| 1.1. Breve descripción y clasificación .....                          | 9  |
| 1.2. Epidemiología.....   | 11 |
| 1.3. Diagnóstico .....  | 12 |
| 1.4. Avances en investigación básica y aplicaciones clínicas.....     | 12 |
| 1.5. Neoplasias BCR-ABL1 positivas .....                              | 17 |
| 1.5.1. Leucemia mieloide crónica .....                                | 17 |
| 1.5.1.1. Breve descripción y progresión clínica .....                 | 17 |
| 1.5.1.2. Biología molecular de la LMC .....                           | 19 |
| 1.5.1.3. Características citogenéticas y diagnóstico molecular .....  | 24 |
| <b>2. BCR-ABL1 y modulación de la señalización intracelular</b> ..... | 26 |
| 2.1. Vía de señalización de MAPK.....                                 | 27 |
| 2.2. Vía de señalización de JAK/STAT.....                             | 29 |
| 2.3. Vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR .....                       | 34 |
| <b>3. Terapia contra la LMC</b> .....                                 | 35 |
| 3.1. Evolución.....   | 35 |
| 3.2. Situación actual y limitaciones .....                            | 38 |
| <b>4. Resistencia a los TKIs</b> .....                                | 42 |
| 4.1. Mecanismos de resistencia intrínsecos de células de LMC.....     | 43 |
| 4.1.1. Mecanismos dependientes de BCR-ABL1 .....                      | 43 |
| 4.1.1.1. Sobreexpresión de BCR-ABL1.....                              | 43 |
| 4.1.1.2. Mutaciones en BCR-ABL1 .....                                 | 44 |
| 4.1.2. Mecanismos independientes de BCR-ABL1 .....                    | 45 |

|   |               |
|---|---------------|
| 4.1.2.1. Absorción intracelular del IM .....  | 46            |
| 4.1.2.2. Sobreexpresión de las quinasas de la familia Src.....  | 46            |
| 4.1.2.3. Evolución clonal.....  | 48            |
| 4.1.2.4. Células madre leucémicas .....   | 49            |
| 4.2. Mecanismos de resistencia extrínsecos de células de LMC .....  | 50            |
| 4.2.1. Células Mesenquimales del estroma .....  | 51            |
| 4.2.2. Factores solubles .....  | 51            |
| 4.3. Papel de STAT5 y STAT3 en la resistencia a TKI.....  | 52            |
| <b>5. Desarrollo de nuevos fármacos.....</b>  | <b>53</b>     |
| 5.1. Evolución .....  | 53            |
| 5.2. Etapas del descubrimiento de fármacos.....   | 58            |
| 5.3. Estrategias de cribado de quimiotecas de compuestos naturales.....                                       | 61            |
| 5.4. Estrategias de síntesis de compuestos.....   | 61            |
| 5.5. Productos naturales como fuente de compuestos con actividad<br>antitumoral .....                         | 63            |
| 5.5.1. Naftoquinonas y sus derivados e híbridos .....   | 64            |
| <br><b>II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....</b>  | <br><b>67</b> |
| <br><b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>  | <br><b>71</b> |
| <b>1. Modelos celulares.....</b>  | <b>73</b>     |
| 1.1. Líneas celulares empleadas en el cribado de series químicas.....   | 73            |
| 1.2. Líneas celulares empleadas en el estudio de la actividad antitumoral<br>del compuesto seleccionado ..... | 73            |
| 1.3. Células empleadas para estudios de toxicidad <i>in vitro</i> .....                                       | 74            |
| 1.3.1 Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre<br>periférica .....                            | 75            |

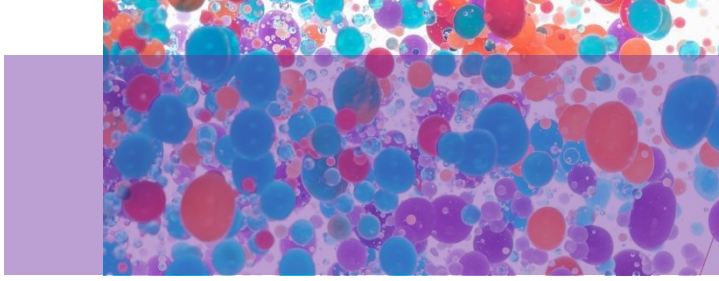
|   |           |
|---|-----------|
| 1.4. Líneas celulares empleadas en el estudio de la actividad transcripcional dependiente de STATs .....                          | 76        |
| 1.5. Línea celular empleada en el estudio de sinergia e influencia del nicho tumoral .....  | 77        |
| 1.6. Líneas celulares utilizadas en el estudio de resistencia a IM.....   | 77        |
| <b>2. Series químicas investigadas.....</b>   | <b>78</b> |
| 2.1. Complejos metálicos con chalconas y lapachol.....  | 78        |
| 2.2. Espirodímeros .....  | 80        |
| 2.3. Derivados de Embelina fusionados a núcleos tipo pirazol o acridina .....   | 83        |
| 2.4. Análogos del híbrido naftoquinona-cumarina .....   | 86        |
| 2.4.1. Compuesto químico con actividad farmacológica seleccionado: JKST6.....   | 88        |
| <b>3. Fármacos .....</b>  | <b>89</b> |
| <b>4. Modelado molecular: determinación del “<i>docking score</i>” .....</b>  | <b>90</b> |
| <b>5. Cribado de las series químicas .....</b>  | <b>91</b> |
| <b>6. Estudios de viabilidad celular.....</b>   | <b>94</b> |
| 6.1. Estudios de metabolización mitocondrial de sales de tetrazolio.....  | 94        |
| 6.1.1. Ensayos de <i>wash-out</i> .....   | 95        |
| 6.2. Ensayo de viabilidad celular por exclusión con azul tripán .....   | 95        |
| <b>7. Estudios de fotomicroscopía a tiempo real.....</b>  | <b>96</b> |
| 7.1. Cultivos celulares en dos dimensiones (2D).....  | 96        |
| 7.2. Cultivos celulares en tres dimensiones (3D) .....  | 96        |
| <b>8. Ensayos de medición de actividad transcripcional de STATs mediante líneas celulares <i>reporter</i> de luciferasa .....</b> | <b>97</b> |
| <b>9. Análisis del ciclo celular y apoptosis .....</b>  | <b>98</b> |
| 9.1. Citometría de flujo .....  | 98        |
| 9.2. Tinción con bisbencimida.....  | 98        |

|  |            |
|--|------------|
| 9.3. Medición de la actividad de las caspasas.....   | 99         |
| 9.4. Medición de Anexina V a tiempo real.....  | 99         |
| <b>10. Análisis de proteínas.....</b>  | <b>100</b> |
| <b>11. Análisis de ARN.....</b>  | <b>102</b> |
| <b>12. Ensayos de combinación de fármacos (sinergia).....</b>  | <b>103</b> |
| <b>13. Ensayos para determinar la influencia del medio condicionado y del nicho tumoral (co-cultivos).....</b> | <b>103</b> |
| <b>14. Estudios de toxicidad aguda y sub-crónica.....</b>  | <b>104</b> |
| <b>15. Análisis estadístico.....</b>   | <b>105</b> |
| <br>   |            |
| <b>IV. RESULTADOS: PRIMERA PARTE.....</b>  | <b>107</b> |
| <b>1. Cribado de series químicas.....</b>  | <b>109</b> |
| 1.1. Complejos metálicos con chalconas y lapachol.....   | 109        |
| 1.2. Espirodímeros.....  | 112        |
| 1.3. Derivados de embelina con núcleos tipo pirazol o acridina.....  | 116        |
| 1.4. Análogos del híbrido naftoquinona-cumarina.....   | 119        |
| <br>   |            |
| <b>V. RESULTADOS: SEGUNDA PARTE.....</b>   | <b>129</b> |
| <b>1. JKST6 inhibe la viabilidad de células leucémicas.....</b>  | <b>131</b> |
| <b>2. JKST6 afecta a la viabilidad de células de LMC.....</b>  | <b>131</b> |
| <b>3. JKST6 causa baja toxicidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....</b>                                     | <b>133</b> |
| <b>4. JKST6 afecta a la proliferación de células de LMC.....</b>   | <b>137</b> |
| <b>5. JKST6 inhibe la entrada en el ciclo celular de células de LMC.....</b>                                   | <b>142</b> |
| <b>6. JKST6 induce apoptosis en células de LMC.....</b>  | <b>145</b> |
| <b>7. JKST6 inhibe la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 en células de LMC ..</b>                              | <b>150</b> |
| <b>8. JKST6 modula distintas vías de señalización implicadas en la supervivencia de células de LMC.....</b>    | <b>158</b> |



|  |            |
|--|------------|
| <b>9. JKST6 potencia los efectos anti-proliferativos y la actividad inhibitoria de STAT5 inducida por el IM.....</b> | <b>160</b> |
| <b>10. JKST6 mantiene su potencia antitumoral bajo la influencia del medio condicionado o del nicho tumoral.....</b> | <b>162</b> |
| <b>11. JKST6 reduce la viabilidad y el crecimiento de células de LMC resistentes a IM.....</b>                       | <b>173</b> |
| <b>12. JKST6 inhibe la vía BCR-ABL1/STAT5 en células de LMC resistentes a IM.....</b>                                | <b>177</b> |
| <b>VI. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>183</b> |
| <b>VII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>  | <b>203</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>  | <b>213</b> |
| <b>ANEXO I. RESULTADOS .....</b>   | <b>241</b> |
| <b>ANEXO II. FINANCIACIÓN .....</b>  | <b>311</b> |
| <b>ANEXO III. APORTACIONES CIENTÍFICAS.....</b>  | <b>317</b> |





# I. INTRODUCCIÓN



### 1. Neoplasias hematológicas

#### 1.1. Breve descripción y clasificación

Las neoplasias hematológicas (NH) son un grupo de enfermedades reconocidas como leucemias, linfomas y mielomas, que normalmente se originan en la médula ósea y los nódulos linfáticos (1). Dichas neoplasias constituyen un grupo de enfermedades heterogéneo a nivel clínico y biológico (2). Según la Sociedad Americana de Hematología (ASH), las NH afectan a la producción y a la función de las células sanguíneas. En un organismo sano, las células madre de la médula ósea maduran y dan lugar a tres tipos principales de células sanguíneas: glóbulos rojos, glóbulos blancos o plaquetas. En la mayoría de NH, el proceso de desarrollo normal de las células sanguíneas es interrumpido por un crecimiento descontrolado de un tipo de células sanguíneas anormales. Esas células anormales o cancerosas impiden que el tejido sanguíneo realice muchas de sus funciones, como evitar infecciones o detener el sangrado descontrolado (3).

También la ASH expone brevemente las principales características de los tres tipos de NH comentados anteriormente. En primer lugar, la leucemia causa la producción anormal de glóbulos blancos, que dificulta la producción de glóbulos rojos y plaquetas por parte de la médula ósea. El linfoma afecta al sistema linfático, que se encarga de retirar el exceso de fluidos en el cuerpo y producir células inmunitarias. En este tipo de cáncer, los linfocitos se multiplican sin control y se acumulan en los nódulos linfáticos y en otros tejidos, llegando a dañar el sistema inmune. Por último, el mieloma es un cáncer de células plasmáticas o linfocitos generadores de anticuerpos que atacan a los agentes infecciosos, por lo que esta enfermedad también debilita el sistema inmune y aumenta el riesgo de infección (3).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica estas enfermedades en función de los principales linajes celulares afectados, resultando en dos categorías principales: neoplasias mieloides y linfoides, dentro de las cuales se hayan distintos subtipos de cáncer sanguíneo (2,4). Esta clasificación es realizada por expertos en el área utilizando información revisada y consensuada sobre morfología, citoquímica, inmunofenotipo, genética y características clínicas de las enfermedades (4,5). Además, está sujeta a actualizaciones periódicas conforme avanza la investigación, facilitando el diagnóstico por parte de los especialistas (6) (**Figura 1**).

# I. INTRODUCCIÓN

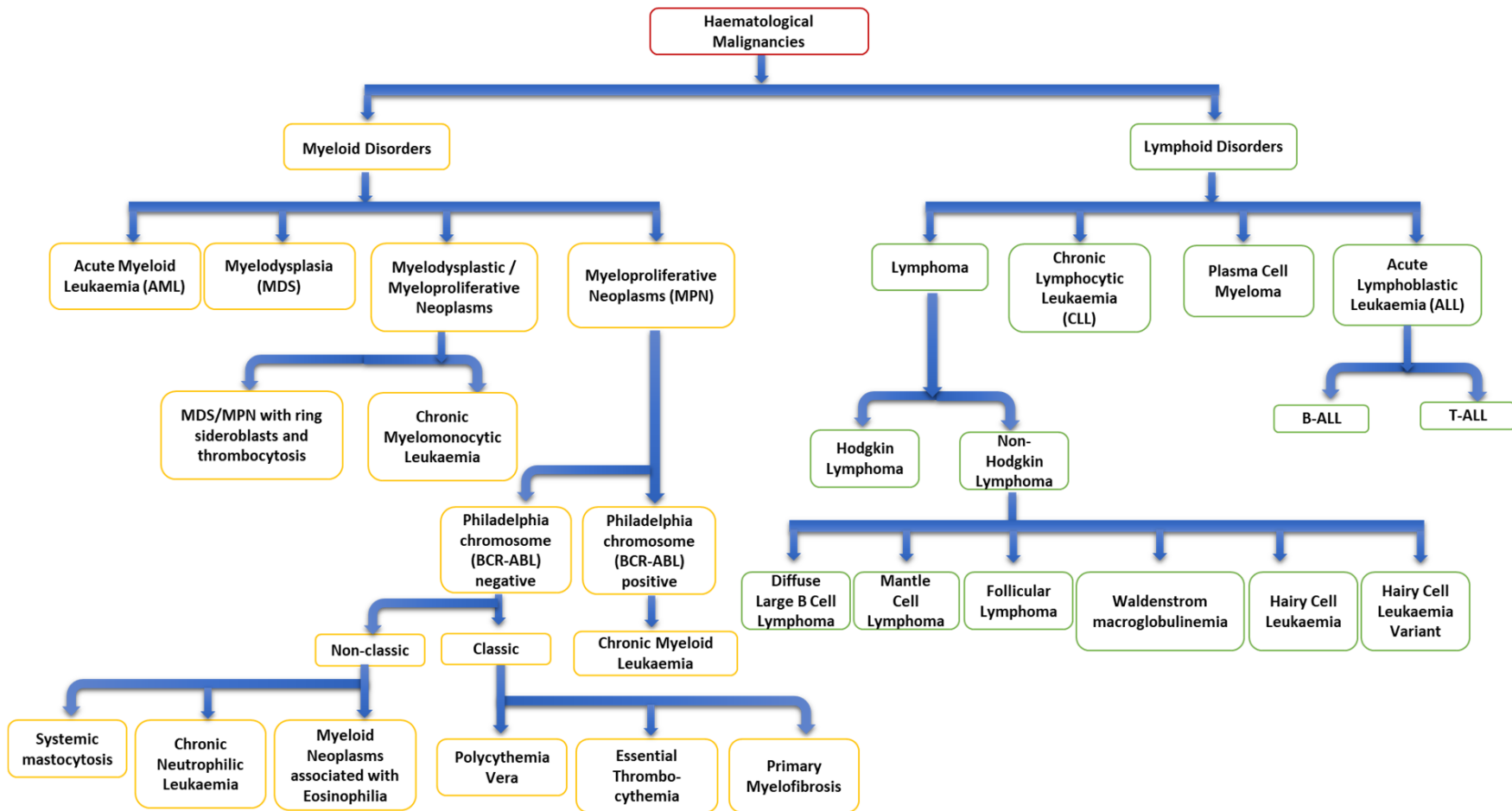
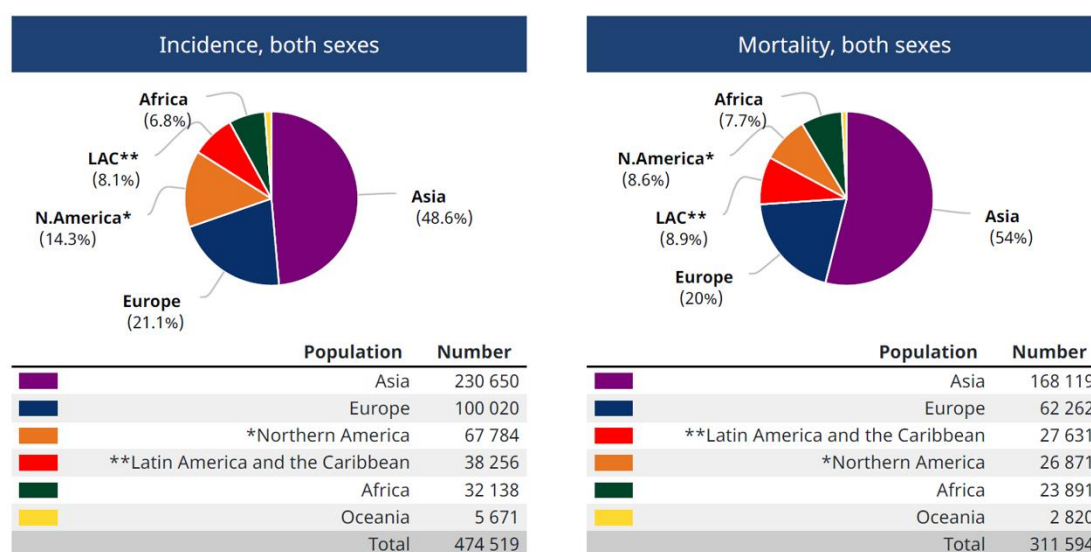


Figura 1. Principales tipos de neoplasias hematológicas. Adaptada de Veenstra *et al.* 2019 (5).

## 1.2. Epidemiología

Se considera que el cáncer hematológico representa aproximadamente el 6,5% de todos los tipos de cáncer a nivel mundial, llegando a alcanzar el 9% en EE. UU. y en Europa (7,8). Según datos de la OMS, en el año 2020 se detectaron 474.519 nuevos casos de leucemia y se registraron 311.594 muertes asociadas a esta enfermedad en el mundo (9) (**Figura 2**).



**Figura 2. Incidencia y mortalidad de la leucemia en ambos sexos a nivel mundial.** Tomada de Globocan 2020, Centro internacional de investigación del cáncer (OMS) (9).

Las NH pueden generarse a cualquier edad, pero resultan más frecuentes en edades avanzadas y, en estos casos, la enfermedad cursa con comorbilidad (hipertensión, enfermedad cardíaca, diabetes, enfermedad renal, o trastornos óseos) (1,7). Además, se han encontrado diferencias en la prevalencia y la supervivencia a las distintas NH según raza y etnia (10). El trabajo realizado por Patel *et al.* utilizando datos del programa Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER, 1999-2008), demuestra que los pacientes de leucemia mieloide aguda (LMA) negros e hispanos de EE. UU. tienen un mayor riesgo de mortalidad (12 y 6%, respectivamente) comparado con los pacientes blancos no hispanos (11). Además, otro estudio realizado a partir de datos del SEER (1973-2005) concluyó que el ratio de incidencia del mieloma múltiple (MM) es más alto en la población negra (11,0 por 100.000 personas/año) que en la población blanca (4,9 por 100.000 personas/año) (12).

### 1.3. Diagnóstico

Las NH tienen un amplio rango de manifestaciones clínicas, pasando de ser indolentes a agresivas, normalmente, dependiendo de la fase de madurez de las células afectadas. Por esta misma razón, es importante desarrollar técnicas diagnósticas que permitan reconocer enfermedades tan heterogéneas, que en ciertos casos pueden pasar desapercibidas y, por tanto, tener un peor pronóstico (2). Lógicamente, para detectar y distinguir entre un grupo tan diverso de enfermedades hay que utilizar un sistema de diagnóstico complejo que integre observaciones clínicas y técnicas de laboratorio (1). De forma general, se pueden destacar las siguientes técnicas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de NH (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Técnicas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de neoplasias hematológicas.**

| Techniques                                |
|---|
| Complete blood counts (CBC)               |
| Microscopic examination (blood film)      |
| Bone marrow biopsy/aspirate               |
| Cytochemistry                             |
| Histology                                 |
| Immunohistochemistry                      |
| Flow cytometry (immuno-phenotyping)       |
| Cytogenetic analysis                      |
| Fluorescence in situ hybridization (FISH) |
| Molecular genetic testing                 |
| Whole-genome scanning                     |
| Sequencing methods                        |
| Gene expression profiling                 |

Tabla adaptada de Bahakeem *et al.* 2020 (2).

Además, los ensayos que detectan biomarcadores moleculares resultan de gran utilidad en este grupo de enfermedades, no sólo para el diagnóstico, si no para el pronóstico, la subclasificación o el seguimiento de la evolución del cáncer (13).

### 1.4. Avances en investigación básica y aplicaciones clínicas

El estudio de las NH ha permitido un progreso drástico de la terapia oncológica procedente de la integración de la investigación básica, traslacional y clínica. Muchos de



estos avances terapéuticos han servido también de guía para su aplicación en otros tipos de cáncer (14).

Los primeros tratamientos contra las NH consistían en el uso de radioterapia y de quimioterapia, hoy en día consideradas terapias convencionales, que eliminan sin distinción las células de proliferación rápida. A pesar de mejorar la situación de los pacientes, estas terapias tienen una alta toxicidad asociada y unas limitaciones evidentes en cuanto a resultados clínicos (15).

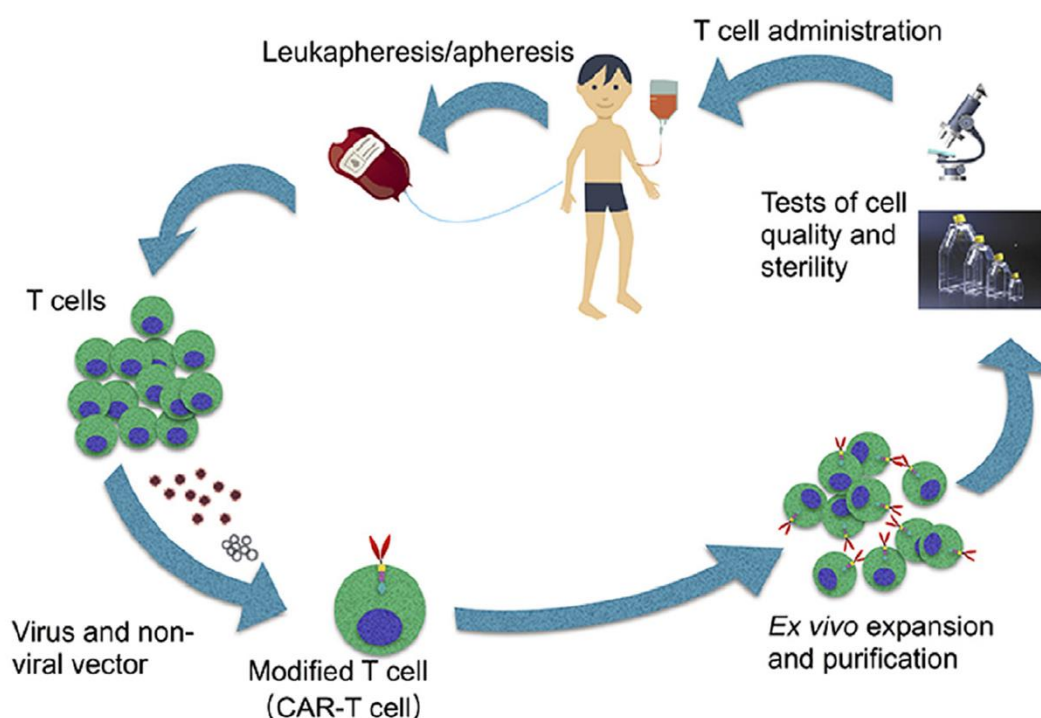
Asimismo, la investigación de combinaciones terapéuticas para combatir las NH abarca un largo y prolífico recorrido. Ya en 1965, se desarrolló un régimen quimioterápico llamado POMP (Purinethol: 6-mercaptopurina, Oncovin: vincristina, metotrexato y prednisona) para su uso en leucemias pediátricas (10, 15). En el caso de la leucemia linfocítica aguda (LLA), el uso de este tipo de combinaciones permitió que el ratio de supervivencia pasase de un 10% en los años 60 a un 90% en la actualidad (15).

La aparición de las terapias dirigidas constituyó un cambio de paradigma, pues permitían una eliminación más selectiva de las células tumorales al desarrollarse en base a características moleculares específicas (17). Ejemplo de ello fue el descubrimiento del imatinib (IM) como inhibidor de la actividad quinasa constitutiva de BCR-ABL1 (*breakpoint cluster region- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) en la leucemia mieloide crónica (LMC) (18), o la combinación del ácido holo-trans retinoico y trióxido de arsénico en la leucemia promielocítica aguda (LPA) (19). Ambos tratamientos supusieron un gran avance en la supervivencia de los pacientes, por lo que son consideradas terapias dirigidas exitosas que han impulsado el desarrollo de otros fármacos análogos (14).

Aunque se ha avanzado en el hallazgo de tratamientos más selectivos y menos tóxicos, la quimioterapia convencional sigue utilizándose en ciertos casos. Sin embargo, se aplica con un conocimiento más profundo de sus efectos biológicos y en ocasiones, con el objetivo de producir sinergias. Un ejemplo actual es el uso de la combinación de un agente alquilante (ciclofosfamida) y un inhibidor del proteasoma (bortezomib) como tratamiento inicial eficaz contra el MM (20).

En la búsqueda de nuevos tratamientos contra las NH, surge la inmunoterapia, que en los últimos años ha supuesto un área de expansión debido a los múltiples esfuerzos que se han destinado a su investigación. En resumen, la inmunoterapia pretende fortalecer el sistema inmune del paciente de forma que sus células de defensa ataquen y eliminen a las células cancerígenas del organismo (21). Los inhibidores de puntos de control

inmunitario, como el anticuerpo nivolumab que reconoce la *programmed cell death protein 1* (PD-1), han demostrado ser eficaces en el linfoma de Hodgkin, incrementando la actividad de los linfocitos T e inhibiendo el crecimiento tumoral (14,21). Sin embargo, dentro de la inmunoterapia, el tratamiento que ha despertado mayor interés es el de los linfocitos T con receptores de antígeno quiméricos (CAR-T cell, *Chimeric Antigen Receptor T cell*). Se trata de un tipo de inmunoterapia celular adoptiva que utiliza linfocitos T modificados genéticamente para expresar receptores sintéticos de forma que se reconozcan antígenos presentes en las células tumorales (**Figura 3**).



**Figura 3. Procedimiento de producción de linfocitos T con receptores de antígeno quiméricos (CAR-T cell therapy).** Tomada de Zhao *et al.* 2017 (22).

Esta técnica tan compleja ha tenido mayor éxito en el tratamiento de NH que en tumores sólidos, y en concreto en neoplasias del linaje de linfocitos B, como por ejemplo en leucemia linfocítica aguda tipo B (B-LLA) (22). Cabe destacar que hay pocos casos de neoplasias mieloides en los que esta terapia haya sido efectiva, debido a una falta de identificación de antígenos de superficie que pueda ser aplicada a esta técnica (14). Entre las desventajas más importantes de la terapia CAR-T cell se encuentra el hecho de que las células deben ser extraídas de cada paciente de forma individual, crecidas *ex vivo* y expandidas antes de su reintroducción en el organismo tras haber sido alteradas

genéticamente. Por tanto, es un proceso caro y complejo que implica una tasa de fracaso considerable (22).

Otro avance en la terapia contra las NH ha sido viable gracias al estudio del papel de las células Natural Killer (NK). Las NK, a diferencia de los linfocitos T, reconocen células leucémicas que expresan bajos niveles de moléculas HLA (*human leukocyte antigens*) de clase I, por lo que podrían ser más eficaces para combatir la tolerancia del sistema inmune hacia el cáncer en pacientes con leucemia. Además, se está investigando su uso como NK genéticamente modificadas para expresar receptores de antígeno quiméricos (CAR-NK) o para aprovechar su capacidad de provocar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, combinándolas con anticuerpos monoclonales (23). Sin embargo, también se han observado desventajas en el uso de anticuerpos monoclonales como la aparición de resistencia. El hallazgo de los anticuerpos biespecíficos, capaces de reconocer dos antígenos o dos epítomos distintos en un solo antígeno, ha supuesto una mejora en este sentido. Por un lado, generan respuestas citotóxicas más potentes y por otro, es más difícil la aparición de resistencias debido al reconocimiento de dos antígenos al mismo tiempo. Actualmente hay tan solo tres tipos de anticuerpos biespecíficos en el mercado, de los cuales, el blinatumomab que reconoce CD3/CD19 fue aprobado en 2014 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para tratar la B-LLA (24).

Sin duda, los tratamientos inmunoterápicos representan un avance prometedor en la terapia contra las NH. Sin embargo, los expertos vaticinan su aplicación clínica en combinación con terapias dirigidas y apuestan por la permanencia de las terapias convencionales como la radioterapia y la quimioterapia en aquellas neoplasias donde aún son efectivas (14).

Por otro lado, el avance en investigación básica sobre el cáncer a nivel molecular y celular ha generado conocimientos valiosos para el progreso de terapias frente a las NH. En primer lugar, el estudio del microambiente tumoral (TME) se ha convertido en un área de gran interés, por ahora sin una translación a la clínica evidente, pero que, sin duda, es vital para comprender las interacciones entre los distintos tipos celulares que conforman el contexto del tumor. Por ejemplo, se ha descubierto que en el MM, las células que componen el TME ejercen acciones pro-tumorales como favorecer el crecimiento tumoral, inducir la supervivencia, contribuir a la resistencia a los fármacos, e incluso ejercer acción inmunosupresora, por lo que la inhibición farmacológica de las mismas puede traducirse en beneficios terapéuticos (14).

## I. INTRODUCCIÓN

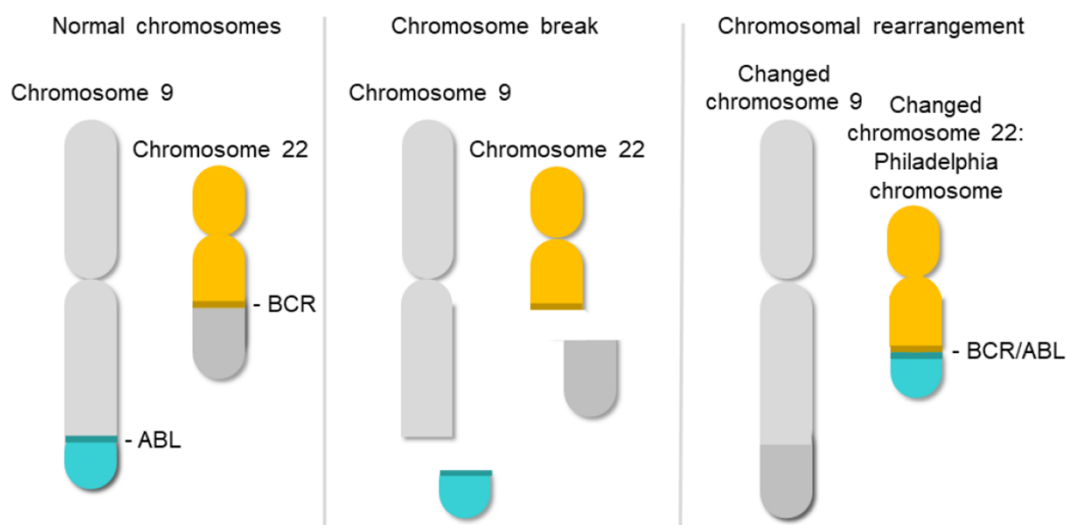
Los resultados obtenidos en la investigación genómica aplicada al cáncer han supuesto una aportación fundamental de la investigación básica a la fase clínica, ya que han permitido descubrir numerosas mutaciones *driver* propiciando el desarrollo de terapias dirigidas capaces de minimizar sus efectos (14). Un ejemplo de ello es el conocimiento de las alteraciones presentes en las neoplasias mieloproliferativas clásicas (MPNs) o también llamadas MPNs BCR-ABL1 negativas (-). Las mutaciones *driver* de estas MPNs incluyen principalmente a los genes *Janus kinase-2 (JAK2)*, *calreticulina (CALR)* o *el receptor de trombopoyetina (MPL)*. Entre ellas, la mutación más frecuente es  $JAK2^{V617F}$ , que se asocia con la policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (ET) y la mielofibrosis (MF). Estos conocimientos han favorecido la investigación y desarrollo de inhibidores como el ruxolitinib, de alta afinidad contra JAK1, JAK2, seguido a distancia de TYK2 y JAK3, que ha sido aprobado para el tratamiento de MF, de PV con intolerancia o resistencia a hidroxiurea y recientemente, de la enfermedad de injerto contra huésped (25).

En el caso de la LMA, la complejidad de los defectos moleculares aumenta, llegándose a identificar, al menos, 24 subtipos diferenciados genéticamente, con mutaciones puntuales que pueden llegar a afectar a más de 70 genes distintos. Sin embargo, la clasificación más aceptada tiene en cuenta lesiones citogenéticas (p. ej. t(15;17), t(6;9)) junto con mutaciones en *Nucleophosmin (NPM1)*, *fms-like tyrosine kinase-3 internal tandem duplications (FLT3<sup>ITD</sup>)* y *CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha (CEBPA)* (26,27). Actualmente, existen inhibidores de tirosina quinasa (TKIs) de primera (p. ej. sorafenib, midostaurina) y segunda generación (p. ej. quizartinib, crenolanib) de FLT3, que han mejorado progresivamente en potencia y especificidad, de forma que se ha reducido la toxicidad asociada al tratamiento (28).

En este contexto, existen una gran cantidad de datos generados gracias a las nuevas técnicas (-ómicas) pero es necesario integrar dicha información de forma que se comprendan sus funciones en las vías de señalización, más que el papel de una mutación individual o la sobreexpresión de una proteína. De esta forma, se está trabajando en comprender qué vías de señalización pueden actuar sinérgicamente para promover el crecimiento tumoral, o de manera redundante y generar así resistencias ante la inhibición de una de las vías (14).

## 1.5. Neoplasias BCR-ABL1 positivas

El conocido cromosoma Filadelfia (Ph) es el resultado de una translocación cromosómica recíproca que fusiona el protooncogén *ABL1* del cromosoma 9 con las secuencias *BCR* en el cromosoma 22. De esta forma, se obtiene un cromosoma 22 “reducido” que codifica para una proteína de fusión llamada BCR-ABL1 (21, 22) (**Figura 4**).



**Figura 4. Translocación cromosómica t(9;22)(q34;q11) que genera el cromosoma Filadelfia.** Tomada de Vuelta *et al.* 2021 (37).

Dicha oncoproteína es una quinasa constitutivamente activa, y es la marca de distinción de la LMC, ya que está presente en más del 95% de los pacientes con esta enfermedad. Sin embargo, también se puede encontrar en un 15-30% de los casos de LLA y en casos raros (1%) de LMA (31).

### 1.5.1. Leucemia mieloide crónica

#### 1.5.1.1. Breve descripción y progresión clínica

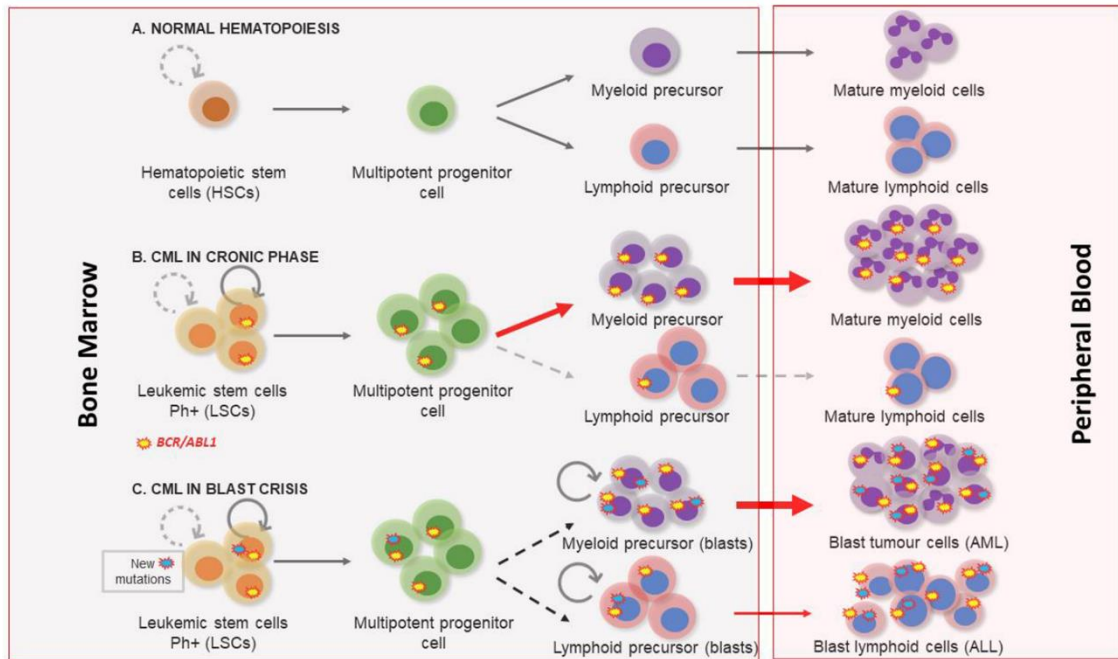
Se trata de una neoplasia mieloproliferativa clonal cuyo origen proviene de las células madre hematopoyéticas (HSCs) pluripotenciales, caracterizada por una expansión granulocítica y una leucocitosis evidente (32,33). La incidencia anual es de 0,7-1 nuevos casos por 100.000 adultos al año con un ligero predominio masculino en la población europea (34). La media de edad de los pacientes de LMC en los países occidentales es de 57 años, siendo muy rara en la infancia, y aumentando la incidencia con la edad (25, 26).

La aparición de la LMC no se asocia con factores hereditarios, familiares, geográficos, étnicos, ni económicos, por lo que su aparición no es prevenible (36).

La LMC incluye tres fases de progresión de la enfermedad que se citan por orden de aparición: fase crónica (CP), fase acelerada (AP) y fase blástica (BP). La mayoría de casos se detectan en la CP de manera accidental, cuando se realizan análisis sanguíneos rutinarios (33,36). Esto ocurre porque la primera fase de la enfermedad es normalmente asintomática y los pacientes mantienen un sistema inmune competente durante largos periodos de tiempo (36). En esta fase inicial, las células mieloides se expanden notablemente, lo cual puede desencadenar la aparición de síntomas como febrícula, sudoración o pérdida de peso, debido al hipermetabolismo secundario a la mieloproliferación. También, conforme progresa la enfermedad, aparecen molestias abdominales asociadas a la esplenomegalia o fatiga consecuencia de la baja producción de hematíes (anemia) (33,36).

Si no hay un tratamiento eficaz, la LMC en CP progresa a AP, caracterizada por un alto grado de inestabilidad que puede desembocar en una fase más agresiva, similar a una leucemia aguda, conocida como BP (37). Se han utilizado distintos criterios para distinguir entre AP y BP, los cuales dependen de la proporción de blastos en la sangre periférica y en la médula ósea (25, 27). Ambas fases se caracterizan por una parada en la maduración de las células mieloides y linfoides, además de la acumulación de aberraciones genéticas y epigenéticas en las HSCs (37). Una característica asociada a la AP es la presencia de anomalías citogenéticas adicionales al cromosoma Ph, siendo las más comunes la trisomía del cromosoma 8, isocromosoma 17, o la duplicación del cromosoma Ph (36). El estadio final de la BP puede resultar en un fenotipo de leucemia aguda linfoblástica (25%), mieloblástica (50%) o bifenotípica/indiferenciada (25%) (**Figura 5**).

La media de supervivencia de pacientes con LMC en BP es de 6 a 8 meses, siendo la de fenotipo linfoide de mejor pronóstico que la de fenotipo mieloide (33). La progresión de la BP desencadena un fallo en la médula ósea causado por la infiltración de blastos inmaduros que impiden la diferenciación celular. Esto provoca, en última instancia, la mortalidad del paciente debido a infecciones, trombosis o anemia (37).

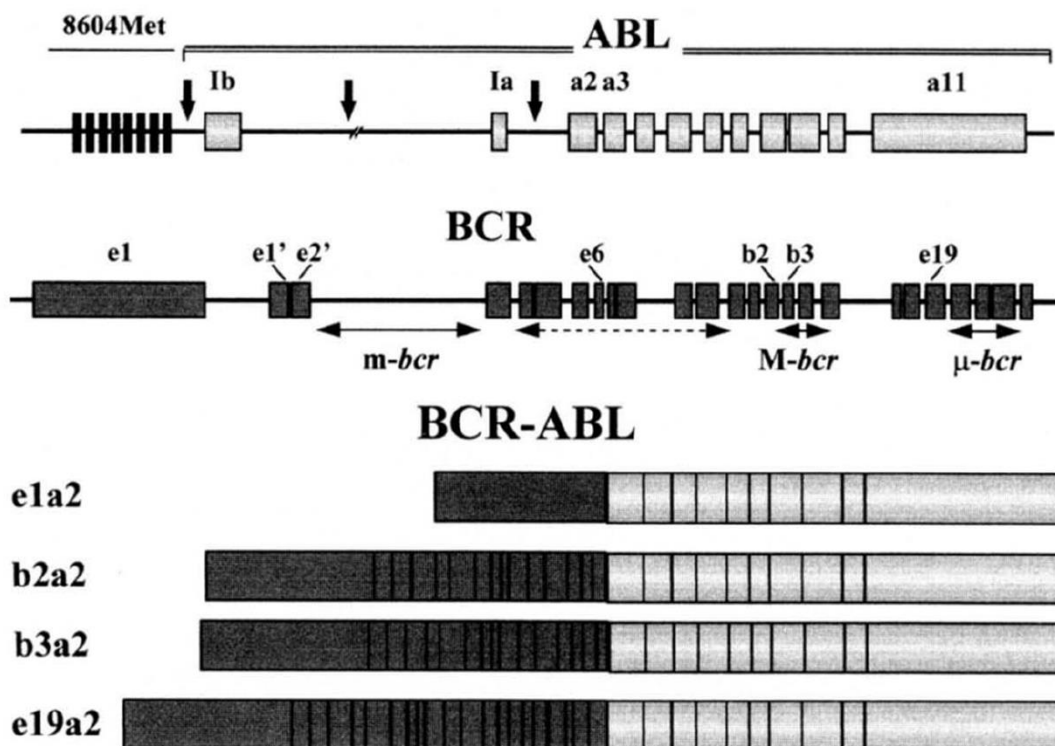


**Figura 5. Fases clínicas de la leucemia mieloide crónica.** **A.** Hematopoyesis normal con linajes mieloide y linfocito equilibrados. **B.** Diferenciación celular en fase crónica, la presencia de BCR-ABL1 descompensa e incrementa el linaje mieloide. **C.** Diferenciación celular en fase blástica, a la presencia de BCR-ABL1 se suma la aparición de otras mutaciones que propician el incremento del linaje mieloide con fenotipo tipo leucemia mieloide aguda (AML) o del linaje linfocito dando lugar a una variante tipo leucemia linfocito aguda (ALL). Tomada de Vuelta *et al.* 2021 (37).

### 1.5.1.2. Biología molecular de la LMC

En 1960, Nowell y Hungerf describieron por primera vez el cromosoma Ph como un pequeño cromosoma presente en las células de médula ósea de pacientes de LMC (38). En 1973, Rowley detectó, mediante nuevas técnicas de fluorescencia, la translocación cromosómica que causaba dicho cromosoma reducido, asociándose por primera vez una anomalía cromosómica con una neoplasia (29). En la siguiente década, se descubrió que el resultado de esa translocación cromosómica daba lugar a un gen fusionado llamado *BCR-ABL1* que codifica para una oncoproteína vital para la LMC (39).

Concretamente, el gen *ABL1* es el homólogo humano del oncogén *v-abl* presente en el virus de la leucemia murina de Abelson, y se compone de 11 exones que se extienden unas 230 kilobases (kb). El *breakpoint* en el gen de *ABL1* ocurre normalmente en la parte 5' del exón 2. La región del exón 2 al 11 (a2-a11) de *ABL1* es la que se transpone hacia una zona de 5,8 kb llamada *major breakpoint cluster region* (M-bcr) del gen *BCR* en el cromosoma 22, conteniendo de los exones 12 al 16 (b1-b5) (**Figura 6**).



**Figura 6. Representación de los genes *ABL1* y *BCR* que se ven interrumpidos en la translocación  $t(9;22)(q34; q11)$ .** Las cajas simbolizan los exones y las líneas que las conectan, los intrones. Los *breakpoints* en *ABL1* se representan con flechas verticales. En *BCR* se incluyen dos exones alternativos *e1'* y *e2'*. Las regiones de *breakpoint* tienen lugar en uno de los tres *breakpoint cluster regions* (*bcr*), cuyas localizaciones respectivas se incluyen entre las dobles flechas horizontales. Excepcionalmente, el *breakpoint* cae entre las regiones *m-bcr* y *M-bcr*, indicada con la doble flecha discontinua. Panel inferior: distintos transcritos de *BCR-ABL1* con sus tipos de unión. La unión tipo *e1a2* es resultado de la rotura en *m-bcr*; la unión *b2a2* y *b3a2* en *M-bcr*, y la unión tipo *e19a2* en  $\mu$ -*bcr*. Tomada de Melo 1996 (40).

Las localizaciones del *breakpoint* en *BCR* caen en 5' entre los exones *b2* y *b3* o en 3' entre los exones *b3* y *b4*. Dentro del gen fusionado *BCR-ABL1* puede haber, por tanto, zonas de unión *b2a2* o *b3a3*, que codifican ambas para una proteína de 210 kDa (p210 BCR-ABL1), presente en la mayoría de los pacientes de LMC y en un tercio de los de LLA (27, 30, 31).

Otro *breakpoint* de *BCR* que se encuentra con menor frecuencia se sitúa *upstream* del anteriormente descrito, entre los dos exones alternativos *e2'* y *e2* y se conoce como la región *minor bcr* (*m-bcr*). En estos casos, los exones *e1'* y *e2'* se retiran por *splicing*, quedando en el transcrito la unión *e1a2*, que se traduce a una proteína de fusión BCR-ABL1 de 190 kDa (p190 BCR-ABL1). Esta oncoproteína, más pequeña, se asocia con monocitosis y está presente en dos tercios de los casos de LLA y en casos raros de LMC y de LMA (40,41). Cabe destacar que se ha observado que los pacientes de LMC positivos



para la variante (p190 BCR-ABL1) tienen un peor pronóstico que los que poseen la oncoproteína (p210 BCR-ABL1)(36) (**Figura 6**).

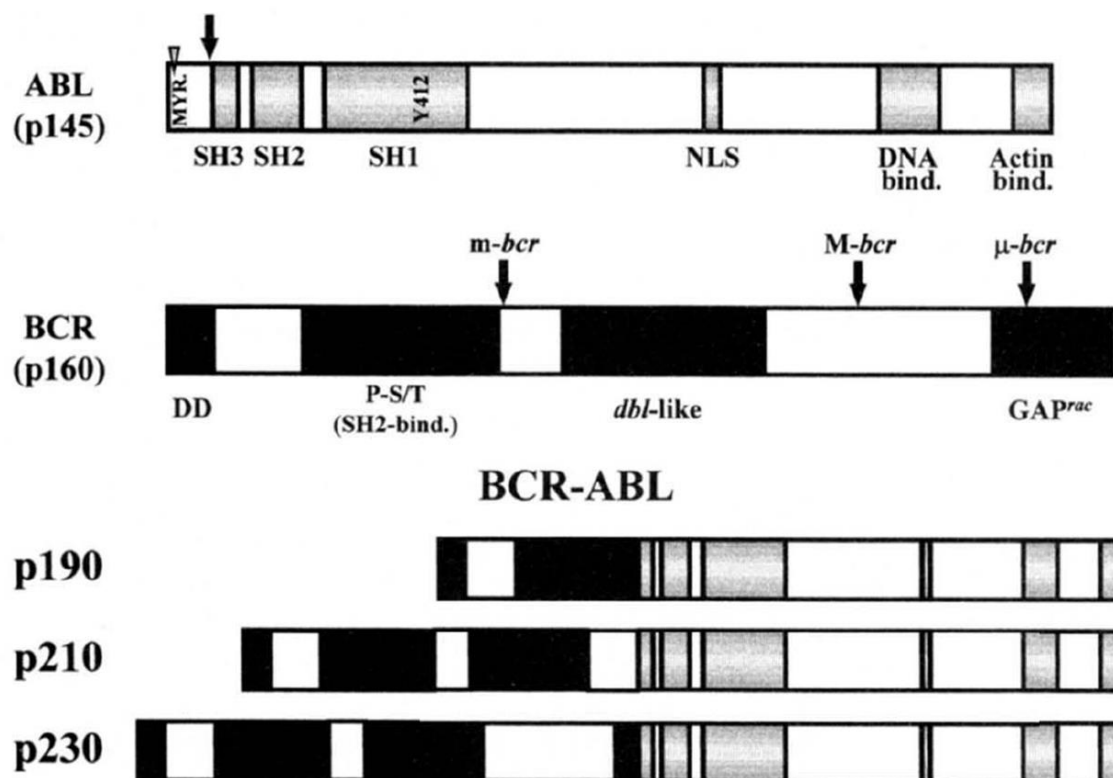
Más recientemente, se han descrito algunos casos de LMC con un *breakpoint* en 3' de *BCR*, entre los exones e19 y e20 conocida como *micro-bcr* ( $\mu$ -*bcr*). Este se transcribe a un ARN mensajero de *BCR-ABL1* con la zona de unión e19a2 y codifica una oncoproteína de 230 kDa (p230 BCR-ABL1). Curiosamente, este tipo de proteína de fusión se asocia con casos de LMC más benignos, clasificados como variantes tipo leucemia neutrofílica crónica (LNC) (40,41) (**Figura 6**). De lo anterior se infiere que dependiendo de la localización del *breakpoint* en el gen *BCR* y, por tanto, el tipo de proteína de fusión codificada, se desencadena un fenotipo distinto dentro de la LMC. Brevemente, se distinguen al menos tres entidades clínico-hematológicas entre las leucemias Ph positivas crónicas (p210 LMC, p190 LMC y p230 LNC) y dos entre las agudas (p210 LMA y p190 LMA) (40).

La relación causal directa entre la expresión de las oncoproteínas de fusión descritas y la generación de leucemias, linfomas y síndromes tipo LMC ha sido comprobada experimentalmente. Tanto por trasplante de células transducidas para la expresión de BCR-ABL1 como mediante su expresión transgénica (22, 25). Por ello, es de esperar que la composición estructural de la proteína fusionada tenga un papel importante en la patogénesis de estas enfermedades BCR-ABL1 positivas (40). Para poder comprender dichos efectos, en primer lugar, se han investigado en profundidad las funciones de las proteínas normales ABL1 y BCR.

La proteína ABL1 es una tirosina quinasa tipo *non-receptor* de 145 kDa (p145 ABL1) con funciones tan dispares como la estimulación de la proliferación o la diferenciación celular, supervivencia o muerte, retracción o migración, lo cual describe funciones específicas del tejido y del contexto. Además, ABL1 es capaz de pasar del núcleo al citoplasma y puede unirse al ADN o a la actina, ambos con papeles determinantes en prácticamente todos los procesos biológicos celulares (42). También se ha demostrado que ABL1 interfiere en la señalización de las integrinas y en la función de los linfocitos B. De hecho, se ha descrito que la mutación ABL1<sup>-/-</sup> en ratones transgénicos es letal, causando enanismo grave y desarrollo linfoide alterado (30). Por su parte, la proteína BCR tiene funciones inciertas aunque se conoce su actividad serina-treonina quinasa (36) y su función de proteína activadora de GTPasa (GAP) (40). Los ratones transgénicos BCR<sup>-/-</sup> desarrollan shock séptico cuando se les estimula con lipopolisacárido (LPS) debido a una carga oxidativa neutrofílica incrementada y

desregulada (30). Los ratones *ABL1*<sup>+/-</sup> al igual que los *BCR*<sup>+/-</sup> se desarrollan con normalidad, lo cual indica que la pérdida de un alelo, típico en la LMC, no participa en la patogénesis de la enfermedad (30).

Estructuralmente, *ABL1* posee dos isoformas generadas por *splicing* alternativo del primer exón (tipo 1a o 1b). La isoforma 1b posee en la región amino-terminal una secuencia de miristoilación que une a *ABL1* con proteínas de la membrana plasmática (32) (Figura 7).



**Figura 7. Estructura proteica de ABL1 (p145); de BCR (p160) y de la proteína de fusión BCR-ABL1 (p210).** Las flechas en BCR indican los sitios de fusión de las proteínas que surgen de m-*bcr* (p190 BCR-ABL1), M-*bcr* (p210 BCR-ABL1), μ-*bcr* (p230 BCR-ABL1). Dominios en ABL1: MYR (sitio de miristoilación) presente en el tipo 1b de la proteína; regiones reguladoras de homología de Src (SH3, SH2 y SH1); en el dominio quinasa (SH1) está el lugar de autofosforilación (Y412); la señal de localización nuclear (NLS) y los dominios de unión al ADN y a la actina. En BCR se encuentra: el dominio de dimerización (DD); sitio de unión a SH2 rico en fosfo-serina/treonina (P-S/T); el dominio tipo Dbl (típico de proteínas Rho GTPasas) y el dominio tipo *GAP<sup>rac</sup>* (*GTPase-activating proteins*). Tomada de Melo 1996 (40).

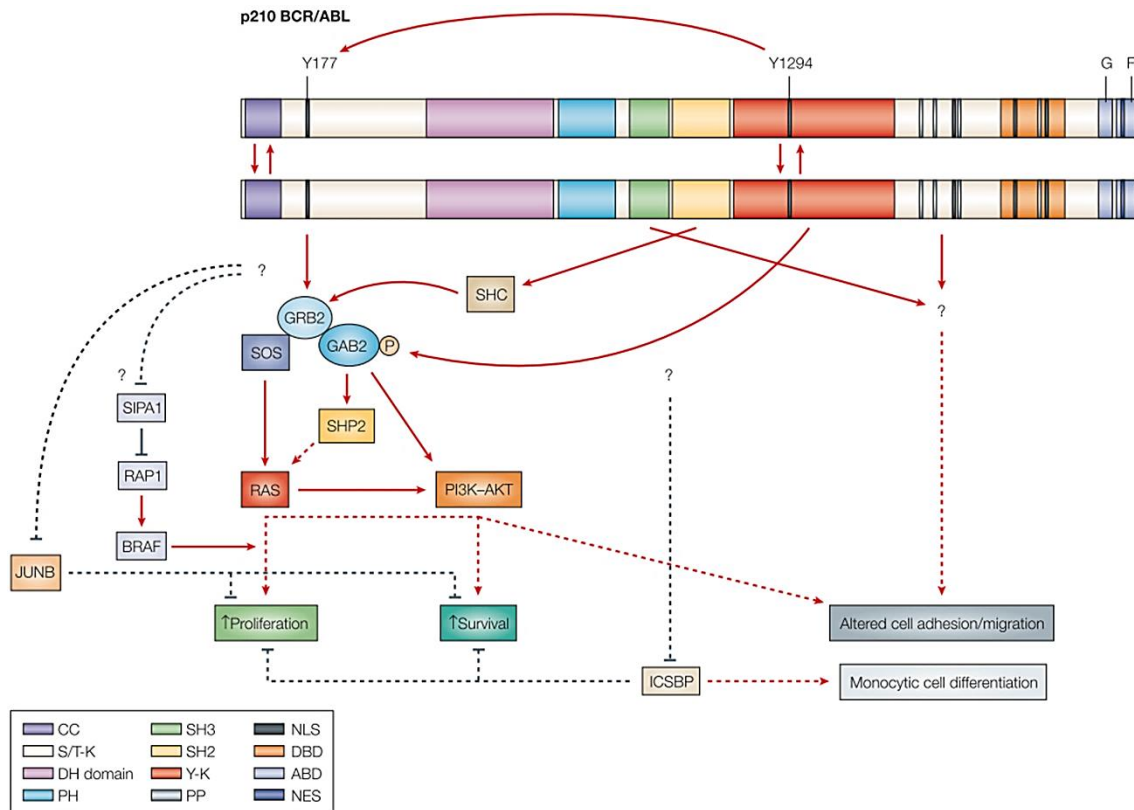
En esta misma región, se encuentran dos dominios homólogos de Src (SH2 y SH3) que regulan la actividad tirosina quinasa de *ABL1* y el dominio catalítico (SH1), a su vez, principal lugar de autofosforilación (Y412). La parte C-terminal de *ABL1* posee el

dominio de unión al ADN, señales de localización nuclear y el sitio de unión para la actina (30, 31). Las regiones SH3, SH2 y SH1 pueden ensamblarse formando una estructura auto-inhibitoria en la que SH3 y SH2 forman una “pinza” que mantiene al dominio quinasa en estado inactivo (32) (**Figura 7**).

BCR contiene un total de cinco dominios diferentes. Concretamente, un dominio de dimerización o *coiled-coil* (CC), un dominio serina/treonina (S/T) quinasa, un dominio de homología al factor de intercambio de nucleótidos de guanina (*dbl-like* o DH), un dominio de homología a la pleckstrina (PH) y un dominio responsable de la función de GAP (24, 27, 30) (**Figura 7**).

En la oncoproteína, la fusión de la región N-terminal de BCR con ABL1 inserta una secuencia de aminoácidos al segmento SH2 de ABL1 (43). Las secuencias de BCR interfieren con el dominio regulador de la quinasa SH3 adyacente, lo cual provoca la activación constitutiva de ABL1 como tirosina quinasa, por impedimento de su regulación negativa fisiológica (31, 34). Además, el dominio CC de BCR permite la dimerización o tetramerización de la oncoproteína BCR-ABL1 y su consecuente autofosforilación, por tanto también es una región determinante para la acción transformante de la oncoproteína (45) (**Figura 8**). Por otro lado, la fosforilación del residuo Y177 de BCR, conservado en la proteína fusionada BCR-ABL1, genera un sitio de unión de alta afinidad para la GRB2, que a su vez se une a SOS (un intercambiador de nucleótidos de guanina de RAS) y a una proteína adaptadora (GAB2). SOS por su parte activa a RAS y, una vez GAB2 es fosforilado por BCR-ABL1, es capaz de reclutar a SHP2 y a PI3K. Esto acaba generando la activación *downstream* de múltiples vías de señalización que favorecen la proliferación y la supervivencia celular (**Figura 8**).

## I. INTRODUCCIÓN



**Figura 8. Estructura proteica de p210 BCR-ABL1 y su señalización celular.** Las proteínas BCR-ABL1 pueden formar dímeros o tetrámeros a través de los dominios CC, y fosforilarse mutuamente (flechas rojas hacia arriba y hacia abajo). Se representan flechas rojas para indicar interacciones directas y/o activaciones. Las flechas negras indican regulación negativa. Las flechas discontinuas indican múltiples pasos. ABD, *actin-binding domain*; CC, *coiled-coil*; DBD, *DNA-binding domain*; DH, *Dbl/CDC24 guanine-nucleotide exchange factor homology*; NES, *nuclear exporting signal*; NLS, *nuclear localization signal*; PP, *proline-rich SH3 binding site*; S/T-K, *serine/threonine kinase*; Y-K, *tyrosine kinase*. Tomada de Ren 2005 (32).

### 1.5.1.3. Características citogenéticas y diagnóstico molecular

La diagnosis de la LMC consiste en la detección de la translocación  $t(9;22)(q34.1;q11.21)$  y/o el gen híbrido *BCR-ABL1*, mediante citogenética o por métodos moleculares (36). Con este fin, se toma una muestra de aspirado de médula ósea para realizar un estudio morfológico, ya que la proporción de células blásticas y de basófilos es crucial para discernir entre la CP, la AP o la BP, y para los estudios citogenéticos. También puede requerirse una biopsia para analizar el grado de fibrosis, que es importante en el pronóstico de la enfermedad (35). Los estudios citogenéticos deben realizarse por ensayo de bandeo de cromosomas o por tinción Giemsa de los cromosomas en metafase. Además, es obligatorio realizar una PCR cuantitativa a tiempo real de células de sangre periférica para identificar el tipo de transcrito de *BCR-ABL1*, y para realizar el seguimiento una vez comenzada la terapia. Alrededor de un 2-4% de los pacientes poseen

un transcrito de *BCR-ABL1* atípico por ausencia del exon2 de *ABL1* (e13a3 o e14a3), o como resultado de *breakpoints* poco frecuentes en *BCR* (p. ej. e1a2, e6a2, e8a2, o e19a2). Si se detecta la presencia del transcrito *BCR-ABL1* por métodos moleculares, pero no se puede identificar el cromosoma Ph por citogenética, es necesario realizar un ensayo FISH. El diagnóstico se completa con un examen físico que explore el tamaño del bazo y del hígado, análisis bioquímicos y un electrocardiograma (35,46).

La determinación de la fase de progresión de la enfermedad y la distinción entre CP, AP y BP es una labor necesaria que se lleva a cabo por estudio de parámetros clínicos y hematológicos (47) (**Tabla 2**). Además, las últimas investigaciones clínicas han actualizado el procedimiento, de forma que la resistencia a dos TKI, la detección de mutaciones en el dominio quinasa de *BCR-ABL1* o la aparición de aberraciones cromosómicas adicionales (ACAs) se consideran factores de riesgo a tener en cuenta en el pronóstico de la enfermedad (35).

El cromosoma Ph es detectado en un 95% de los pacientes de LMC, en un 5% de niños o 15-30% de adultos con LLA y en aproximadamente un 2% de pacientes de LMA. En algunos casos, se detectan translocaciones que implican 3 o más cromosomas, además del cromosoma Ph que se llaman ACAs (36). En el 5% de los pacientes con un fenotipo típico de LMC, el cromosoma Ph no es detectable, pero se detecta el transcrito *BCR-ABL1*. Curiosamente, estos pacientes tienen un mecanismo patológico y un resultado de la enfermedad igual a la de los pacientes que expresan el cromosoma Ph. Aquellos pacientes que no tienen el cromosoma Ph y tampoco expresan la anomalía genética *BCR-ABL1*, cursan con una LMC atípica que tiene un pronóstico y un tratamiento distinto (36).

La aparición de nuevas aberraciones citogenéticas en células que expresan el cromosoma Ph se considera un factor importante en la progresión de la enfermedad a BP, y se conoce como evolución clonal. Las aberraciones citogenéticas secundarias más frecuentes en pacientes que sufren evolución clonal son la trisomía del cromosoma 8, el isocromosoma 17 y la duplicación del cromosoma Ph. Estas se relacionan con sobreexpresión del protooncogen *MYC* (*V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*), la pérdida del 17p y la sobreexpresión de *BCR-ABL1*, respectivamente (37, 38). En este sentido, el valor pronóstico de la presencia de ACAs ha evolucionado claramente conforme ha avanzado la investigación: no existiendo una correlación clara entre dichas aberraciones moleculares y la progresión de la enfermedad en 2006 (36), pasando a considerarse un factor de advertencia en 2013 por la European LeukemiaNet

(ELN) (50) y, por último, clasificándolo como factor de riesgo alto en 2020 por la ELN (35).

**Tabla 2. Definición de fases acelerada y blástica de la leucemia mieloide crónica.**

| Criteria  | ELN  | WHO  |
|---|--|--|
| <b>Accelerated phase</b>                          |  |  |
| <b>Blasts (PB or BM)</b>                          | 15-29%   | 10-19%   |
| <b>Blasts plus promyelocytes</b>                  | ≥ 30% with blasts  | –  |
| <b>Basophils (PB)</b>                             | ≥20%   | ≥20%   |
| <b>WBC</b>  | -  | Unresponsive to tx   |
| <b>Thrombocytopenia</b>                           | <100 x 10 <sup>9</sup> /L<br>unrelated to therapy            | <100 x 10 <sup>9</sup> /L<br>unrelated to therapy  |
| <b>Thrombocytosis</b>                             | –  | > 1000 x 10 <sup>9</sup> /L unresponsive<br>to tx  |
| <b>Anemia</b>                                     | –  | –  |
| <b>Splenomegaly</b>                               | –  | Unresponsive to tx   |
| <b>Cytogenetics</b>                               | ACA/Ph+ major route, on<br>treatment                         | ACA/Ph+ major route, complex<br>karyotype, or 3q26.2<br>abnormalities, at diagnosis;<br>any new ACA/Ph+, on<br>treatment   |
| <b>Response to TKI (provisional<br/>criteria)</b> | –  | Failure to achieve CHR to the<br>first TKI, or any hematological,<br>cytogenetic, or molecular<br>indication of resistance to 2<br>sequential TKIs, or occurrence<br>of ≥2 mutations in BCR-ABL1<br>during TKI therapy |
| <b>Blast phase</b>                                |  |  |
| <b>Blasts (PB or BM)</b>                          | ≥30%   | ≥20%   |
| <b>Other</b>                                      | Extramedullary blast<br>proliferation (apart from<br>spleen) | Extramedullary blast<br>proliferation, or large foci or<br>clusters of blasts in the BM<br>biopsy  |

Tabla adaptada de Bonifacio *et al.* 2019 (47). ELN: European LeukemiaNet, WHO: World Health Organization, PB: Peripheral Blood, BM: Bone Marrow, tx: therapy transplant treatment, CE: clonal evolution, CHR: complete hematologic response, ACA/Ph+: additional chromosome abnormalities in Philadelphia-positive cells.

## 2. BCR-ABL1 y modulación de la señalización intracelular

La capacidad transformadora de la oncoproteína BCR-ABL1 proviene de sus características estructurales únicas. Para empezar, carece de la actividad auto-inhibitoria

de la proteína ABL1, ya que es incapaz de adoptar la conformación estructural necesaria que requiere de los dominios SH1, SH2 y SH3 inalterados (51). Además, aunque conserva las secuencias de localización nuclear y señales de exportación de ABL1, su localización primordialmente citoplasmática ha demostrado ser determinante para su acción transformante (52).

En general, BCR-ABL1 contribuye a la patogenia de la LMC mediante la potenciación de la supervivencia y la proliferación celular, la alteración de la circulación celular normal, y la inducción de inestabilidad genética. Dichas acciones pueden ser realizadas mediante modulación de la expresión génica a distintos niveles, transcripcional, traduccional o postraduccional. Este amplio potencial se explica por su capacidad de interacción con múltiples dianas que regulan distintas vías de señalización (53).

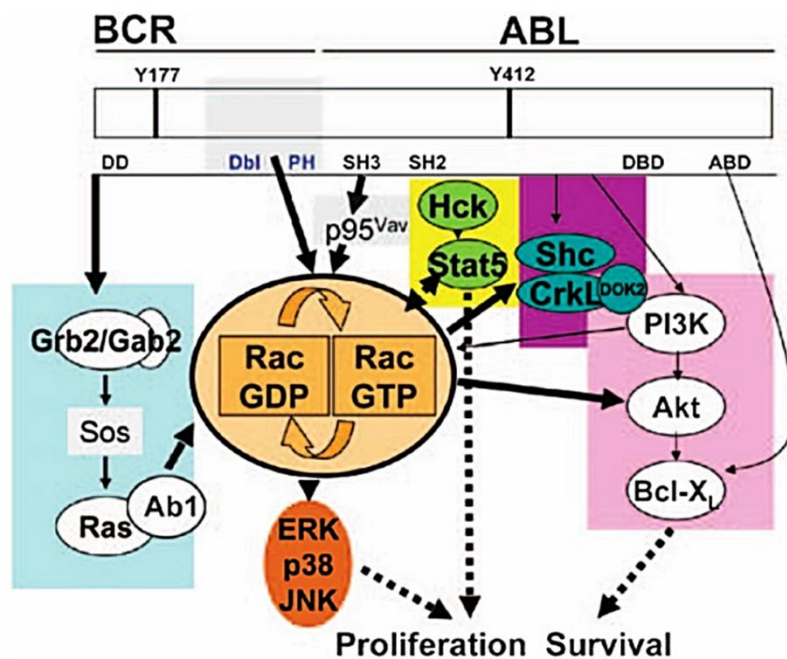
### 2.1. Vía de señalización de MAPK

Estas vías de señalización son las responsables de la transducción de señales a partir de receptores tirosina quinasa situados en la superficie de las células que responden a señales extracelulares (p. ej. factores de crecimiento) y desencadenan cascadas de fosforilación que promueven cambios en la expresión génica. Esos cambios son esenciales para el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular. El control de estas cascadas de fosforilación está regulado por proteínas quinasas como *mitogen-activated protein kinases (MAPK)*. Hay tres familias de MAPK que han sido profundamente caracterizadas y que incluyen *extracellular signal-regulated kinases 1 y 2 (ERK1/2)*, *c-Jun N-terminal kinase (JNK)*, y la familia de p38 MAPK (24, 38).

En la LMC, la vía de señalización MAPK mediada por ERK1/2 está constitutivamente activa. La proteína SHP2 es necesaria para la activación fisiológica de la vía RAS-ERK. En presencia de BCR-ABL1, esta proteína es reclutada por la proteína GAB2, permitiendo la activación de RAS por SHP2, o también puede ser activada por el complejo GRB2-SOS directamente (32,53). Además, la importancia de RAS en la patogénesis de la LMC ha sido demostrada mediante la expresión por *knock-in* condicional *in vivo* de una variante de RAS oncogénica, que desencadena una enfermedad mieloproliferativa (MPD) similar a la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) humana (54).

La subfamilia Rac de las Rho guanosina trifosfatasa también posee un papel principal en la oncogénesis mediada por BCR-ABL1. Como ya se ha comentado

anteriormente, la proteína de fusión posee un dominio de unión a Rac GTPasas, por lo que estas proteínas son dianas directas de BCR-ABL1 (55). Al respecto, se ha demostrado que los ratones modificados genéticamente para expresar *BCR-ABL1* desarrollan una MPD asociada a niveles basales altos de ERK1/2, JNK y p38-MAPK, que son eficazmente inhibidos cuando se eliminan Rac1 y Rac2, incrementando la supervivencia de los ratones. Esto indica que la activación de la señalización MAPK es dependiente de Rac1 y Rac2, y las convierte en dianas terapéuticas interesantes en la LMC (56) (**Figura 9**).



**Figura 9. Activación de las proteínas Rac GTPasas en la leucemia inducida por BCR-ABL1.** Los dominios Dbl y *pleckstrin homology* (PH) son los que tienen actividad intercambiadora de nucleótidos tipo guanina, que pueden activar directamente a las proteínas Rho GTPasas. El dominio SH3 activa a p95 Vav (Vav1). Los dominios Y177/Y412 son sitios de fosforilación. Dbl: *Rac GTPase exchange factor*; SH2/SH3: *Src homology domains*; DD: *dimerization domain*; DBD: *DNA-binding domain*; ABD: *actin-binding domain*. Tomada de Thomas *et al.* 2008 (55).

A parte de la activación de las proteínas Ras y Rac, la inactivación de reguladores negativos de la vía MAPK también se ha relacionado con la aparición de MPD. En concreto, JUNB es un regulador negativo que actúa *downstream* de JNK y que muestra funciones de control de la proliferación y la supervivencia, actuando como supresor tumoral en células mieloides. Experimentalmente, la eliminación de la expresión de JUNB en ratones desencadena una enfermedad tipo LMC. Además, también se han observado niveles reducidos de JUNB en células de pacientes con LMC (32,53,57).



Por último, la señalización de MAPK desencadena cambios de expresión génica que implican la activación de factores de transcripción. Para el caso de la LMC, se ha observado el incremento de la traducción de *MYC*, que a su vez fomenta la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular tales como las ciclinas D1 y D2, ciclina B1 o la quinasa dependiente de ciclina-4 (CDK4) entre otros (53,58).

### 2.2. Vía de señalización JAK/STAT

La vía de señalización de *Janus kinase (JAK)/ Signal transducer and activator of transcription (STAT)* es una ruta muy conservada evolutivamente. Su función es transducir señales extracelulares provenientes de citoquinas o factores de crecimiento que se unen a receptores sin actividad quinasa intrínseca, y que dependen de tirosina quinasas asociadas a su región citoplasmática (JAKs) para, finalmente, desencadenar cambios en la expresión de genes involucrados en procesos de inflamación, división y diferenciación celular (38, 42).

En la vía canónica, cuando el ligando se une a su receptor transmembrana, este oligomeriza permitiendo que las proteínas JAK asociadas se fosforilen mutuamente y, por tanto, se activen. Las proteínas JAK activadas fosforilan a los receptores de citoquina y crean sitios de unión para dominios tipo SH2, que están presentes en la familia de factores de transcripción STATs. Una vez unidas, las proteínas STATs son fosforiladas por las JAK, lo cual permite su dimerización y su translocación al núcleo, donde regulan la expresión de sus genes diana (53,59) (**Figura 10**).

El funcionamiento fisiológico de la vía es posible gracias a la acción de los distintos componentes de JAKs y STATs que muestran combinaciones específicas según los tejidos y los receptores involucrados en cada evento de señalización (59). Así, STAT1 y STAT2 intervienen en la señalización mediada por interferón (IFN); STAT3 puede ser activado principalmente por interleucina (IL)-6, IL-10, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); STAT4 se relaciona con la señalización IL-12 y de IL-23; STAT5A y STAT5B señalizan en respuesta a la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL), el factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y la eritropoyetina (EPO) y, por último, STAT6, que se asocia con IL-4 y IL-13 (59).

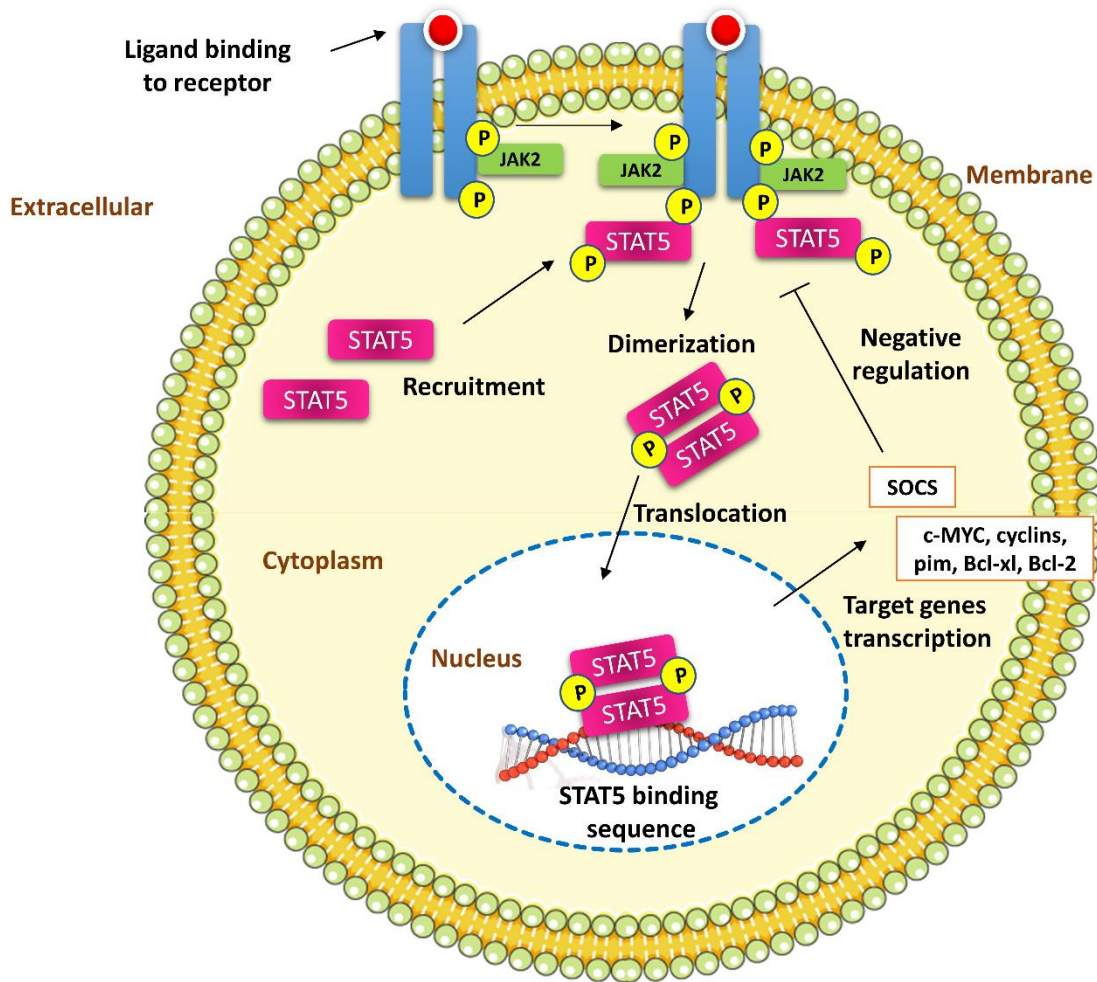


Figura 10. Vía de señalización JAK/STAT a nivel fisiológico. Adaptada de Recio *et al.* 2019 (59).

En condiciones fisiológicas, la regulación de la vía está estrictamente controlada, principalmente por mecanismos que inactivan a las proteínas STATs. Un mecanismo regulador clásico de la vía lo componen las proteínas de acción de tirosina fosfatasa tipo *Src-homology 2 domain (SH2)-containing phosphatase* (SHP-1) y *cluster of differentiation 45* (CD45), encargadas de defosforilar al receptor y a las proteínas JAK cuando cesa la unión con el ligando (59). También participan en la regulación negativa de la vía las *protein inhibitors of activated STAT* (PIAS), que impiden, directa o indirectamente, la unión de STAT al ADN, evitando su dimerización. Además, se han descrito otras familias de proteínas que regulan la señalización de la vía, entre las que se incluyen las *Signal transducing adaptor molecules* (STAM), las *Sprouty-related Ena/VASP homology 1-domain-containing proteins* (SPRED) y las proteínas *SPROUTY* (60). Sin embargo, los reguladores negativos de la vía más extensamente estudiados son las proteínas *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS). La familia consta de ocho

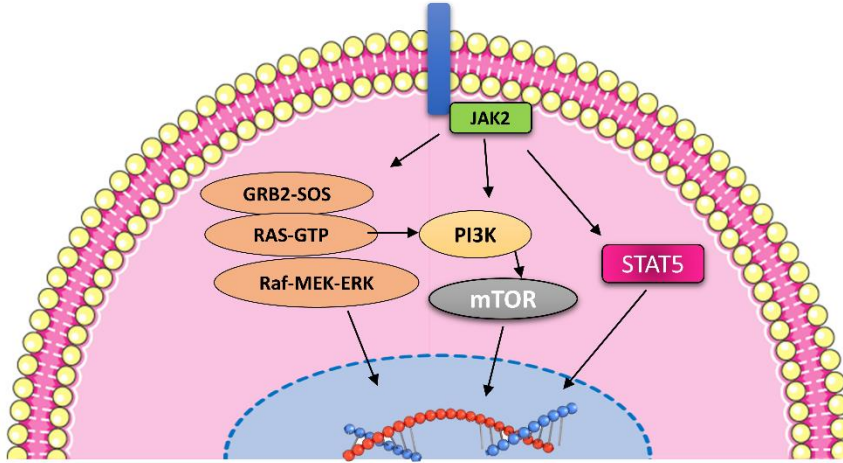
proteínas (SOCS1-SOCS7 y CIS), que forman parte de un mecanismo de retroalimentación o *feedback* negativo en el que las propias STATs activadas inducen la expresión de SOCS, que a su vez apagan la señal de transducción (61). Pueden desarrollar su actividad supresora mediante la inhibición de la actividad de las proteínas JAK; por competición con STAT por los sitios de unión a los receptores; o por el marcaje de proteínas de señalización para su degradación proteasómica mediante la caja SOCS con acción ubiquitina ligasa (62).

La hiperactivación de STAT ha sido ampliamente investigada y relacionada con la carcinogénesis. Específicamente, la activación de STAT5 es determinante en diversos cánceres hematológicos, pues controla la expresión de genes reguladores del ciclo celular, la supervivencia y la angiogénesis (63). Entre los múltiples factores que se ven desregulados por la influencia de BCR-ABL1, la señalización de STAT5 fue de las primeras en identificarse como una vía constitutivamente activa y necesaria para la supervivencia de las células leucémicas (64). Así, la inhibición de la actividad de STAT5 mediante expresión de su forma truncada causa reducción de la viabilidad y aumento de sensibilidad a los quimioterápicos en células BCR-ABL1 positivas (BCR-ABL1 +) (65). Además, Hoelbl *et al.* demostraron que la actividad de STAT3 y STAT5 es necesaria para la transformación inicial de células inducida por BCR-ABL1, pero de las dos, sólo STAT5 es imprescindible para el mantenimiento de la leucemia BCR-ABL1+ *in vivo* (66).

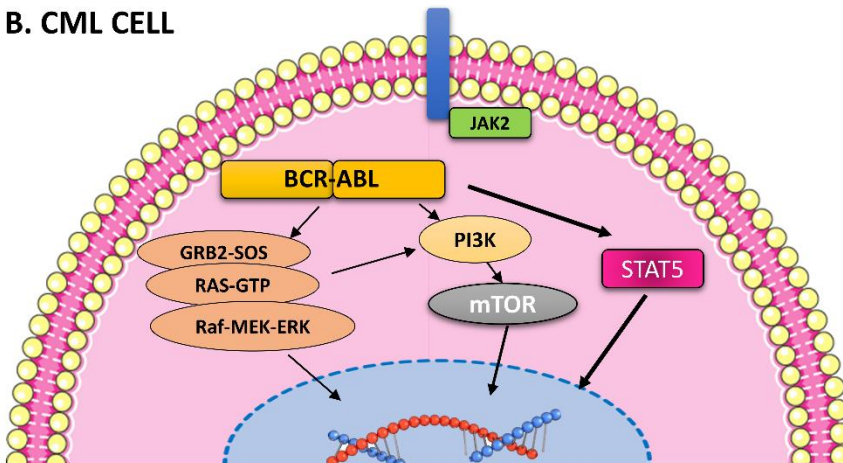
Tras estos descubrimientos, se planteó la hipótesis de que la hiperactivación de STAT5 estuviese mediada por la fosforilación de JAK2, como ocurre en la señalización por citoquinas. Para investigar esta hipótesis, Hantschel *et al.* utilizaron células de médula ósea de ratón transducidas con p210 BCR-ABL1 y p185 BCR-ABL1 para generar transformación mielóide y linfóide, respectivamente (67). El modelo permitía eliminar la expresión de JAK2 eficazmente por *knock-out* condicional. Estos experimentos demostraron que la presencia de p210 BCR-ABL1 es suficiente para generar la transformación de las células hematopoyéticas y mantener la progresión de la enfermedad tipo LMC. Por el contrario, ante la presencia de p185 BCR-ABL1 se necesitaba la expresión de JAK2 para iniciar la transformación, pero no para mantener la progresión de la leucemia linfóide *in vivo*. Además, Hantschel *et al.* comprobaron que la inhibición farmacológica específica de JAK2 no genera inhibición del crecimiento celular ni de la autofosforilación de p210 BCR-ABL1 en células que expresan BCR-ABL1 (67). Estos experimentos revelaron, por tanto, que la activación de JAK2 inducida por BCR-ABL1 no es necesaria para la fosforilación de STAT5 ni para la activación de las células

leucémicas, y por otro lado, que BCR-ABL1 debía ser capaz de fosforilar directamente la tirosina 694 de STAT5 (57, 60) (**Figura 11**).

**A. HEMATOPOIETIC STEM CELL**



**B. CML CELL**



**Figura 11. Señalización de STAT5 en una célula madre hematopoyética o en una célula de LMC con presencia del cromosoma Filadelfia. A.** En la célula madre hematopoyética los receptores de citoquinas se activan tras la unión de factores (p. ej. IL-3, GM-CSF) y JAK2 fosforila a STAT5 en la tirosina cercana al dominio SH2. STAT5 dimeriza y se transloca al núcleo donde promueve la expresión de genes implicados en proliferación y diferenciación celular. **B.** En la célula de LMC o (CML, Chronic Myeloid Leukemia) BCR-ABL1 fosforila a STAT5 en la misma tirosina cercana a SH2, e induce las mismas vías de señalización *downstream* pero de manera independiente de JAK2. Así, se activa la transcripción de genes anti-apoptóticos y pro-resistencia a los fármacos. Adaptada de Fabbro 2012 (64).

Durante algún tiempo, el mecanismo por el cual BCR-ABL1 activa a STAT5 era desconocido. Sin embargo, los experimentos realizados por Klejman *et al.* revelaron la participación de la proteína *hematopoietic cell kinase* (HCK) de la familia de las quinasas Src, como intermediaria entre la oncoproteína y STAT5, creándose así una vía (BCR-ABL1–HCK–STAT5) que culmina en la fosforilación de la isoforma STAT5B en el

residuo Y699 (68). Por otro lado, también se ha descrito que la fosforilación de STAT5A en la tirosina 692 es dependiente de BCR-ABL1 (69).

La contribución de STAT5 en la transformación maligna de la LMC puede explicarse en parte, por la inducción de la expresión de genes como la serina-treonina quinasa PIM1 (implicada en la progresión del ciclo celular) y de genes antiapoptóticos como *B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL)* o *Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1)*. En consecuencia, el eje de señalización BCR-ABL1–STAT5 es considerado una diana terapéutica válida contra la LMC. Numerosos estudios confirman la importancia de STAT5 en la transformación y la progresión leucémica, así como la eficacia de su inhibición en la regresión del cáncer. Prueba de ello, es la capacidad de producir leucemia de distintos linajes en ratones trasplantados con células de la médula ósea que expresan una forma de STAT5A constitutivamente activa (70). Además, la inhibición directa de la expresión de STAT5A y STAT5B por transfección con ARN pequeño de interferencia o *small interference RNA* (siRNA) es capaz de inducir apoptosis en células BCR-ABL1+ (71).

Nuestro grupo de investigación ha revisado en profundidad el papel de la señalización de STAT en la transformación maligna, y ha propuesto, junto con otros autores, que la inhibición de STAT5 puede ser una diana atractiva en el tratamiento de las NH (59). Como se ha comentado previamente, muchas NH son tratadas con TKIs, sin embargo, tienen limitaciones asociadas como la generación de toxicidad o resistencia. Para solucionar estos problemas, la inhibición del factor de transcripción que se encuentra *downstream* de esas quinasas sobreactivadas puede ofrecer una alternativa interesante (59). Existen diversos mecanismos por los que se puede inhibir STAT5, entre ellos, fosfopéptidos, peptidomiméticos, inhibidores moleculares no peptídicos de pequeño tamaño o NMEs, inhibidores que modulan la interacción STAT-ADN y oligonucleótidos (p. ej. nucleótidos anti sentido, o ARN interferente (iRNA)) (72). Un ejemplo de NMEs es el Benzyl-2-(benzyloxy)-4-(2-((N-(4-chlorobenzyl)-2,3,4,5,6-pentafluorophenyl) sulfo-namido)-N-(3,5-di-tert-butylbenzyl) acetamido) benzoate, que bloquea de forma potente el dominio SH2 de STAT5, reduciendo la fosforilación de STAT5, así como la transcripción de los genes diana de STAT5 (*MYC* y *Mcl-1*), dando lugar a la inducción de la apoptosis en células de LMC. De hecho, nuestro grupo de investigación ha descubierto nuevos compuestos derivados e híbridos de naftoquinonas con actividades biológicas antitumorales que se asocian con una potente inhibición de STAT5 y de sus genes diana (*MYC* y *PIMI*), y reducen la interacción de STAT5 con el ADN, junto con

inducción de citotoxicidad, parada del ciclo o activación de apoptosis en células de LMC (73,74).

### 2.3. Vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR

Los receptores con actividad tirosina quinasa señalizan, aparte de por la ruta de las MAPK, por la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT. En ella, se produce un fosfolípido (fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato) (PIP3) por parte de la PI3K que sirve como segundo mensajero para numerosas dianas, incluyendo a la serina-treonina quinasa AKT (53,75). Esto genera una serie de cascadas de señalización implicadas en el crecimiento, la proliferación, la supervivencia, la movilidad celular o la autofagia y, por tanto, su desregulación promueve la progresión del cáncer (75).

En la LMC, la formación del complejo entre BCR-ABL1 y GAB2 recluta y activa a PI3K independientemente de las señales de crecimiento. La activación constitutiva de PI3K resulta indispensable para el inicio de la leucemia y el crecimiento de las células Ph<sup>+</sup>. Así lo demostraron Skorski *et al.* cuando observaron el requerimiento del dominio SH2 de BCR-ABL1 para producir la activación de PI3K, y posteriormente, de AKT (76). También, demostraron que la inhibición farmacológica de PI3K reducía la capacidad de formar colonias por parte de células BCR-ABL1<sup>+</sup>. Además, en experimentos realizados con mutantes negativos dominantes de AKT se ha descubierto que AKT juega un papel relevante en la transformación mediada por el cromosoma Ph en células madre *in vitro* y el desarrollo de leucemia en ratones (76). En su conjunto, estos experimentos demuestran el papel indispensable de la vía PI3K/AKT en la malignidad de la LMC.

En este contexto, los mecanismos moleculares que conducen a un crecimiento celular y a una proliferación exacerbadas se deben, en gran medida, a la activación por parte de AKT de sus efectores *downstream*, entre ellos *mammalian target of rapamycin* (mTOR), una serina-treonina quinasa que estimula la síntesis proteica y la biogénesis de los ribosomas, además de regular los niveles de nutrientes, de energía y del estado redox de la célula mediante formación de complejos de múltiples péptidos llamados mTORC1 y mTORC2 (55,56).

A nivel fisiológico, la regulación de la traducción por parte de mTORC1 es dependiente de factores de crecimiento y consiste en la fosforilación de un inhibidor de la traducción, el *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1). Una vez fosforilado, 4E-BP1 se disocia del *eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E) y lo

libera, permitiéndole asociarse a otras subunidades para formar un complejo llamado eIF4F, necesario para la iniciación de la traducción. Además de 4E-BP1, las quinasas S6 (S6K1 y S6K2) también son dianas *downstream* de mTOR. Por su parte, S6K no interviene en la traducción directamente, sino que lo hace a través de sus efectores *downstream* como la proteína ribosómica S6. El papel de mTORC2 ha sido menos estudiado, pero se conocen sus funciones en supervivencia celular y en la reorganización del citoesqueleto (53). En la LMC ambos complejos están activados y actúan promoviendo el crecimiento y la supervivencia de las células leucémicas que expresan BCR-ABL1. De hecho, el uso de un inhibidor alostérico del componente mTORC1 en células K562 provoca una reducción importante de la viabilidad y un incremento de células en las fases G0/G1 del ciclo celular (79). Asimismo, la supresión farmacológica del dominio catalítico común en ambos complejos (mTORC1 y mTORC2) por un potente inhibidor (OSI-027) provoca la inducción de apoptosis de manera eficaz en células leucémicas Ph+ (80).

Además de las funciones inductoras de proliferación, AKT está implicada en la señalización antiapoptótica pues se encarga de inactivar mediante fosforilación a *Bcl-2-associated agonist of cell death* (BAD), que en este estado, es secuestrado por las proteínas 14-3-3, impidiendo que BAD interactúe con miembros antiapoptóticos de la familia *B cell lymphoma 2* (BCL-2) (53).

En definitiva, BCR-ABL1 promueve la transformación de las células hematopoyéticas, principalmente mediante la regulación de vías de señalización que conllevan la activación constitutiva de RAS, PI3K y STAT5. Estos factores desencadenan la sobreexpresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular (p. ej. ciclina D1) o en la evasión de la apoptosis (p. ej. por influencia de la señalización de AKT) (36,53).

### **3. Terapia contra la LMC**

#### **3.1. Evolución**

La evolución histórica de la terapia contra la LMC representa uno de los mayores avances de la medicina moderna basada en hallazgos moleculares (37,81). Los primeros tratamientos datan de finales del siglo XIX y eran de uso paliativo, como la administración de trióxido de arsénico al 1% (solución de Fowler), que era común en enfermedades sanguíneas. En la leucemia mieloide, este tratamiento se asociaba con una disminución del número de linfocitos y eritrocitos por milímetro cúbico acompañado de

una reducción del tamaño del bazo mediante mecanismos entonces desconocidos (82,83). Además, este tratamiento se complementaba con la irradiación del bazo, y, dicha combinación, producía beneficios sintomáticos, pero no aumentaba la supervivencia de los pacientes (84). Estos tratamientos constituyeron la única opción contra la LMC hasta que se introdujeron los agentes alquilantes como el busulfán, en 1953, o la hidroxiurea, en 1963. Esta última tenía menos efectos secundarios asociados y cierta capacidad de prolongar la supervivencia de los pacientes (64, 67, 80).

A finales de 1970, se comenzó a aplicar el trasplante alogénico de médula ósea alcanzándose los primeros casos de curación (86). El procedimiento consiste en reducir las células madre de la médula ósea del paciente con radio o quimioterapia y, posteriormente, transferirle las células madre sanas de un donante con HLA compatible. Este proceso es factible en una baja proporción de pacientes por la complejidad de encontrar donantes compatibles y por la potencial activación de una respuesta inmune descontrolada (enfermedad injerto contra huésped) asociada con una alta tasa de mortalidad (87). En la actualidad, es un tratamiento que se utiliza como última opción en pacientes que reúnen ciertas características, como un bajo rango de edad (35,37).

En la misma época, se implantó el uso del IFN- $\alpha$ , que se asociaba con casos de remisión citogenética completa (CCR) (menos del 1% de las células en la médula ósea poseen el cromosoma Ph) en un 10-15% de pacientes, normalmente jóvenes, y aumentaba la supervivencia media en seis años. Aquellos pacientes que alcanzaban CCR, no experimentaban recaídas durante 10 años. Estos beneficios se relacionaron con la capacidad del IFN de modular el sistema inmune mediante generación de linfocitos T citotóxicos contra *pathogenesis-related protein 1* (PR1), un péptido sobreexpresado en células de LMC. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de acción exacto del IFN. A pesar de producir ciertas mejoras en la situación general de los pacientes, este tratamiento también desencadenaba efectos secundarios muy graves, forzando su interrupción en un número elevado de casos (37,81,88). En 1999, el uso del IFN acababa de ser recomendado por la ASH cuando se dio a conocer la posibilidad de inhibir la activación aberrante de la tirosina quinasa BCR-ABL1 (81).

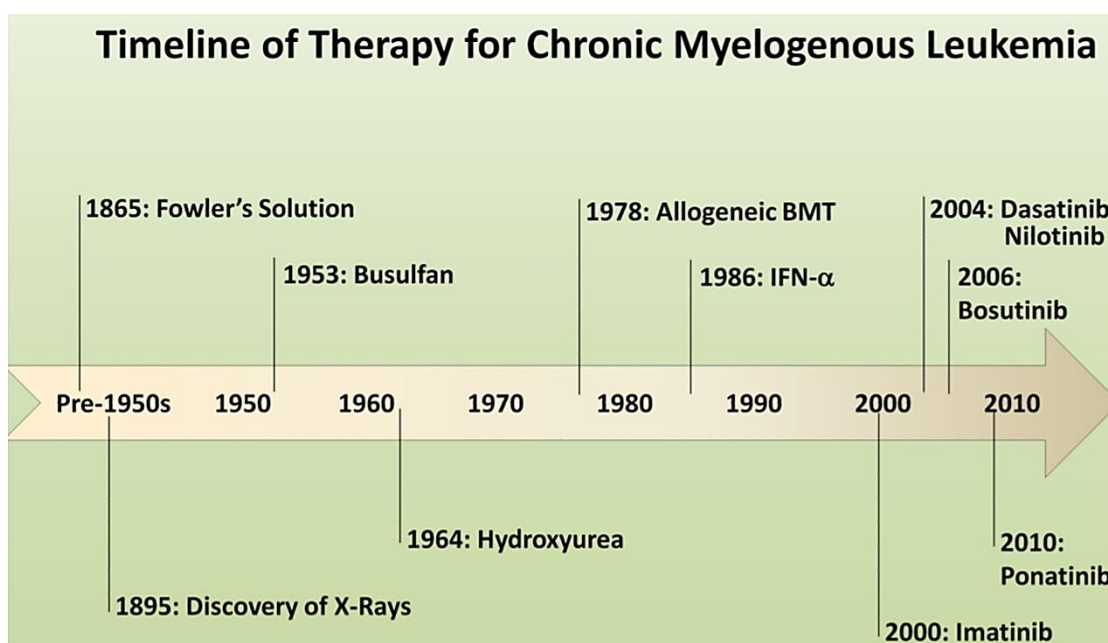
En 1980, el gen *ABL1* fue aislado a partir del virus de la leucemia murina de Abelson, que codificaba una proteína con actividad tirosina quinasa (v-ABL). Este hecho cobró importancia cuando se descubrió que el gen homólogo humano de *ABL1* estaba presente en la región correspondiente al cromosoma 9 dentro del cromosoma Ph. Experimentos posteriores permitieron establecer una relación causal entre la actividad



desregulada de la oncoproteína de fusión BCR-ABL1 y la oncogénesis de la LMC. Por lo que encontrar inhibidores específicos de la actividad quinasa de ABL1 se convirtió en un objetivo apremiante (81).

En 1990, se investigaron distintos tipos de TKIs para evaluar su potencial como terapia contra la LMC (89). Su mecanismo de acción consiste en competir con el sustrato de la quinasa, el adenosín trifosfato (ATP), suprimiendo la actividad quinasa de BCR-ABL1 a nivel proteico (37). Los ensayos clínicos con el IM (en aquel momento STI571) comenzaron en 1998 y tuvieron resultados tan impresionantes que fue aprobado como medicamento para la LMC en el año 2000 y comercializado por Novartis con el nombre de Imatinib Mesilato. La llegada de los TKIs supuso una revolución en la terapia de la LMC, y de hecho, sigue siendo el tratamiento de referencia utilizado en la actualidad (37,81). La tasa de supervivencia de los pacientes en CP-LMC pasó de un 20% (antes del 2001), a un 87% (en la actualidad), con una esperanza de vida similar a la de personas sanas de la misma edad (37).

Sin embargo, el incremento de casos de resistencia e intolerancia al IM propició el desarrollo de TKIs de segunda (2GTKI) y tercera generación (3GTKI) que ofrecieran una alternativa como tratamiento de primera línea o como terapias de rescate (90) (**Figura 12**).

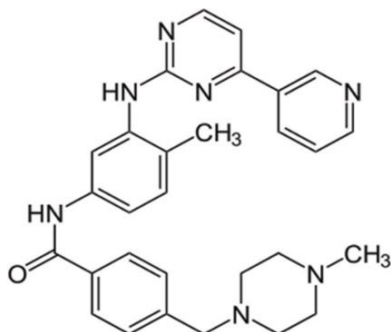


**Figura 12.** Línea temporal del desarrollo de terapias frente a la leucemia mieloide crónica. Tomada de Santos *et al.* 2011 (83).

### 3.2. Situación actual y limitaciones

Los tratamientos de primera línea para la LMC aprobados por la FDA y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) son TKIs de primera (imatinib (Glivec®, Novartis)), y segunda generación (dasatinib (Sprycel®, Bristol-Myers Squibb), nilotinib (Tasigna®, Novartis) y bosutinib (Bosulif®, Pfizer)) (35). También se ha aprobado el uso de un TKI de tercera generación, Ponatinib (Iclusig®, Takeda/Incyte), en caso de pacientes con la mutación BCR-ABL1<sup>T315I</sup> o con resistencia a dos o más TKIs. Debido a esta variedad de opciones, la elección de la terapia para cada paciente se realiza teniendo en cuenta la eficacia, la tolerabilidad, la toxicidad y los costes del fármaco (35).

Atendiendo a la estructura química del IM, este se define como una 2-fenilaminopirimidina (**Figura 13**) con biodisponibilidad oral que posee actividad inhibitoria contra todas las ABL1 quinasas (incluyendo BCR-ABL1, c-ABL, v-ABL y TEL-ABL). Sin embargo, también actúa sobre otras quinasas como el receptor de células madre c-Kit, los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\alpha$  y  $\beta$  (PDGFR) y *Abelson-related gene* (ARG) (36,91).



**Figura 13.** Estructura química del imatinib mesilato. Tomada de PubChem (CID 5291).

Antes del descubrimiento del IM, la supresión farmacológica de las proteínas quinasas se consideraba una opción complicada debido a la alta conservación evolutiva de sus secuencias. Sin embargo, la plasticidad estructural de las mismas ha demostrado que su inhibición selectiva es posible. En este sentido, el IM es un TKI de “tipo II”, pues contacta con el sitio de unión del cofactor ATP y con el sitio adyacente o alostérico, disponible sólo cuando la quinasa se encuentra en conformación catalíticamente inactiva. En este caso, el motivo Asp-Phe-Gly o (DFG) situado en el dominio N-terminal se coloca hacia fuera o “*out*”, en relación con su conformación catalíticamente activa, donde se dispone hacia adentro “*in*”. En cambio, los TKIs de tipo I, contactan con el sitio de unión

al ATP, pero no penetran en el bolsillo alostérico y, por tanto, no dependen de la conformación específica de la quinasa (92).

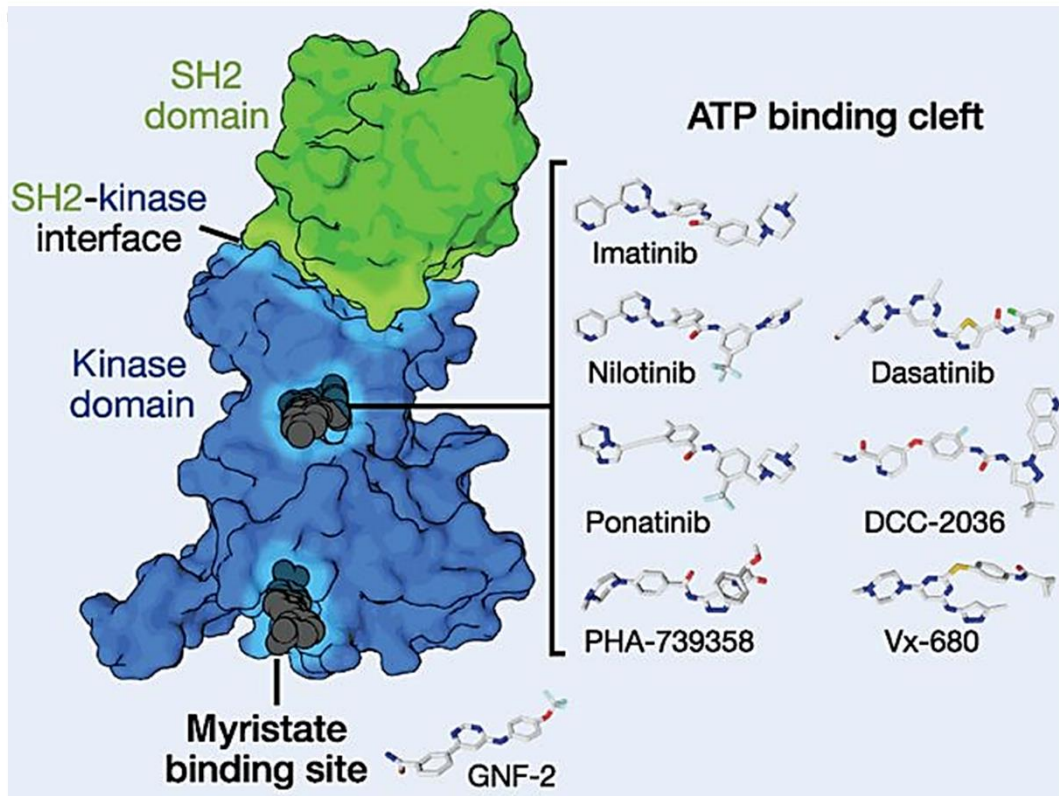
Normalmente, los inhibidores de tipo II se asocian con un mayor grado de selectividad hacia las quinasas humanas que los de tipo I. La razón de este hecho es objeto de investigación, pero se ha sugerido que ciertas quinasas poseen una dificultad intrínseca de adoptar la conformación “DFG-out”, reduciendo el espectro de dianas disponible. En este sentido, el residuo *gatekeeper*, llamado así porque está estratégicamente posicionado de manera que controla el acceso al bolsillo de unión al ATP, ha sido propuesto como un factor influyente en la capacidad de adquirir dicha conformación (18,92). De hecho, se ha comprobado experimentalmente que la treonina (Thr) presente en el residuo *gatekeeper* de ABL1 es necesaria para la estabilización de la unión del IM por puentes de hidrógeno (93).

Estudios posteriores evidenciaron que ciertos pacientes que habían dejado de responder al IM poseían una variante de BCR-ABL1 con una sustitución de la Thr por una isoleucina (Ile) en el residuo *gatekeeper*. Esta mutación llamada BCR-ABL1<sup>T315I</sup> contribuye a la resistencia hacia el IM no sólo impidiendo la formación del puente de hidrógeno estabilizador, sino mediante impedimento estérico, lo que la convierte en una de las mutaciones más graves en la LMC (92). La aparición de esta y otras mutaciones en el dominio quinasa (KD) de la oncoproteína impulsaron el desarrollo de los 2GTKI (90).

Brevemente, al IM le siguió el dasatinib, que se une a BCR-ABL1 y a otras dianas como a las quinasas de la familia de Src en su conformación activa o inactiva (TKI de tipo I). Posteriores estudios dieron lugar al nilotinib (TKI de tipo II), con una mayor afinidad de unión y selectividad por BCR-ABL1. Por último, el bosutinib (TKI de tipo I), con un espectro de dianas más amplio, incluye a las proteínas tirosina quinasas Src, ABL1 y TEC, así como a las proteínas serina quinasas *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Gamma* (CAMK2G) y *Sterile-20* (STE20) (60). Los 2GTKIs han mostrado mayor potencia frente a BCR-ABL1 que el IM, así como una alta eficacia en pacientes que desarrollan mutaciones en el KD de BCR-ABL1 mientras reciben IM. Sin embargo, los 2GTKI siguen teniendo limitaciones como la aparición de resistencia o intolerancia, y son ineficaces contra la mutación BCR-ABL1<sup>T315I</sup> (90).

El único 3GTKI aprobado contra la LMC es el ponatinib. Este TKI de tipo II, se considera el más potente de los TKIs disponibles en clínica, y también es el único eficaz en pacientes con la mutación BCR-ABL1<sup>T315I</sup> (35). Otras dianas conocidas del ponatinib son las Src quinasas y algunos componentes de la familia de receptores tirosina quinasas

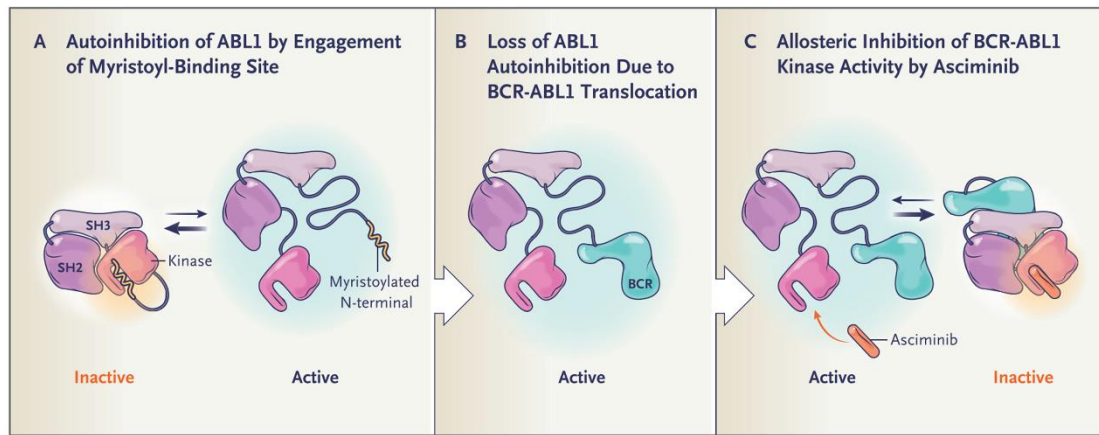
(KIT, RET, PDGFR, VEGFR, DDR, EPH, TRK, y FGFR), por lo que se considera de selectividad media (94). Aunque todos los TKIs aprobados hasta ahora se unen al KD de BCR-ABL1, el tipo de unión que establece el ponatinib (un triple enlace carbono-carbono) permite la unión del compuesto al KD incluso en presencia del voluminoso aminoácido de Ile en el residuo *gatekeeper* con la mutación BCR-ABL1<sup>T315I</sup> (94) (**Figura 14**).



**Figura 14. Sitios de unión en BCR-ABL1.** Representación de la superficie del dominio quínasa (azul), del dominio SH2 (verde) y de la interfase entre ambos dominios de BCR-ABL1. Los inhibidores de tirosina quínasa de primera (imatinib), segunda (nilotinib y dasatinib) y tercera (ponatinib y DCC-2036) generación y, los inhibidores de Aurora quinasas (PHA-739358 y Vx-680) se unen al bolsillo de unión del ATP. Además, el inhibidor alostérico GNF-2 (3K5V) se une al sitio de unión del Miristato. Tomada de Hantschel *et al.* 2012 (94).

El hecho de que todos los TKIs disponibles se unan al KD de BCR-ABL1 en la hendidura del ATP hace que sea probable que sigan apareciendo nuevos mecanismos de resistencia para evadir esta presión. De hecho, se ha descubierto recientemente que la presencia de más de una mutación en el mismo alelo de *BCR-ABL1* genera resistencia frente a todos los TKIs aprobados (94,95).

En este sentido, muy recientemente se ha aprobado un inhibidor alostérico (asciminib) que reconoce el sitio de unión del miristoil en BCR-ABL1, permitiendo la inhibición eficaz de la quinasa con un mecanismo distinto al de todos los TKIs previos, que es el bloqueo de la oncoproteína en su conformación inactiva por recuperación del mecanismo regulador negativo alostérico de ABL1 (92, 95) (**Figura 15**).



**Figura 15. Modulación alostérica en BCR-ABL1.** A. Representación de la forma auto-inhibitoria de ABL1; B. Pérdida de la capacidad auto-inhibitoria de BCR-ABL1; C. Inhibición alostérica de BCR-ABL1 por el asciminib. Tomada de Hughes *et al.* 2019 (96).

Una limitación fundamental común en todos los TKIs es que no proporcionan una cura para la LMC. La interrupción del tratamiento con IM da lugar a recaída molecular y citogenética en la mayoría de los casos (36). De los pacientes en CP que reciben IM, tan solo alrededor de un 10% alcanza una respuesta molecular completa (ausencia de BCR-ABL1 detectado por RT-PCR), y de estos, aproximadamente la mitad puede parar el tratamiento con IM sin recaída (97). Por esta razón los pacientes deben tomar la medicación durante toda su vida, lo cual ocasiona altos costes económicos y falta de adherencia al tratamiento, que puede desencadenar la progresión de la enfermedad y la aparición de resistencia (35,98).

Normalmente, los efectos secundarios y la toxicidad asociada a los TKIs no son el motivo principal de interrupción de los ensayos clínicos o del tratamiento de los pacientes. Por un lado, los efectos adversos hematológicos más comunes (neutropenia, trombocitopenia y anemia) ocurren durante el primer periodo de tratamiento, y rara vez causan complicaciones. Por otro lado, todos los TKIs tienen cierta toxicidad asociada, y por ello, esta se debe tener en cuenta para adaptar el tratamiento según las comorbilidades del paciente. Entre ellas, destaca la toxicidad cardiovascular asociada al ponatinib registrada en hasta un 30% de los pacientes tratados y con alto riesgo de obstrucción

arterial. El nilotinib también tiene cierto riesgo de generación de obstrucción arterial, seguido por bastante distancia de los demás TKIs. Además, el dasatinib puede generar derrame pleural con una incidencia acumulada de un 37% en cinco años (35).

Recientemente, se ha incidido en evitar la generación de toxicidad en los órganos a largo plazo y en identificar estrategias que permitan alcanzar una remisión de la enfermedad sin tratamiento (*treatment free remission*). Sin embargo, esta opción aún suscita controversia ya que no descarta la posibilidad de recaída y genera malestar psicológico en una proporción importante de los pacientes (35,99,100). Además, en países en vías de desarrollo, el objetivo principal del tratamiento sigue siendo la supervivencia del paciente (35).

#### **4. Resistencia a los TKIs**

A pesar de los avances en la terapia contra la LMC, aún muchos pacientes experimentan progresión de la enfermedad. Este problema se incrementa con el uso secuencial de los TKIs, que producen una reducción de la probabilidad de respuesta al tratamiento y una supervivencia general inferior. Se estima que en cinco años, el 30-50% de los pacientes interrumpe el tratamiento con IM, de los cuales un 5-7% lo hacen por intolerancia y un 15-20% debido a resistencia (101).

El tipo de resistencia al IM que desarrollan los pacientes puede distinguirse entre primaria (también llamada refractaria), en la cual muestran falta de respuesta a este TKI desde el comienzo de la terapia, o secundaria (también llamada resistencia adquirida) que se define como la progresión de la enfermedad tras una respuesta inicial al tratamiento (57,102). Además, la resistencia puede ser definida por características hematológicas (falta de normalización de las poblaciones celulares en sangre periférica), citogenéticas (persistencia del cromosoma Ph), o moleculares (persistencia del transcrito BCR-ABL1 detectado por RT-PCR) (57).

Fundamentalmente, se considera que la generación de resistencia puede ser consecuencia de la interacción de una serie de factores como la adherencia al tratamiento, la biodisponibilidad, farmacodinámica, cambios genéticos, mutaciones en el KD de BCR-ABL1, o una combinación de los mismos (57). En cuanto a la categorización de los mecanismos que causan resistencia a TKIs podemos distinguir entre factores intrínsecos de las células leucémicas y factores extrínsecos (53).

### **4.1. Mecanismos de resistencia intrínsecos de células de LMC**

Por una parte, los factores intrínsecos son mecanismos que pueden ser dependientes de BCR-ABL1 (como la generación de mutaciones en el KD que impiden la unión de TKIs) o independientes (como la activación de las Src quinasas, las modificaciones en la actividad de bombas influx/efflux y la resistencia intrínseca de las células madre hematopoyéticas de LMC).

#### **4.1.1. Mecanismos dependientes de BCR-ABL1**

Los eventos que dan lugar a la sobreexpresión de BCR-ABL1 parecen ir asociados a fases avanzadas de la enfermedad y pueden ser ocasionados por falta de adherencia al tratamiento (18). Por su parte, las mutaciones detectadas en el KD de la oncoproteína son más usuales en los pacientes que ya han comenzado el tratamiento con IM y que, por tanto, tendrían una resistencia secundaria al IM (57).

##### **4.1.1.1. Sobreexpresión de BCR-ABL1**

El aumento de la proteína BCR-ABL1 asociado a un incremento de los niveles del transcrito *BCR-ABL1* fue descrito por primera vez en líneas celulares resistentes a IM (como LAMA84-R y AR230-R), que no poseían mutaciones en el KD (103). Posteriormente, la amplificación de *BCR-ABL1* fue detectada por primera vez en la clínica en 3 de 11 pacientes en BP-LMC o LLA tipo Ph+ que habían desarrollado resistencia al IM (104).

El mecanismo de resistencia consiste en un incremento de los niveles proteicos de BCR-ABL1 que propicia la superación del efecto del TKI que entra a la célula por una cuestión de masa-efecto. Este hecho, que se asocia con fases más avanzadas de la enfermedad, puede ser contrarrestado con el uso de TKIs más potentes (18). En cuanto al mecanismo de sobreexpresión, es probable que ocurra a nivel transcripcional y postranscripcional ya que se han descrito niveles incrementados de la oncoproteína en ausencia de amplificación del gen *BCR-ABL1* (53). Aunque el porcentaje de pacientes con sobreexpresión de BCR-ABL1 es bajo, se ha sugerido una conexión entre la amplificación de *BCR-ABL1* y la aparición de mutaciones en este mismo gen. Dicha idea surge de investigar las células de LMC CD34+, que expresan altos niveles de *BCR-ABL1* siendo notoriamente menos sensibles al IM, dando lugar a subclones resistentes que

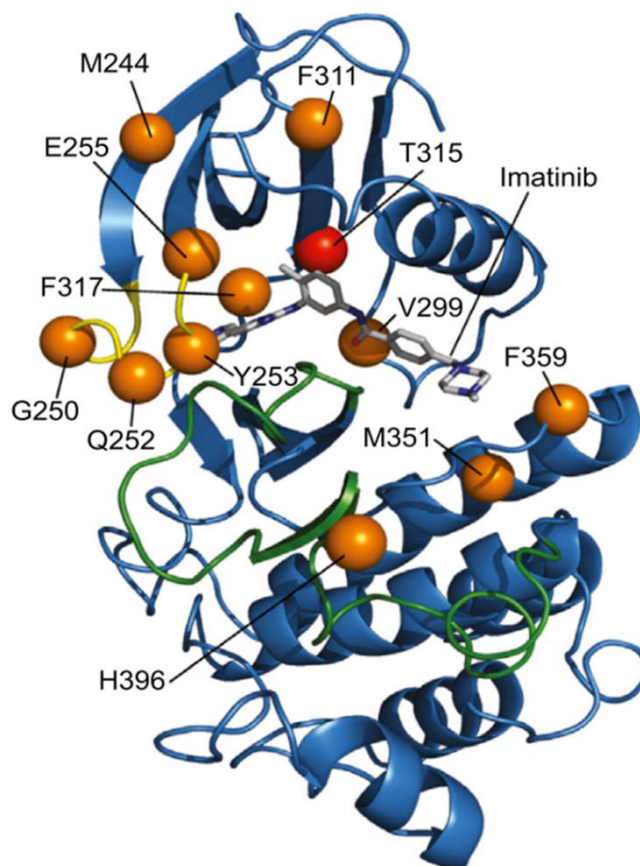
desarrollan mutaciones mucho más rápido que otras células con menor expresión de *BCR-ABL1* (57).

### 4.1.1.2. Mutaciones en BCR-ABL1

Las mutaciones en el KD de BCR-ABL1 son más frecuentes en pacientes con resistencia adquirida (18,53,57). No obstante, estas alteraciones genéticas pueden ser detectadas en los pacientes antes de la iniciación de la terapia con TKIs, por lo que se ha sugerido que la presión selectiva de los inhibidores permite a estos subclones celulares expandirse y superar progresivamente a las células sensibles al tratamiento (105). Actualmente, se estima que un tercio de los pacientes resistentes a TKIs en CP poseen mutaciones en el KD de BCR-ABL1, proporción que asciende a dos tercios en pacientes en AP y BP (35).

La mutación en el residuo *gatekeeper* BCR-ABL1<sup>T315I</sup> fue la primera en ser descubierta en pacientes en BP que habían dejado de responder a la terapia con IM (104). Desde entonces, se han identificado hasta 50 *hotspots* con mutaciones distintas detectadas mediante secuenciación del KD de la oncoproteína (18). Las mutaciones observadas con mayor frecuencia en la clínica son aquellas que se localizan en la región “P-loop” que abarca los residuos 244 al 255 del KD y que sirven como zona de unión para los motivos de fosfato del ATP. Otro conjunto de mutaciones suele encontrarse en la región “A-loop” (residuos 381 a 402), que es un elemento clave en la regulación de la quinasa ABL1. De hecho, mutaciones en esta región impiden que la quinasa adopte la conformación inactiva, a la cual se une el IM. El sitio catalítico de BCR-ABL1 (residuos 350 a 363) también ha registrado múltiples mutaciones. Además, en fases avanzadas de la LMC, las mutaciones suelen localizarse en ciertas áreas del KD afectando a residuos específicos como Q253, Y253, E255, T315, E459, y F486 (56,106) (**Figura 16**).





**Figura 16. Mutaciones en el dominio quinasa de ABL1 asociadas con resistencia a imatinib.** El loop de activación se representa en verde, el loop de unión a fosfato en amarillo y las mutaciones se representan como esferas naranjas (excepto, T315I simbolizada como una esfera roja). La entrada de PDB es 2HYY. Tomada de Zabriskie *et al.* 2014 (106).

Conviene aclarar que la presencia de mutaciones en BCR-ABL1 no siempre se asocia con resistencia al IM en la clínica, ya que las diversas mutaciones pueden tener distinta capacidad de transformación (107) y de alteración de la sensibilidad al IM (108). Gracias a experimentos *in vitro*, que posteriormente han sido corroborados por la experiencia clínica, se ha determinado que la aparición de mutaciones asociadas al tratamiento con 2GTKI es menos frecuente y de menor espectro, siendo la mayoría no coincidentes entre ellas, con la excepción de la mutación BCR-ABL1<sup>T315I</sup> (109).

#### 4.1.2. Mecanismos independientes de BCR-ABL1

Según crecientes evidencias científicas, los mecanismos independientes de BCR-ABL1 juegan un papel importante en la generación de resistencia a TKIs, y es necesario tenerlos en cuenta para desarrollar terapias potencialmente curativas para la LMC.

### 4.1.2.1. Absorción intracelular del IM

La resistencia contra el IM también puede ocurrir como resultado de una baja disponibilidad intracelular del fármaco, y a su vez, la cantidad del TKI que entra a la célula diana depende del equilibrio entre la importación y la exportación celular (110). Las alteraciones en los niveles de los transportadores celulares, normalmente una disminución de la actividad y/o de los niveles de las bombas importadoras (influx) y un aumento de la actividad y/o de los niveles de las bombas exportadoras (efflux), se asocia con la resistencia primaria (18).

Las bombas exportadoras, como por ejemplo la *P-glycoprotein* (Pgp o MDR1) codificada por el gen *ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1 (ABCB1)*, han sido relacionadas con el desarrollo de resistencia a TKIs en líneas celulares como es LAMA-84R (111). Sin embargo, en otras líneas celulares como K562, la expresión de MDR1 no parece influir en la sensibilidad al IM (112). También se ha publicado que ciertos polimorfismos de *ABCB1* pueden predecir la respuesta al IM en los pacientes (113), aunque es un tema en el que aún no hay un consenso claro, probablemente por la heterogeneidad en las poblaciones de pacientes y por el bajo tamaño muestral analizado (18). También los niveles de expresión y la función del *human organic cation transporter 1 (hOCT1)* intervienen en la importación del IM, y se han asociado a diferentes respuestas al tratamiento por parte de los pacientes (110).

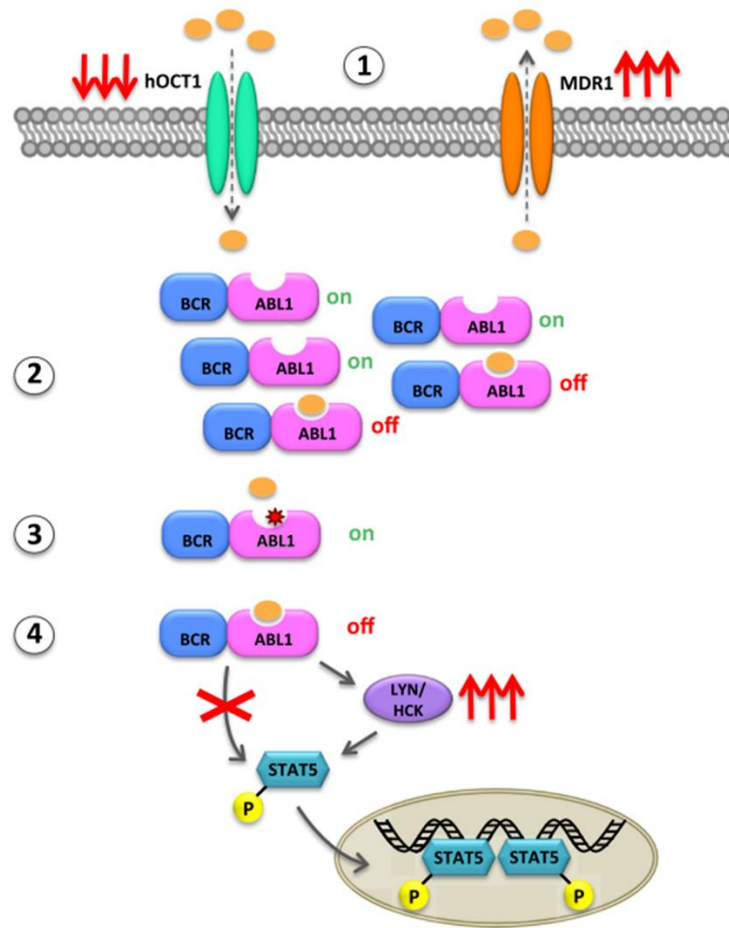
### 4.1.2.2. Sobreexpresión de las quinasas de la familia Src

Esta familia de quinasas (Fyn, Src, Yes, Blk, Fgr, Lck, Yrk, Hck, Lyn) son proteína quinasas de tipo *non-receptor* que tienen la capacidad de regular el crecimiento o la migración celular, entre otras funciones. Además, se consideran protooncogenes porque sufren mutaciones frecuentemente y son sobreexpresadas en cáncer dando lugar a una proliferación descontrolada (114).

Como se ha comentado anteriormente, BCR-ABL1 es capaz de activar a miembros de Src como Lyn, Hck, y Fgr. Tras su activación, Hck activa a STAT5, que a su vez induce la expresión de genes, entre ellos la ciclina D1, necesaria para la progresión del ciclo celular de fase G1 a S (57). Sin embargo, Donato *et al.* describieron cómo las células K562 resistentes a IM generadas *in vitro* (K562-R) eran independientes de BCR-ABL1 en cuanto a su proliferación y supervivencia celular. En estos experimentos, aunque la actividad quinasa y la activación por fosforilación de BCR-ABL1 era reducida

por el IM, no se producía una alteración de la proliferación celular ni de la supervivencia de K562-R. En cambio, demostraron que existía sobreexpresión y activación de Lyn, y que cuando esta era inhibida, se reducía la supervivencia celular de K562-R, pero no de la línea parental K562. Este hallazgo fue respaldado con el descubrimiento de altos niveles de Lyn en pacientes de LMC en fases avanzadas. Estos estudios sugieren que el mecanismo de sobreexpresión de Src está asociado a la generación de resistencia adquirida al IM (115).

No obstante, el papel de la familia de quinasas Src en la aparición de resistencia a TKIs es un tema controvertido, ya que no se ha encontrado relación directa entre ellas y la progresión de la enfermedad en otra serie de experimentos. Por ejemplo, el hecho de que la eliminación de Src quinasas no impida la generación de malignidad en células de LMC, o que el dasatinib (inhibidor de Src quinasas) haya supuesto un fracaso relativo en el tratamiento de esta patología, contribuyen a esta controversia (18,60) (**Figura 17**).



**Figura 17. Principales mecanismos de resistencia a la inhibición de BCR-ABL1.** La resistencia puede deberse a (1) sobreexpresión/ incremento de la actividad de las bombas de eflujo MDR1, y/o reducción de la expresión o de la actividad de las bombas de influx (hOCT1); (2) amplificación genética y proteica de BCR-ABL1 que dificulta la inhibición por las concentraciones de TKI alcanzadas en plasma; (3) mutaciones puntuales en el dominio quinasa de BCR-ABL1 que impiden la unión de TKIs; (4) activación de vías de señalización alternativas (p. ej. las quinasas de la familia de Src). Tomada de Soverini *et al.* 2018 (18).

#### 4.1.2.3. Evolución clonal

La adquisición de aberraciones citogenéticas no aleatorias adicionales al cromosoma Ph es un evento común en pacientes en transición a la BP (57). Como ya se ha adelantado, las aberraciones más comunes son la trisomía del cromosoma 8 (34%), el isocromosoma 17 (20%) y la duplicación del cromosoma Ph (38%) (116).

La trisomía del cromosoma 8 implica una ganancia cromosómica del locus de *MYC* (8q24) que conlleva un aumento de su expresión. La expresión desregulada de *MYC* se ha relacionado con la inducción de replicación aberrante de ADN, inestabilidad genética y una mala respuesta al IM (117). Por otro lado, el isocromosoma 17 supone una pérdida del brazo 17p donde se localiza el gen *p53*, un supresor tumoral que presenta

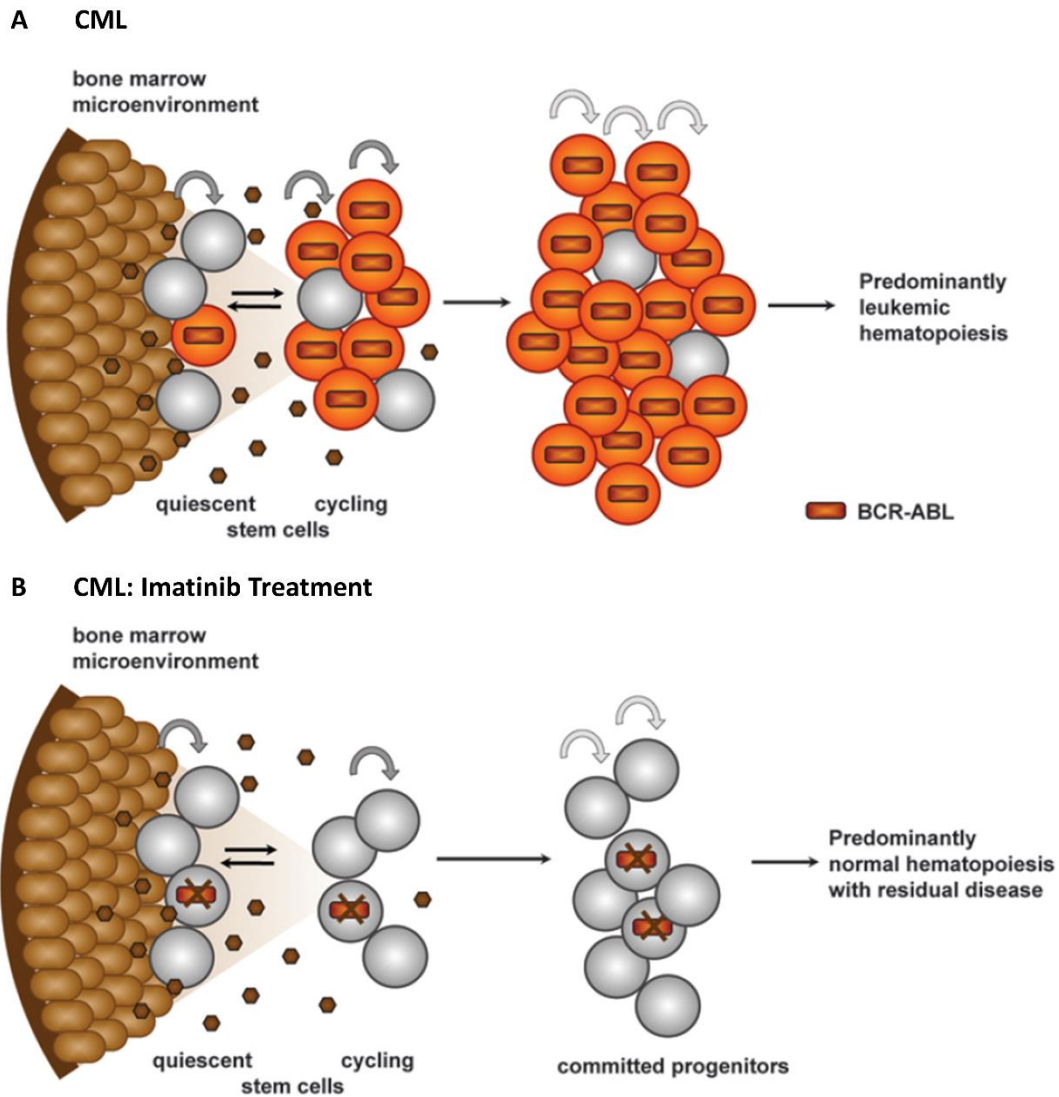
alteraciones en el 25-30% de pacientes de LMC en BP mieloide. Se ha demostrado que la inactivación de *p53* modifica la respuesta al IM *in vitro* e *in vivo*, dando lugar a resistencia. Dicha alteración ocurre de manera independiente de la inhibición de BCR-ABL1 por parte del TKI (118). Por último, la duplicación del cromosoma Ph induce la sobreexpresión de la oncoquinasa BCR-ABL1, lo cual explicaría el aumento de los niveles de expresión del transcrito conforme avanza la LMC.

Existen otras aberraciones citogenéticas que se producen en menor frecuencia, como trisomía del cromosoma 19, del cromosoma 21 o del 17, o deleción en el cromosoma 7, que han sido detectados en menos del 10% de casos de evolución clonal. También, un 10-15% de pacientes con LMC presentan deleciones en el cromosoma 9 que llevan a una progresión acelerada de la BP. En general, la evolución clonal se relaciona con un estado de mayor inestabilidad genética que se da en fases más avanzadas de la enfermedad y tienen un papel fundamental en la progresión de la misma (57).

#### 4.1.2.4. Células madre leucémicas

Durante el tratamiento con IM, la eliminación del transcrito de BCR-ABL1 pasa por dos fases contrastadas, una fase inicial de rápida reducción, y una segunda fase con una reducción más lenta. Estas etapas se han asociado con diferencias en la susceptibilidad de las subpoblaciones de células de LMC al IM. En este modelo, las células más diferenciadas con alta capacidad proliferativa son rápidamente eliminadas, mientras que las células madre de LMC (LSCs, *leukemic stem cells*) permanecen inalteradas debido a su estado quiescente, y son las responsables de la enfermedad residual (119).

Además, las LSCs tienen otros factores que explican su resistencia a los TKIs. El más importante es la insensibilidad a la inhibición de BCR-ABL1 por parte del IM. A diferencia de lo que ocurre cuando se dan mutaciones que dificultan el acceso del fármaco, en este caso, el IM produce inhibición de la oncoquinasa, pero esto no se traduce en una reducción de la viabilidad de estas células inmaduras (120). Ante este panorama, se han estudiado diversas vías de señalización alternativas en las LSCs, para encontrar otras dianas con las que atacar a estas células que actúan de reservorio. Algunas de estas vías son Wnt/ $\beta$ -catenina, Forkhead box O3 (FOXo3a), o la presencia de Promyelocytic leukemia protein (PML). A este respecto, se han investigado terapias combinatorias que inhiban BCR-ABL1 y otras dianas como PML, mTOR, STAT5 o JAK2, pero pocas han progresado más allá de los ensayos preclínicos (108,121) (**Figura 18**).



**Figura 18. Modelo de persistencia de leucemia mieloide crónica tratada con imatinib.** Las células de LMC con BCR-ABL1 en estado activo se representan en naranja. Las células representadas en gris tienen BCR-ABL1 inactivo (células no leucémicas o de LMC con BCR-ABL1 inhibida por imatinib). Las células representadas en marrón son parte del estroma y secretan citoquinas (círculos pequeños marrón oscuro). **A.** BCR-ABL1 activo permite la expansión de células primitivas de LMC. **B.** El imatinib inhibe la actividad de BCR-ABL1 en células madre de LMC, restaurando la homeostasis normal y eliminando la ventaja proliferativa de las células leucémicas. A pesar de ello, el nicho de la médula ósea permite la supervivencia de células madre de LMC que no dependen de BCR-ABL1. Tomada de Corbin *et al.* 2011 (120).

#### 4.2. Mecanismos de resistencia extrínsecos de células de LMC

También se han descrito factores extrínsecos que hacen que las células de LMC sean menos dependientes de BCR-ABL1, como el microambiente de la médula ósea que activa vías de supervivencia mediante la producción de citoquinas y factores de crecimiento (53). Las células del estroma que rodean a las LSCs promueven el bloqueo

del ciclo celular mediante señales específicas y, por tanto, contribuyen a la persistencia de la enfermedad durante el tratamiento con TKIs. Estas señales que mantienen la regulación de las células madre y de su progenie, así como la hematopoyesis en el microambiente de la médula ósea, dependen de la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas que actúan de manera autocrina y paracrina (102).

### 4.2.1. Células mesenquimales del estroma

Las células mesenquimales del estroma (MSCs) son piezas clave en el mantenimiento del nicho de HSCs y en la diferenciación del sistema linfo-hematopoyético. Las MSCs de pacientes con LMC no son portadoras del cromosoma Ph pero han sido muy estudiadas por su función promotora de la leucemia y su función protectora frente al tratamiento con TKIs (102).

Por un lado, se ha encontrado que las MSCs de pacientes de LMC poseen un perfil de expresión génica distinto a las MSCs de individuos sanos, que incluye la sobreexpresión de determinados genes como *BMP1*, *FOXO3*, *MET*, *MITF*, *NANOG*, y *PDPN*, que podrían estar implicados en la generación de la LMC en la médula ósea (122). También se ha descrito la influencia del estroma en la protección frente a la inducción de apoptosis en células de LMC tratadas con IM, por interacción célula-célula. En este caso, se ha observado que la interacción física entre las células del estroma y las células leucémicas lleva a estas últimas a incrementar su señalización vía ERK1/2 y SMAD1/8 y permanecer en un estado no-proliferativo (123).

### 4.2.2. Factores solubles

La médula ósea es una fuente rica en factores solubles que modulan la respuesta a los fármacos. Para desvelar qué factores pueden ser los responsables de estos cambios, Bewry *et al.* emplearon un modelo de línea celular de estroma de médula ósea para obtener medio condicionado (CM) y utilizarlo para cultivar células de LMC. En este caso, observaron una inducción de resistencia al IM cuando las células leucémicas se exponían al CM, y esto se asociaba con una sobreactivación de STAT3 y de sus genes diana antiapoptóticos (Mcl-1 o Bcl-xl) (124).

Otros estudios con MSC y células de LMC de pacientes han desvelado que la generación de resistencia a IM se asocia con un mayor nivel de secreción de IL-7, y que esta citoquina señala vía JAK1/STAT5 (125). Adicionalmente, el CM proveniente de células resistentes a IM (LAMA-84-R) es capaz de promover resistencia a la inducción

de apoptosis en las células naïve LAMA-84 tratadas con IM y Nilotinib. En este CM se identificaron altos niveles de GM-CSF que activaban la señalización vía JAK2/STAT5, independientemente de BCR-ABL1, describiendo otra vía de señalización que podría estar contribuyendo a la protección de las células leucémicas en la médula ósea (126).

### **4.3. Papel de STAT5 y STAT3 en la resistencia a TKI**

El papel de la vía de señalización JAK/STAT y en concreto, de la desregulación de los factores STAT en la LMC ya se ha comentado anteriormente, pero es interesante profundizar en la importancia que tienen en el establecimiento de la resistencia o la deficiente respuesta a los TKIs.

Un aspecto fundamental, que se relaciona con algunos de los factores de resistencia nombrados, es la conexión existente entre BCR-ABL1, STAT5 y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (127,128). La presencia de altos niveles de ROS que producen estrés oxidativo se considera una característica común de diversos contextos tumorales, y una de sus consecuencias principales es la generación de inestabilidad genética (127). En referencia a esto, Koptyra *et al.* describen una relación directa entre la presencia de BCR-ABL1 y el incremento de los niveles de ROS, que produce un daño oxidativo en el ADN propiciando la aparición de mutaciones en aminoácidos implicados en la acción del IM. Este mismo estudio explica cómo la aplicación de antioxidantes a las células que expresan BCR-ABL1, reduce la tasa de mutagénesis y aumenta la sensibilidad al IM (129). De forma similar, el incremento en los niveles de STAT5 se ha vinculado con insensibilidad a los inhibidores de BCR-ABL1, pero no a otros quimioterápicos como hidroxiurea o IFN- $\beta$ . De hecho, los pacientes que experimentan progresión de la LMC tienen niveles elevados de STAT5 (ARNm y proteicos) (130). Múltiples investigaciones han demostrado la correlación entre STAT5 y la tasa de mutagénesis en BCR-ABL1, pero es importante destacar que estos factores deben actuar en conjunto, pues las células no-malignas (sin BCR-ABL1) que sobreexpresan STAT5 no muestran niveles elevados de ROS (128).

No obstante, una alta proporción de pacientes con resistencia a TKI no presenta mutaciones en BCR-ABL1, pues expresan la proteína nativa. En estos casos, deben existir mecanismos alternativos que aseguran la supervivencia de las células de LMC a pesar de la inhibición de la tirosina quinasa ABL1. Entre ellos se ha descrito el incremento de la activación y niveles de STAT3, normalmente asociado a la señalización de las células del nicho o de la médula ósea (124,131). La importancia de la activación de STAT3 en la



resistencia al tratamiento de la LMC se confirmó en un estudio que utilizaba células primarias de pacientes con resistencia a TKI independiente de BCR-ABL1, y al tratarlas con un inhibidor de SH2 de STAT3 (BP-5-087) restituían la sensibilidad a los TKI (incluyendo células progenitoras y células madre de LMC) (132).

La conexión entre STAT5, STAT3 y la generación de resistencia y progresión de la LMC es una evidencia, pero los mecanismos por los cuales participan en estos fenómenos son aún objeto de investigación. En el caso de STAT3, posee un papel importante en la reprogramación metabólica presente en las células cancerígenas con respecto a las células sanas, que consiste en una predilección por la glicólisis aeróbica frente a la respiración aeróbica celular para obtener energía. En este aspecto, nuestro grupo de investigación ha realizado una revisión exhaustiva de los mecanismos moleculares que subyacen al conocido “efecto Warburg”, con especial atención a la vía del mevalonato como una posible diana terapéutica en cáncer (133). La síntesis lipídica exacerbada proporciona nuevos componentes celulares y factores de señalización oncológica que permiten el crecimiento rápido de los tumores. Estas ventajas adaptativas que implican alteraciones metabólicas son necesarias para el mantenimiento del tumor, por lo que la acción de STAT3 puede tener una función vital en la progresión de la LMC. Precisamente, la activación de STAT3 en serina 727 ( $S^{727}$ ) es responsable de la regulación del metabolismo mitocondrial, de forma que aumenta la actividad de los Complejos I y II y reduce la producción de ROS mitocondrial (134).

Estas modificaciones metabólicas han demostrado favorecer la supervivencia celular en condiciones de estrés y de hecho, podría ser una explicación de cómo los altos niveles de ROS no generan la inducción de la apoptosis en las células de LMC (127,133). Estas características detectadas en células cancerígenas guardan una gran similitud con las alteraciones metabólicas detectadas en células madre cancerígenas residentes en el nicho hematopoyético. De esta forma, la activación de STAT3 y su interacción con la vía de señalización de los factores inducidos por hipoxia (HIF) sugieren su participación en el sustento de células tumorales quiescentes en el nicho hematopoyético (127,133).

## 5. Desarrollo de nuevos fármacos

### 5.1. Evolución

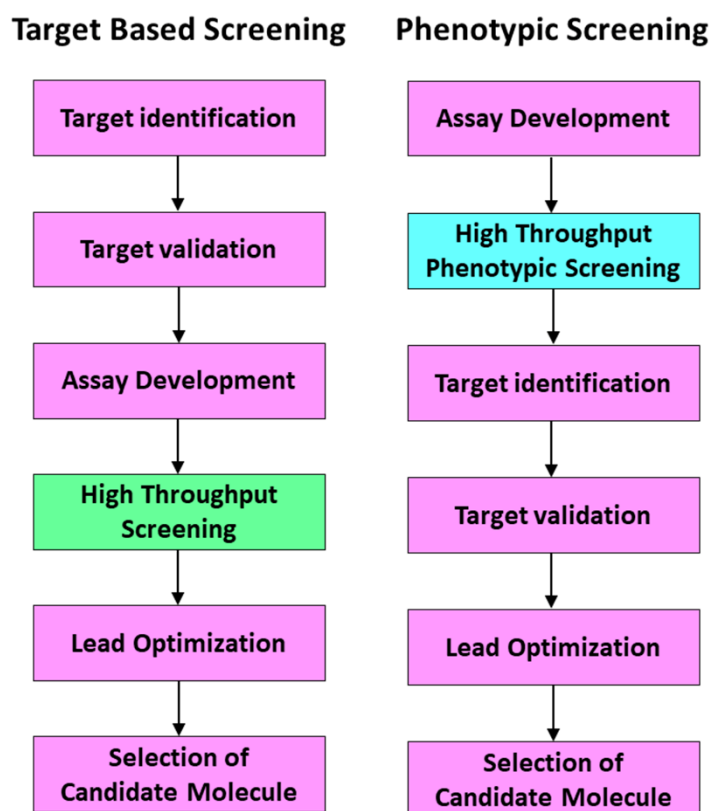
Históricamente, la medicina occidental se ha centrado en la utilización de extractos complejos de productos naturales (PN) como potenciales tratamientos, cuyo éxito dependía de los conocimientos etnobotánicos y la serendipia. En esta época, los estudios farmacológicos utilizaban organismos como modelos, normalmente células o animales, que permitían la observación de cambios fenotípicos causados por dichos extractos. A principios del siglo XIX, surgió la posibilidad de aislar las sustancias farmacológicamente activas responsables de los efectos detectados, suponiendo un acercamiento hacia la farmacología moderna. Sin embargo, a principios del siglo XX, la llegada de avances científicos importantes en genómica, biología celular y molecular impulsaron un cambio de paradigma en el descubrimiento de fármacos. Dicho cambio, proponía una visión más “reduccionista” donde un compuesto determinado podía actuar a modo de “bala mágica” uniéndose a una determinada diana en el organismo para tratar una patología concreta (135,136).

Bajo esta premisa, a finales de la década de 1990 y principios del 2000 cobró fuerza la estrategia de descubrimiento de fármacos basada en la diana (TDD, *Target-Based Drug Discovery*) que se consideraba más racional y eficiente que los métodos anteriores (137). Esta estrategia concedía la oportunidad de utilizar datos obtenidos en la clínica para establecer límites, elegir pacientes para ensayos clínicos y en definitiva, producir nuevos compuestos de manera más activa (138). Sin embargo, los resultados de su aplicación no fueron los esperados, dejando en evidencia que un enfoque basado en cambios fenotípicos (PDD, *Phenotypic-Based Drug Discovery*) se asociaba con un mayor número de nuevas entidades moleculares (NME) aprobadas por la FDA. Esto generó una enorme controversia ya que los esfuerzos en investigación estaban fundamentalmente centrados en la TDD (138).

En este contexto, y ya en la era postgenómica, creció el interés por recuperar ciertos aspectos de la PDD para la industria farmacéutica y la investigación académica. Esto se explica en parte, por las crecientes evidencias que indicaban que la mayoría de los fármacos interacciona con más de una diana, existiendo dianas centrales que conectan con muchas otras proteínas reguladoras, o vías adyacentes con menos interconexiones. Por lo tanto, hay un cambio de definición del descubrimiento de fármacos entendiéndola

como una red farmacológica que asume que las enfermedades son sistemas complejos, donde interactúan muchos componentes, y, por ello, utilizar fármacos con múltiples dianas puede ser más eficaz (135,137).

Por un lado, es evidente que la estrategia TDD tiene ventajas como mayor sencillez, rapidez y bajos costes en su desarrollo y funcionamiento. Además, con un objetivo identificado, se pueden utilizar técnicas basadas en cristalografía, modelaje computacional, bioquímica, cinética de unión, genómica o análisis mutacional para comprender cómo un compuesto puede unirse a una diana permitiendo desarrollar estudios de la relación estructura-actividad. La estrategia TDD también facilita el descubrimiento de estructuras químicas que den lugar a fármacos de nuevas generaciones capaces de actuar frente a la misma diana. Por el contrario, optimizar compuestos sin una diana conocida, como podría ocurrir en una estrategia que utilice sólo PDD puede ser una tarea complicada (139) (**Figura 19**).

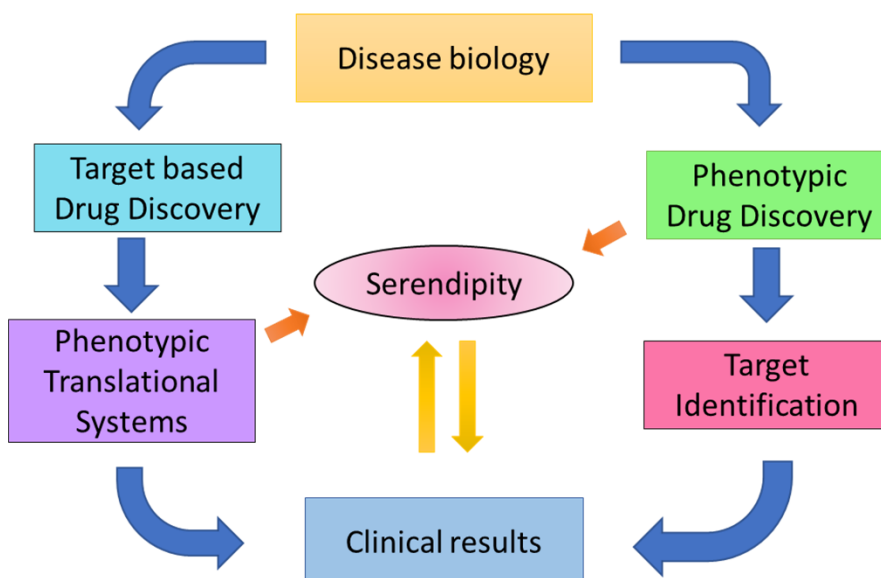


**Figura 19.** Imagen comparativa de la estrategia de cribado basado en la diana y la estrategia de cribado basado en el fenotipo. Adaptada de Isgut *et al.* 2018 (135).

Uno de los principales beneficios del screening fenotípico es que evita el sesgo de centrarse en una diana concreta. Justamente, un enfoque basado en la diana está

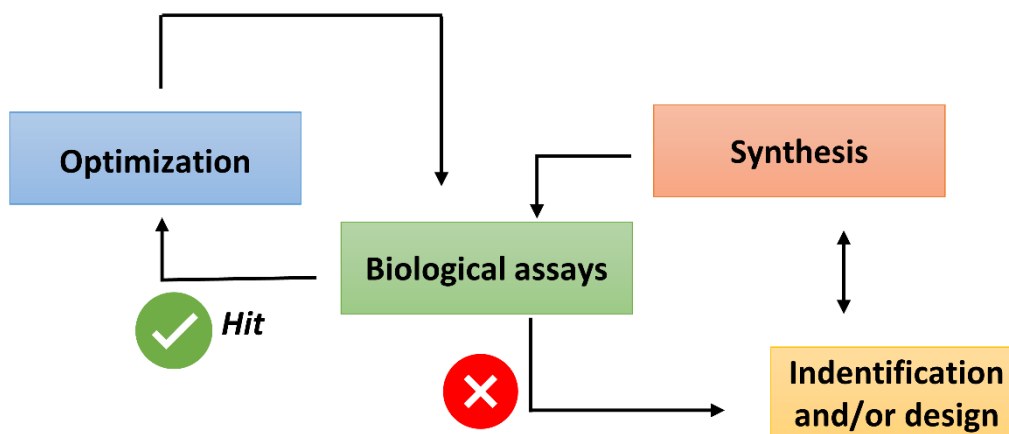
asumiendo que se conoce un sistema biológico con tal precisión, que se puede atribuir una enfermedad a un gen específico, mientras que los ensayos fenotípicos tienen en cuenta la complejidad y la incertidumbre de los sistemas biológicos, permitiendo conocer nuevas dianas y mecanismos (139).

Encontrar la estrategia más adecuada en el descubrimiento de fármacos dependerá del contexto patológico investigado, ya que en las enfermedades que han sido profundamente caracterizadas a nivel molecular y que poseen una diana validada, la estrategia TDD puede ser eficaz, mientras que la necesidad de nuevos objetivos y mecanismos puede requerir de un enfoque fenotípico (PDD). En cualquier caso, la utilización de los mejores aspectos de ambas aproximaciones parece la mejor solución ante esta cuestión para mejorar el éxito de la aplicación a la clínica (139,140) (**Figura 20**).



**Figura 20.** Esquema que resume las vías que conducen a resultados clínicos en el descubrimiento de fármacos. Adaptada de Croston 2017 (139).

La combinación de ensayos de cribado fenotípico en una primera fase, que asegure la selección de compuestos con actividad biológica en sistemas complejos, seguido de la identificación de la diana de manera retrospectiva, permite la identificación del *hit* y su optimización alternando estudios experimentales y computacionales de forma iterativa (137,141) (**Figura 21**).



**Figura 21.** Ciclo iterativo en el proceso de desarrollo de un *hit*. Adaptada de Fernández Alonso *et al.* 2018 (141).

Los avances tecnológicos han sido fundamentales para la implementación de esta combinación estratégica, y sin duda, gran parte de su éxito se debe a la creciente participación de los análisis computacionales avanzados en el descubrimiento de fármacos novedosos. Algunas de sus aplicaciones más importantes son: el diseño de *hits* con actividades biológicas de interés; el cribado de grandes bases de datos recogidas en quimiotecas que permiten examinar un menor número de productos experimentalmente (cribado virtual); o la optimización de aquellos productos que ya han sido seleccionados como *hits* o *leads* para mejorar sus características farmacológicas y reducir efectos adversos. Para ello, hacen uso de datos estructurales de ligandos eficaces, de receptores u otras macromoléculas con importancia fisiopatológica, de las características de los compuestos con propiedades tipo fármacos, o del estudio del acoplamiento molecular con la diana investigada (*docking* molecular) (142). De hecho, una vez se ha validado una diana en una determinada patología, se determina su estructura tridimensional por cristalografía de rayos X y por resonancia magnética nuclear, y se almacena en bases de datos abiertas. Esto permite diseñar compuestos *de novo*, utilizando los sitios de unión de las enzimas para sintetizar las moléculas mejorando las interacciones ligando-diana (142); o utilizar el acoplamiento molecular para determinar la mejor conformación entre las dos moléculas, receptor y ligando. En el caso de utilizar programas informáticos que determinen las posibles posiciones entre el receptor y el ligando, las interacciones moleculares se califican según sus resultados en valores de *docking score* (143).

Por otra parte, es importante destacar que también ha habido grandes avances en las técnicas biomédicas desempeñadas en la estrategia PDD, que suponen una mejora de

las herramientas y, por tanto, de los resultados obtenidos en el descubrimiento de fármacos (124, 125). Algunos casos incluyen la utilización de cultivos celulares más complejos capaces de simular contextos biológicos propios de los organismos como: los co-cultivos que constan de más de un tipo celular permitiendo el estudio de sus interacciones; los cultivos celulares en tres dimensiones (3D); o la posibilidad de mantener cultivos primarios *in vitro* de manera más eficaz (144). En los últimos años, la aplicación de cultivos celulares en 3D, empleando placas de baja adhesión, ha supuesto una forma sencilla de crear esferoides que imitan las condiciones fisiológicas de forma más precisa que la utilizada en cultivos tradicionales (2D), y que representan una ventaja a la hora de seleccionar compuestos con una mejor aplicación a la clínica (146).

La combinación de ambas estrategias (PDD y TDD), asistida por estudios computacionales ha permitido el descubrimiento de numerosos compuestos dónde la diana es identificada *a posteriori* (137). Tal es el caso del E7070, una sulfonamida que se ha investigado en ensayos clínicos como tratamiento frente al cáncer colorrectal metastásico (147) y frente a la leucemia mieloide aguda refractaria (148) con resultados interesantes. Este producto demostró su eficacia en ensayos fenotípicos y seguidamente, se identificó su diana (malato citosólico deshidrogenasa) en ensayos de cromatografía de afinidad (149). También el ezetimibe, un inhibidor del transportador de esteroides, fue descubierto utilizando ensayos fenotípicos como aproximación inicial y actualmente se emplea en la reducción del colesterol de baja densidad o LDL-c (*low-density lipoprotein cholesterol*) en pacientes con hipercolesterolemia (150). Asimismo, otro compuesto que se descubrió con dicha combinación de estrategias es el FK506 o tacrolimus, un inmunosupresor eficaz utilizado ante el rechazo inmunológico producido después del trasplante de órganos (151). En este caso, su diana (FKBP12) fue descubierta por *mRNA display*, técnica que aplica la afinidad de unión entre transcritos de interés y la molécula de estudio, identificando las proteínas a las que se une el compuesto activo investigado (152). Estos son sólo algunos ejemplos que ilustran los beneficios de esta metodología para la búsqueda de nuevos compuestos activos con propiedades farmacológicas interesantes.

### 5.2. Etapas del descubrimiento de fármacos

El descubrimiento de fármacos hoy en día sigue siendo un proceso largo y de alto coste económico que requiere de la colaboración interdisciplinar. En este sentido, se estima que se criban 10.000 compuestos en la fase de descubrimiento por cada compuesto

que llega al mercado, y, de media, se tarda entre 10-15 años en conseguirlo (153). El proceso de desarrollo de fármacos puede subdividirse en 3 fases principales: descubrimiento del fármaco; desarrollo preclínico y desarrollo clínico.

En la primera fase, se identifica una necesidad médica sin resolver, se buscan dianas potenciales asociadas con la enfermedad, se estudia su funcionamiento patológico y su potencial terapéutico (154). Posteriormente, se ensayan una serie de compuestos químicos llamados *hits*, que son de interés por sus características observadas en estudios *in silico*, bioquímicos o de afinidad (155). A partir de los *hits* se obtienen los “cabeza de serie” o *leads* en una etapa de gran importancia llamada *hit-to-lead*, cuyos compuestos resultantes tienen una actividad biológica conocida y están sujetos a optimización estructural (*lead optimization*). De esta forma, se pueden obtener compuestos con mejores características farmacocinéticas y farmacodinámicas (154). En la segunda fase, se desarrollan una amplia variedad de estudios *in vitro* e *in vivo*, que analizan la toxicidad, la farmacocinética y farmacodinámica así como la formulación o la biodisponibilidad del producto (153,154). En la tercera fase, existe una estricta regulación normativa, pues son estudios realizados en humanos (voluntarios sanos y pacientes). Esta fase se subdivide a su vez en 3 etapas, en las que va aumentando progresivamente el número de individuos y el tiempo implicado en los estudios. En general se evalúa la eficacia del fármaco, los posibles efectos secundarios y la seguridad del tratamiento (153,154). Estas tres fases no tienen por qué realizarse de manera sucesiva, si no que normalmente se superponen (**Figura 22**).

I. INTRODUCCIÓN

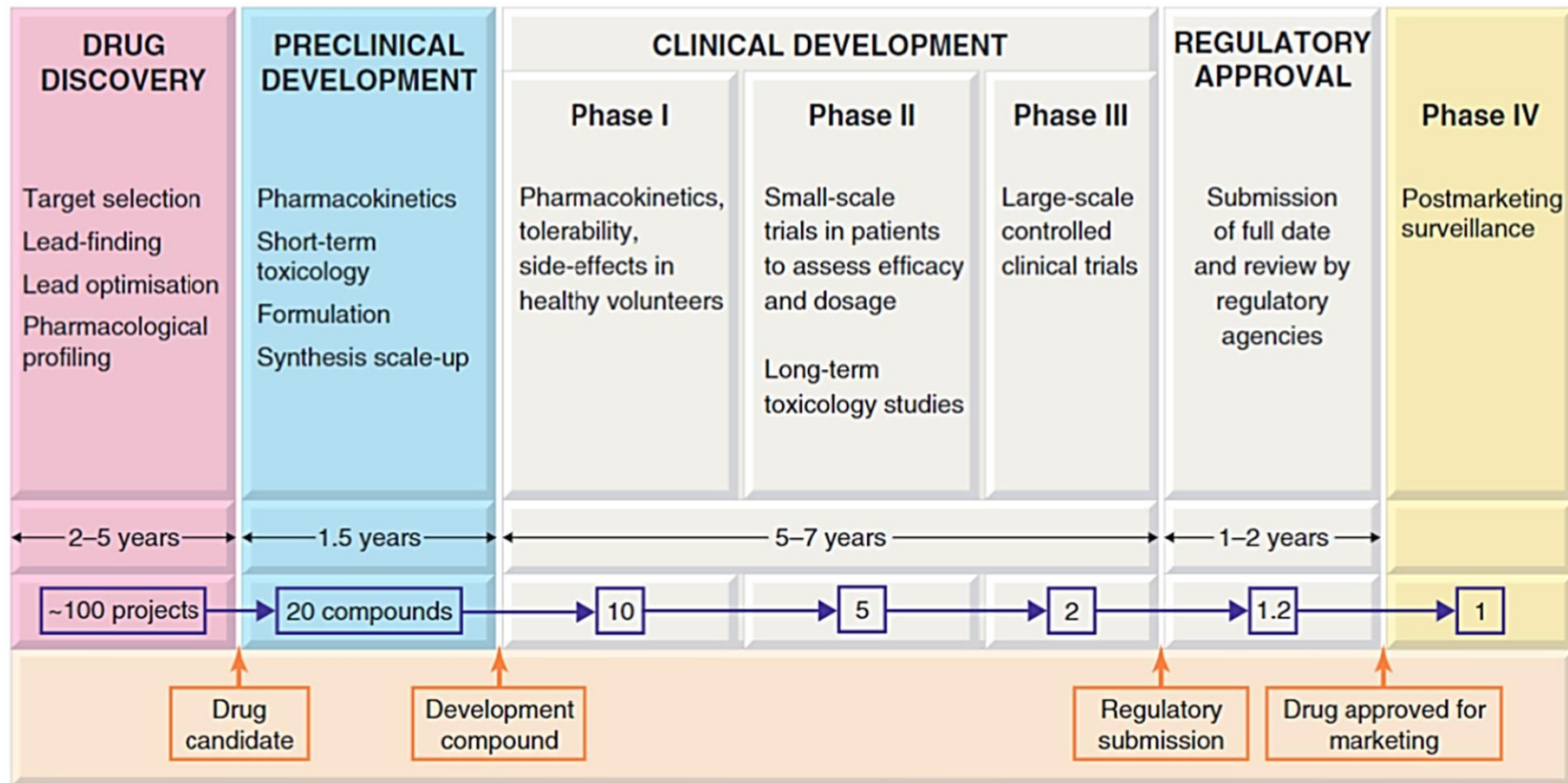


Figura 22. Etapas del desarrollo de fármacos. Adaptada de Ritter *et al.* 2014 (154).



### 5.3. Estrategias de cribado de quimiotecas de compuestos naturales

Los procesos actuales que conducen a la identificación de nuevos *leads* incluyen una serie de nuevas tecnologías como la bioinformática, la química combinatoria y el cribado de alto rendimiento (HTS). La utilización de dichas herramientas permite obtener NMEs que llegan al mercado en un tiempo más corto que antes de su implantación. El propio método HTS ha evolucionado extremadamente desde sus inicios hasta la actualidad.

En sus comienzos, el cribado se realizaba con técnicas manuales y se analizaban unos 100 compuestos por semana. En cambio, actualmente, se pueden cribar unos 10.000 compuestos al día con técnicas mecanizadas (156). El proceso de HTS consiste en ensayar los compuestos de una quimioteca sobre sistemas biológicos, se seleccionan los *hits* que deben ser validados por métodos bioquímicos o biofísicos independientes, y son optimizados para funcionar como candidatos a fármacos (136). La validación de los *hits* se realiza aumentando la complejidad de los sistemas que contienen la diana, como por ejemplo con la utilización de modelos celulares y animales. Se podría considerar que la validación más completa ocurre cuando en un contexto patológico, la modificación de la diana por el compuesto da lugar a la reversión de los síntomas clínicos (157).

Los compuestos naturales han supuesto la fuente principal de los fármacos utilizados por los humanos en el pasado, y continúan generando grandes aportes al descubrimiento de fármacos actual (156). Tradicionalmente los compuestos naturales han tenido una alta tasa de éxito como *hits* en los ensayos HTS, siendo en 1990 el 80% de los fármacos nuevos derivados de PN. Por otro lado, descubrir y aplicar compuestos naturales representa un proceso caro, largo y laborioso (135). De hecho, aún representan una fuente de descubrimiento, ya que se estima que sólo se ha investigado la actividad biológica del 15% de las plantas superiores, y un porcentaje aún menor de especies bacterianas y marinas (158). El triunfo de los PN como “guías estructurales” para el desarrollo de quimiotecas no es un hecho sorprendente si se tiene en cuenta que son resultado de años de selección y evolución de su actividad biológica y que, por tanto, tienen gran probabilidad de unirse con alta afinidad a dianas proteicas en el organismo (159).

### 5.4. Estrategias de síntesis de compuestos

A pesar de las ventajas que proporcionan los PN, la complejidad de sus estructuras y su disponibilidad generan problemas para su aislamiento, identificación y síntesis. Estas

limitaciones son afrontadas por la química orgánica mediante la aplicación de ciertas estrategias de síntesis capaces de generar complejidad estructural (160).

Entre estas estrategias se encuentra la Síntesis Orientada a la Diversidad (DOS, *Diversity-Oriented Synthesis*) que se centra en la obtención de esqueletos moleculares variados y complejos mediante la investigación de amplias áreas del espacio químico. Esta diversidad estructural suele traducirse en una diversidad funcional, que genera productos biológicamente activos capaces de modular macromoléculas en organismos vivos (161).

La Síntesis Orientada Biológicamente (BIOS, *Biology-Oriented Synthesis*) combina la conservación estructural y la diversidad hallada en los PN. Para ello emplea una clasificación jerárquica de los compuestos bioactivos según su relación estructura-bioactividad, y agrupa los esqueletos de cada tipo de moléculas activas como puntos de partida para la síntesis de colecciones de compuestos con la diversidad como punto esencial (162).

En la actualidad, con el fin de aumentar la diversidad molecular dentro del espacio biológico, hay una clara disposición a utilizar la estrategia llamada Síntesis Orientada a la Diversidad basada en el uso de estructuras privilegiadas (p-DOS, *Privileged Substructure-based Diversity Oriented Synthesis*). Como su nombre indica, se centra en la diversidad estructural utilizando estructuras privilegiadas. La definición de estructuras privilegiadas se refiere a estructuras moleculares capaces de interactuar con numerosas dianas biológicas además de ser recurrentes en quimiotecas que poseen interesantes propiedades farmacológicas (163).

Algunos ejemplos de dichas estructuras privilegiadas son los triazoles, benzopiranos, isoxazoles o las quinonas, que han sido destacados repetidamente por sus actividades biológicas. Normalmente se trata de estructuras con un equilibrio apropiado entre flexibilidad y rigidez, sumado a la posesión de grupos funcionales en una disposición conveniente (160).

Para la aplicación de estas estrategias se utilizan herramientas de síntesis capaces de generar complejidad estructural, que se relaciona con la probabilidad de interactuar con proteínas y con la especificidad de acción. Dentro de estas herramientas podemos distinguir las reacciones multicomponentes y las reacciones dominó (164).

Las reacciones dominó surgen en un intento de desarrollar procesos químicos más respetuosos con el medio ambiente, más eficientes y con menor generación de residuos. Normalmente la síntesis de compuestos químicos orgánicos requiere de la formación de

enlaces de la molécula de forma individual en cada etapa. Sin embargo, en las reacciones dominó se forman varios enlaces en una sola secuencia sin necesidad de aislar intermediarios, cambiar las condiciones de la reacción o añadir reactivos. De esta forma, se consigue una estrategia de síntesis eficaz ecológica y económicamente (165).

Las reacciones multicomponente requieren de al menos tres reactivos, de los cuales, la mayoría de sus átomos son incorporados al producto final de la reacción. Un subgrupo de reacciones multicomponente se consideran reacciones dominó, pero también pueden realizarse de manera secuencial, donde el orden de las reacciones es fundamental para la obtención de un producto adecuado (164).

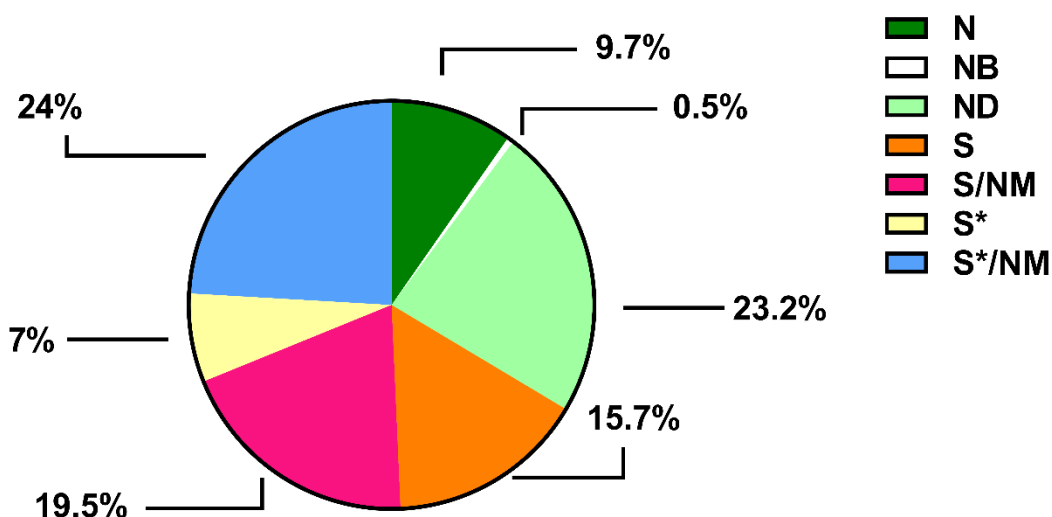
### **5.5. Productos naturales como fuente de compuestos con actividad antitumoral**

Como ya se ha comentado anteriormente, los extractos vegetales se han utilizado como tratamientos contra diversas enfermedades humanas desde la antigüedad, y el cáncer no es una excepción. Los indios americanos utilizaban extractos de la raíz *Podophyllum peltatum* como tratamiento eficaz contra el cáncer de piel. Los principales constituyentes de ese extracto se llamaron podofilinas, que incluyen al etopósido y al tenipósido. Asimismo, la planta *Vinca rosea* era utilizada como agente hipoglucemiante sin mucho éxito, hasta que años después se aislaron de ella la vinblastina y la vincristina con actividades citotóxicas muy potentes.

Estos hallazgos fueron decisivos para que en 1960-1982 el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) desarrollase un programa de cribado de agentes antitumorales procedentes de 35.000 muestras de plantas frente a líneas celulares de leucemia. El fármaco más importante que surgió de este programa fue el paclitaxel (taxol) obtenido de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*). En 1985 se inicia otro programa en el que se estudian extractos de plantas, animales y microorganismos (presencia importante de origen marino) frente a 60 líneas celulares de tumores sólidos y leucemias. Los mecanismos de acción asociados a estos compuestos variaban desde inhibidores de topoisomerasa I (camptotecina), estabilizadores (taxol) o desestabilizadores de microtúbulos (vincristina y vinblastina), generadores de radicales libres (doxorubicina y daunorubicina), entre otros (166).

La industria farmacéutica ha conseguido aprovechar las ventajas inherentes a los PN sin necesidad de aislarlos directamente de sus nichos ecológicos. Así, del total de fármacos aprobados para el tratamiento del cáncer a nivel mundial, una mayoría son PN o compuestos inspirados en ellos. En el período transcurrido entre 1946-1980 se

aprobaron 75 NME de las cuales, el 53,3% eran PN o derivados de ellos. En el rango de tiempo transcurrido entre 1981-2019 se han aprobado 185 NME, de los cuales el 33,5% son de origen natural, sin embargo, si se incorporan los compuestos sintéticos con farmacóforos de PN o compuestos que imitan a los PN, el porcentaje asciende a un 64,9% (167) (**Figura 23**).



**Figura 23.** Gráfico que representa los porcentajes de nuevas entidades moleculares (NME) aprobadas contra el cáncer en el periodo 1980-2019 a nivel mundial. La leyenda representa, N: producto natural inalterado; NB: Fármaco botánico; ND: derivado de producto natural (PN); S: fármaco sintético; S/NM: fármaco sintético con farmacóforo de PN; S\*: fármaco sintético con farmacóforo de PN; /NM: imita a un PN. Adaptada de Newman *et al.* 2020 (167).

Dentro del periodo 1980-2019, se han aprobado una serie de fármacos derivados de PN destacables. El Aplidin, un PN marino inalterado desarrollado por la empresa española PharmaMar SA (168), ha sido aprobado a finales de 2018 para el tratamiento de MM en Australia, aunque fue rechazado por la EMA para la misma indicación. También se ha conseguido la aprobación de la FDA del primer derivado de Estaurosporina, Midostaurina, como inhibidor de *FLT3* en 2017. Además, en estos últimos años, se han aprobado 21 inhibidores de quinasas que se categorizan como sintéticos pero que mimetizan PN (por ejemplo inhibidores competitivos de ATP) (167).

### 5.5.1. Naftoquinonas y sus derivados e híbridos

Las quinonas son un grupo de compuestos químicos orgánicos de alta reactividad que se distribuyen ampliamente en la naturaleza. Debido a sus propiedades químicas, pueden interaccionar con dianas biológicas formando uniones covalentes con ellas y

actuando como agentes de transferencia de electrones en reacciones de oxidación-reducción (redox) (169,170). Por tanto, las quinonas realizan funciones vitales en la producción bioquímica de energía con una participación directa en la cadena respiratoria de las células, lo que explica su ubiquidad (170).

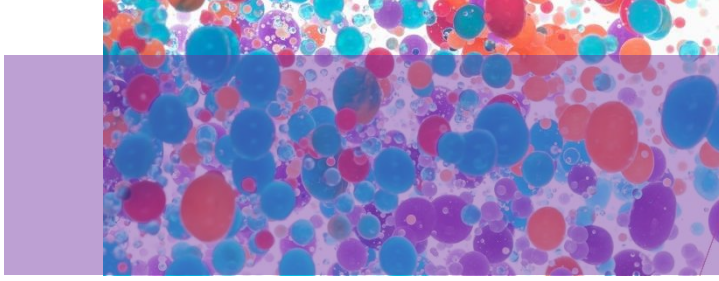
Las quinonas naturales y sus análogos sintéticos poseen numerosas actividades biológicas que han sido extensamente estudiadas. Por ejemplo, los antibióticos tipo antraciclinas, obtenidos a partir de microorganismos (daunorrubicina, doxorubicina o idarrubicina); bleomicinas; dactinomicina o mitomicina C son quinonas que se han utilizado en la clínica como quimioterapia contra el cáncer (170). Dentro de las quinonas, el grupo más abundante encontrado en la naturaleza son las naftoquinonas, con multitud de actividades biológicas asociadas de gran interés. Entre ellas destacan la actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antitrombótica, antialérgica y antiviral (171) que las convierte en estructuras privilegiadas según la química médica.

Algunas naftoquinonas de origen natural con propiedades farmacológicas conocidas son la lawsona, la plumbagina, el lapachol, la juglona o la shikonina. Estas se han utilizado como modelos a partir de los cuales se realizan modificaciones estructurales que pueden dar lugar a nuevos compuestos con propiedades físico-químicas mejoradas pero con mecanismos de acción similares (172). La shikonina, por ejemplo, actúa sobre varias dianas implicadas en la génesis del cáncer como pueden ser p53 y BAX (173). En el caso de la plumbagina, la mayoría de sus dianas están relacionadas con la señalización redox, por ejemplo, MAPK, tioredoxina reductasa y glutatión reductasa (174). Aunque también se ha observado que inhibe la fosforilación de STAT3 en células de cáncer gástrico. Asimismo, derivados de naftoquinona sintetizados según un compuesto líder (STA-21) que inhibe el motivo SH2 de STAT3, mantienen esta capacidad inhibitoria y suprimen la proliferación de células cancerígenas de próstata (DU-145) y de colon (HT-29) (171). Por su parte, el  $\beta$ -lapachol se ha relacionado con la inhibición de las enzimas ADN topoisomerasa I y II (175). Este compuesto se está investigando como tratamiento en ensayos clínicos de cáncer pancreático, leiomiocarcinoma y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Las antraciclinas son derivadas de 1,4-naftoquinonas y son eficaces frente a un amplio espectro de tumores que incluye leucemia, linfomas, cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de vejiga y cáncer de pulmón. Sus mecanismos moleculares las definen como inhibidores de topoisomerasa II, agentes intercalantes de ADN y generadores de ROS. Aunque poseen un potente efecto antitumoral, también se

asocian con cardiotoxicidad irreversible, que en parte se explica por los altos niveles de topoisomerasa II $\beta$  que se encuentran en los tejidos cardíacos (176).

Las pironas son compuestos de origen natural que pueden ser sintetizadas por microorganismos, plantas y hongos como metabolitos secundarios. La mayoría de pironas se asocia con una amplia gama de actividades biológicas como citotoxicidad, fitotoxicidad, antioxidante, antialérgica, antimicrobiana o anticolinesterasa (177). En lo que respecta a su acción antitumoral, encontramos diversidad de ejemplos. Por un lado, se han descrito  $\gamma$ -pironas extraídas de la corteza del árbol *Artocarpus communis* que muestran citotoxicidad frente a células de leucemia (178) o hepatocarcinoma (179). Además, se han descubierto nuevos derivados de pirona aislados del hongo endófito de manglares *Aspergillus sydowii* con capacidad de reducir la viabilidad celular de una línea de cáncer de próstata e incluso reducir la generación de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) por parte de células RAW 246.7 estimuladas con LPS (180). Otro estudio interesante encontró que  $\alpha$ -pironas aisladas de extractos de *Streptomyces sp.* aumentaban sensibilidad al tamoxifeno en células de cáncer de mama resistentes al mismo (MCF-7/TamR) (181).

La experiencia de nuestro grupo de investigación en esta materia se basa en el descubrimiento de nuevos derivados o híbridos de naftoquinonas con alta efectividad antitumoral contra células humanas de LMC, asociada a una inhibición del tándem de señalización BCR-ABL1/STAT5. Como se ha explicado, este eje de señalización es responsable de la generación de ROS en la progresión de la LMC, de la evasión de la apoptosis, y de la generación de proliferación descontrolada. Así, los mecanismos de acción antitumorales descritos para las naftoquinonas como la generación de ROS o la inhibición de la señalización proinflamatoria del ambiente tumoral (p. ej. STAT3), los convierten en agentes farmacológicos de alto interés como punto de partida de los estudios preclínicos elaborados en el presente trabajo.



## **II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**



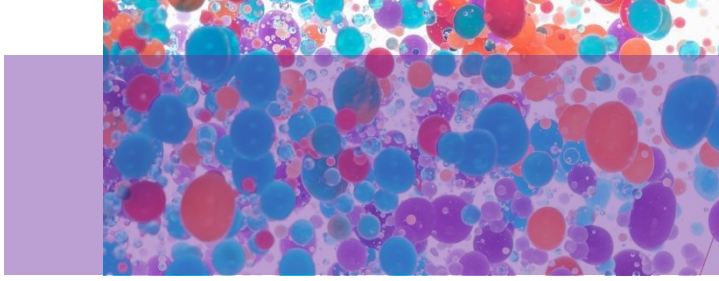


Las neoplasias hematológicas (NH) son un conjunto de enfermedades frecuentemente diagnosticadas a nivel mundial que, a pesar de ser punteras en cuanto a innovación biomédica, aún requieren de nuevas opciones terapéuticas que limiten la generación de resistencia, recaída o toxicidad en los pacientes. Por su parte, el descubrimiento de fármacos a nivel preclínico implica el cribado *in vitro* de una gran cantidad de moléculas de pequeño tamaño, frecuentemente sintetizadas en base a productos naturales con actividad biológica. Actualmente, la aplicación de una estrategia combinada que investigue el efecto fenotípico que causan los compuestos en modelos celulares patológicos, seguido de una posterior búsqueda de sus dianas, se considera un método con alta tasa de traslación a la clínica. Por esta razón, la hipótesis de partida de esta tesis doctoral es que la combinación de la estrategia de descubrimiento de fármacos basada en el fenotipo (PDD), y la estrategia basada en la diana (TDD) podría conducir al descubrimiento de moléculas originales que posean actividad antitumoral eficaz y mecanismos de acción novedosos en el contexto de las NH. En concreto, el objetivo general de este trabajo es la selección de un compuesto con actividad antitumoral eficaz y adecuadas propiedades farmacológicas mediante la investigación *in vitro* de quimiotecas con alta diversidad estructural frente a modelos celulares de NH humanas. Para alcanzar este objetivo general, se enumeran a continuación los objetivos específicos de la presente tesis doctoral:

1. Cribado farmacológico de quimiotecas de compuestos con estructuras químicas privilegiadas en líneas celulares de NH con dianas terapéuticas conocidas mediante la estrategia PDD.
2. Selección del compuesto químico con el efecto antitumoral más potente que reúna cualidades farmacológicas adecuadas en base a estudios predictivos ADME *in silico* y de acoplamiento molecular con dianas de interés en las NH.
3. Identificación experimental de potenciales dianas y mecanismos de acción del compuesto seleccionado en el modelo patológico que muestre mayor sensibilidad.
4. Análisis de la toxicidad del compuesto *in vitro* e *in vivo* (ensayos de toxicidad aguda y sub-crónica).
5. Estudio de la combinación del compuesto seleccionado y el tratamiento de primera línea de la enfermedad para determinar la posible potenciación del efecto antitumoral.

## II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

6. Determinación de la capacidad del compuesto para superar los mecanismos de resistencia al tratamiento convencional de la NH en estudio.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Modelos celulares

En este proyecto se han utilizado líneas celulares establecidas, en su mayoría comerciales (ATCC, American Type Culture Collection), y células humanas mononucleares aisladas de sangre periférica (PBMCs) que se presentan a continuación clasificadas según el objetivo de estudio.

Los medios de cultivo y suplementos fueron adquiridos de las casas comerciales Corning (NY, EE. UU.), Lonza (Basilea, Suiza) y Biowest (Nuaille, Francia). El material plástico para cultivo celular como *flasks T75*, placas de 96 pocillos y placas de cultivo de 100 mm, fue obtenido de las casas comerciales NUNC (Waltham, EE. UU.) o BD Falcon (Hainestport, EE. UU.).

### 1.1. Líneas celulares empleadas en el cribado de series químicas

Los estudios de cribado de las series químicas se realizaron en las siguientes líneas celulares establecidas que representan modelos de investigación de cáncer hematológico con anomalías citogenéticas conocidas:

-La línea K562, es un modelo de leucemia mieloide crónica (LMC) con expresión génica y proteica de BCR-ABL1, resultado de una translocación cromosómica recíproca t(9,22)(q34;q11)(103). Fue establecida por Lozzio *et al.* a partir de muestras de derrame pleural de una mujer de 53 años con LMC en crisis blástica (182).

-La línea HEL, proviene de células de eritroleucemia positivas para la mutación  $JAK2^{V617F}$ (183), y fue establecida por Martin *et al.* a partir de una muestra de médula ósea de un varón de 30 años (184).

-La línea HL60 es un modelo de leucemia promielocítica aguda con reagrupamientos cromosómicos complejos que implican especialmente a los cromosomas 5, 7 y 16 (185). Fue establecida en 1977 por Collins *et al.* a partir de leucocitos de sangre periférica de una mujer de 36 años (186).

### 1.2. Líneas celulares empleadas en el estudio de la actividad antitumoral del compuesto seleccionado

Los ensayos que determinaron la actividad antitumoral del compuesto elegido tras el cribado, así como su selectividad antileucémica, se citan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Líneas celulares tumorales, etiología, origen y medio de cultivo para su mantenimiento.

| Tipo                     | Línea      | Enfermedad                    | Origen | Medio de cultivo |
|--------------------------|------------|-------------------------------|--------|------------------|
| Tumores hematológicos    | K562       | Leucemia mieloide crónica     | Humano | RPMI-1640        |
|                          | AR230      | Leucemia mieloide crónica     | Humano | RPMI-1640        |
|                          | MOLM-13    | Leucemia mieloide aguda       | Humano | RPMI-1640        |
|                          | HL60       | Leucemia promielocítica aguda | Humano | RPMI-1640        |
|                          | HEL92.1.7  | Eritroleucemia                | Humano | RPMI-1640        |
|                          | MV4.11     | Leucemia mieloide aguda       | Humano | RPMI-1640        |
|                          | JURKAT     | Leucemia linfoide aguda       | Humano | RPMI-1640        |
| Tumores no hematológicos | BT-549     | Adenocarcinoma de mama        | Humano | RPMI-1640        |
|                          | MDA-MB-231 | Adenocarcinoma de mama        | Humano | DMEM             |
|                          | MCF7       | Adenocarcinoma de mama        | Humano | RPMI-1640        |
|                          | HS-578T    | Adenocarcinoma de mama        | Humano | DMEM             |
|                          | SKBR3      | Adenocarcinoma de mama        | Humano | McCoy's 5A       |
|                          | ISHIKAWA   | Adenocarcinoma endometrial    | Humano | MEM              |

Los medios de cultivo de estas líneas celulares se suplementaron con 10% Suero Fetal Bovino (FBS), 2mM L-Glutamina y 1% Penicilina/Estreptomicina (PEST); además, las líneas BT-549 y MCF-7 requirieron de suplementación adicional con 1mM piruvato sódico (NaPyr) y 10mM HEPES.

### 1.3. Células empleadas para estudios de toxicidad *in vitro*

El estudio de la toxicidad asociada al compuesto se llevó a cabo en las líneas celulares no tumorales que se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Células no tumorales utilizadas en ensayos de toxicidad in vitro, origen y medio utilizado para su mantenimiento.**

| Línea                 | Modelo   | Origen              | Medio     |
|-----------------------|--|---------------------|-----------|
| <b>PBMC</b>           | Células mononucleares de sangre periférica       | Humano              | RPMI-1640 |
| <b>Linfocitos EBV</b> | Linfocitos inmortalizados (EBV+)                 | Humano              | RPMI-1640 |
| <b>RAW 264.7</b>      | Macrófagos (Abl-v +)                             | Ratón (Balb/c)      | DMEM      |
| <b>hMSC-TERT</b>      | Células Mesenquimales (telomerasa recombinante+) | Humano              | DMEM      |
| <b>MCF10A</b>         | Epitelio de glandula mamaria                     | Humano              | MEBM      |
| <b>Vero</b>           | Células epiteliales de riñón                     | Mono verde africano | DMEM      |

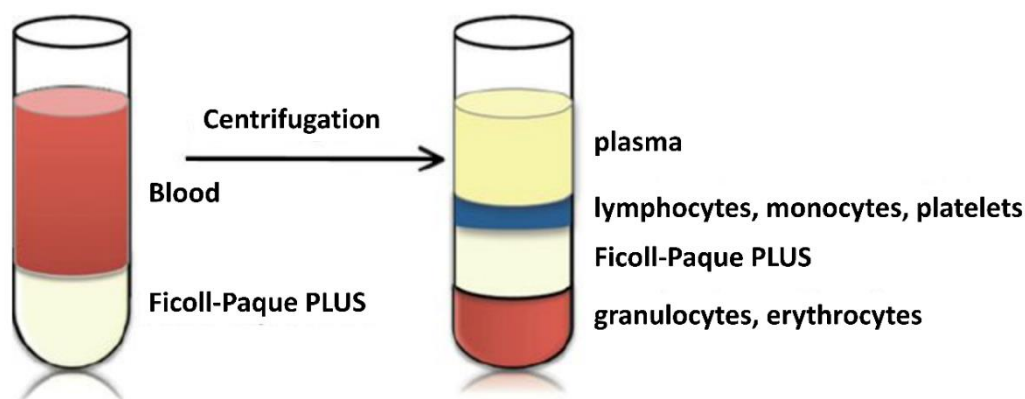
El medio en que se cultivaron las células citadas en la **Tabla 4** se suplementó con 10% FBS, L-Glutamina 2mM, PEST; a excepción de los linfocitos EBV que requieren de una suplementación con 20% de FBS, las hMSC-TERT que se crecieron en medio DMEM bajo en glucosa con suplemento de 10% FBS inactivado por calor (30 minutos a 56 °C), y las MCF10A que requieren la adición de factores de crecimiento para cultivos primarios (SingleQuots de Lonza, Basilea, Suiza).

### 1.3.1 Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica

Las PBMCs se aislaron de sangre de donantes sanos siguiendo el método descrito por Böyum en 1968 (187). Se trata de la técnica de Isopaque-Ficoll que permite la separación de linfocitos por gradiente de densidad aprovechando las diferencias en tamaño y densidad de las células sanguíneas, lo cual afecta a su velocidad de sedimentación (188) (**Figura 24**).

Para la separación de los linfocitos, la sangre tratada con anticoagulante (EDTA) se diluyó en un volumen igual de solución salina y se añadió sobre la solución Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences, Reino Unido) evitando su mezcla en un tubo de centrífuga. La centrifugación de los tubos a temperatura ambiente (400 g, 30 minutos) permitió la separación en capas de las células, ya que los eritrocitos y los granulocitos se agregan y atraviesan la capa de Ficoll-Paque PLUS, mientras que los linfocitos, los monocitos y las plaquetas quedan en la interfase entre el Ficoll y las capas de muestra sanguínea. La capa de la interfase se recogió cuidadosamente y se lavó dos veces con

medio o solución salina para retirar las plaquetas, la solución de Ficoll y el plasma, mediante centrifugaciones de 10 minutos a temperatura ambiente. De esta manera, se obtuvo una cantidad concentrada de linfocitos con alta viabilidad, que fueron contados para su posterior siembra y tratamiento en ensayos de metabolización mitocondrial.



**Figura 24. Protocolo de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).** Tomada de Bharadwaj *et al.* (2012) (188).

#### 1.4. Líneas celulares empleadas en el estudio de la actividad transcripcional dependiente de STATs

La determinación de los efectos del compuesto en la modulación de la actividad transcripcional dependiente de STAT5 y STAT3 fue determinada en las células comerciales de Abeomics (CA, EE. UU.) que se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5. Líneas celulares utilizadas en ensayos de actividad transcripcional de STATs, origen y medio de cultivo para su mantenimiento.**

| Línea  | Modelo  | Origen                                 | Medio     |
|--------|---|--|-----------|
| Ba/F3  | “STAT5 LEEPOTER™ Luciferase Reporter cell line” | Linfocitos B de (Ratón)                | RPMI-1640 |
| HEK293 | “STAT3 LEEPOTER™ Luciferase Reporter cell line” | Células embrionarias de riñón (Humano) | DMEM      |

Las células Ba/F3 se mantuvieron en medio “RPMI high glucose (HG)” con 10% FBS inactivado (30 minutos a 56°C), NaPyr 1 mM, HEPES 10 mM, 1% PEST, 5 ng/ml de Interleucina-3 murina (mIL-3) y 3 µg/ml de Puomicina. Las células HEK293 se cultivaron en medio DMEM HG con 10% FBS inactivado (30 minutos a 56°C), L-Glutamina 2mM, piruvato de sodio 1 mM, 1% PEST, 3 µg/ml de Puomicina. La mIL3



para BaF3 y la puromicina para ambas líneas se renovaron cada 2-3 días en cada pase.

### 1.5. Línea celular empleada en el estudio de sinergia e influencia del nicho tumoral

El estudio de sinergia entre el IM y el compuesto, así como de la influencia del nicho tumoral, se llevó a cabo en las células que se citan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Células usadas para ensayos de sinergia y para ensayos de influencia del nicho celular, origen y medio de cultivo de mantenimiento.**

| Línea     | Modelo  | Origen | Medio     |
|-----------|---|--------|-----------|
| K562-GFP+ | Leucemia mieloide crónica                         | Humana | RPMI-1640 |
| hMSC-TERT | Células Mesenquimales (telomerasa recombinante +) | Humano | DMEM      |

Las células K562-GFP+, que expresan de manera estable la *green fluorescent protein* (GFP) bajo el control del promotor *elongation factor 1-alpha* (EF1-  $\alpha$ ), se mantuvieron de igual forma que sus células parentales (K562) pero con la adición del antibiótico de selección puromicina (0,5  $\mu$ g/ml) en el medio de cultivo cada 2-3 días.

### 1.6. Líneas celulares utilizadas en el estudio de resistencia a IM

Los experimentos que permitieron investigar la actividad antitumoral del compuesto seleccionado sobre células resistentes a imatinib (IM) se llevaron a cabo con los modelos celulares que se muestran en la **Tabla 7**.

**Tabla 7. Células sensibles y resistentes a IM utilizadas en los ensayos de estudio de resistencia, origen, medio de cultivo para mantenimiento de células y mecanismo reconocido de generación de resistencia.**

| Línea      | Modelo                    | Origen | Medio     | Resistencia a IM                    |
|------------|---------------------------|--------|-----------|-------------------------------------|
| K562       | Leucemia mieloide crónica | Humana | RPMI-1640 | No presente                         |
| K562-R     | Leucemia mieloide crónica | Humana | RPMI-1640 | Sobreexpresión de Src quinasas      |
| AR-230     | Leucemia mieloide crónica | Humana | RPMI-1640 | No presente                         |
| AR230-R    | Leucemia mieloide crónica | Humana | RPMI-1640 | Sobreexpresión de BCR-ABL1          |
| KmycBT315I | Leucemia mieloide crónica | Humana | RPMI-1640 | mutación BCR-ABL1 T <sup>315I</sup> |

Todas las líneas se crecieron con 10% FBS, Glutamina 2mM y 1% PEST. Además, al medio de cultivo de las células K562-R y AR230-R se le añadió IM (1  $\mu$ M), renovándose cada 2-3 días en cada pase.

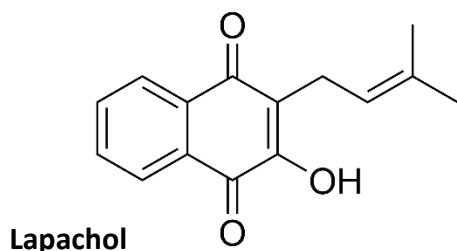
## 2. Series químicas investigadas

En este apartado se describen las características principales de las quimiotecas que fueron examinadas en el cribado para el descubrimiento de nuevas entidades con actividad antileucémica. La síntesis de los compuestos se realizó en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO), de la Universidad de La Laguna (ULL) en el laboratorio de la Dra. Ana Estévez Braun.

Para todos los compuestos estudiados se partió de una forma liofilizada que fue disuelta cuidadosamente en dimetilsulfóxido (DMSO) con el volumen preciso para obtener una concentración del stock de 50 mM. Posteriormente, todas esas soluciones stock fueron conservadas a -20 °C hasta su utilización experimental.

### 2. 1. Complejos metálicos con chalconas y lapachol

Esta quimioteca se compone de 31 compuestos que son complejos formados por ligandos tipo chalconas o quinonas y metales como el cobre (Cu), el cobalto (Co), el zinc (Zn) y el manganeso (Mn). Las chalconas son cetonas aromáticas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas que han sido asociadas con actividades antimicrobianas y citotóxicas (8). El lapachol (**Figura 25**), es una naftoquinona de origen natural con amplias actividades biológicas reconocidas (9).



**Figura 25.** Estructura química del lapachol, compuesto químico que se extrae de la corteza de árboles de la familia *Bignonaceae*. (PubChem CID 3884).

Por su parte, los complejos metálicos son capaces de mejorar la eficacia de las moléculas utilizadas como fármacos, y concretamente, en el caso de las naftoquinonas, esta asociación permite modular su actividad biológica (9,10). Un subgrupo de compuestos fue analizado en las líneas hematológicas K562, HEL y HL60 (**Tabla 8**).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 8. Primer subgrupo de la serie química “complejos metálicos con chalconas y lapachol”.**

| ID      | PM     | CANTIDAD (mg) | [mM] | DMSO (μL) |
|---------|--------|---------------|------|-----------|
| NQ      | 268,07 | 5,10          | 50   | 380,50    |
| NQCu(1) | 633,7  | 4,40          | 50   | 138,87    |
| NQNi(1) | 628,69 | 4,00          | 50   | 127,25    |
| NQZn(1) | 635,39 | 5,20          | 50   | 163,68    |
| NQMn(1) | 624,94 | 5,00          | 50   | 160,02    |
| NQCo(1) | 633,54 | 4,50          | 50   | 142,06    |
| NQCu(2) | 597,68 | 4,60          | 50   | 153,93    |
| Cuphen  | 778,28 | 4,00          | 50   | 102,79    |
| Niphen  | 775,04 | 3,30          | 50   | 85,16     |
| Znphen  | 781,62 | 3,80          | 50   | 97,23     |
| Mnphen  | 789,16 | 3,40          | 50   | 86,17     |
| Cophen  | 775,28 | 4,10          | 50   | 105,77    |
| JG-1    | 256,25 | 3,80          | 50   | 296,59    |
| JG-2    | 268,26 | 2,90          | 50   | 216,21    |
| JG-3    | 254,24 | 2,50          | 50   | 196,66    |
| JG-4    | 270,24 | 1,50          | 50   | 111,01    |

ID: identificación de los compuestos; PM: Peso Molecular de los compuestos; Cantidad: peso de los compuestos en miligramos; [mM]: concentración milimolar; DMSO (μl): volumen en microlitros de dimetilsulfóxido utilizado para ajustar la concentración de los compuestos.

El segundo subgrupo, se examinó en células de eritroleucemia (HEL) (**Tabla 9**).

**Tabla 9. Segundo subgrupo de la serie química “complejos metálicos con chalconas y lapachol”.**

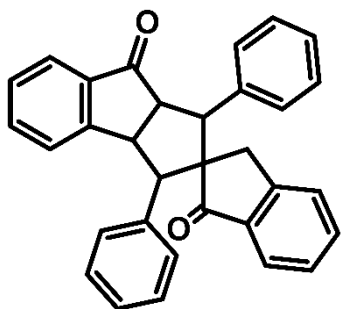
| ID                     | PM     | CANTIDAD (mg) | [mM] | DMSO (μL) |
|------------------------|--------|---------------|------|-----------|
| T-CH1-Cu               | 526,00 | 1,50          | 50   | 57,03     |
| CH6-Cu                 | 727,88 | 6,10          | 50   | 167,61    |
| CH2-Cu                 | 491,50 | 5,40          | 30   | 439,47    |
| CH6-Ru                 | 640,53 | 6,90          | 50   | 215,45    |
| CH3-Cuphen             | 474,03 | 6,60          | 50   | 278,46    |
| CH2-Ru                 | 527,49 | 1,60          | 50   | 60,66     |
| Cu-Lap                 | 727,00 | 9,10          | 50   | 250,34    |
| Co-Lap                 | 947,78 | 2,50          | 50   | 52,75     |
| [Cu(phen)(lap)2:CH2Cl2 | 727,00 | 4,20          | 50   | 115,54    |
| CH8-Cu                 | 580,00 | 2,80          | 50   | 96,55     |
| CH10-Cu                | 635,10 | 6,60          | 50   | 207,84    |
| CH9-Cu                 | 571,50 | 9,70          | 50   | 339,46    |
| Co-1                   | 947,78 | 2,70          | 50   | 56,98     |
| Co                     | 947,78 | 28,00         | 50   | 590,85    |
| CH3-Cu                 | 524,10 | 6,50          | 50   | 248,04    |

ID: identificación de los compuestos; PM: Peso Molecular de los compuestos; Cantidad: peso de los compuestos en miligramos; [mM]: concentración milimolar; DMSO (μL): volumen en microlitros de dimetilsulfóxido utilizado para ajustar la concentración de los compuestos.

## 2. 2. Espirodímeros

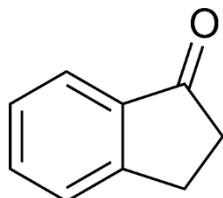
Esta quimioteca se compone de 47 compuestos tipo “espiro”. Un compuesto “espiro” es un compuesto químico, normalmente orgánico, que presenta una estructura de dos o más anillos que están unidos por un átomo común (**Figura 26**).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 26.** Estructura química general de los compuestos de la serie “espirodímeros”. (Elaborada por el grupo QUIBIONAT, ULL).

Estos compuestos son a su vez derivados de la indanona-1 (**Figura 27**), compuesto de origen sintético y que posee numerosas cualidades valiosas para la medicina, la agricultura o la síntesis de compuestos naturales. Entre las actividades biológicas de las 1-Indanona y sus derivados destacan la antivírica, antiinflamatoria, analgésica, antimalárica, antibacteriana y anticancerígena (189).



**1-Indanona**

**Figura 27.** Estructura química de la 1-Indanona. PubChem CID 6735.

En la **Tabla 10**, se encuentran las características que se tuvieron en cuenta para la disolución de los compuestos y posterior utilización experimental.

**Tabla 10.** Serie química “Espirodímeros”.

| ID    | PM  | CANTIDAD (mg) | [mM] | DMSO (μL) |
|-------|-----|---------------|------|-----------|
| SP-1  | 440 | 5,50          | 50   | 250,00    |
| SP-2  | 468 | 5,10          | 50   | 217,95    |
| SP-3  | 524 | 4,20          | 50   | 160,31    |
| SP-4  | 500 | 4,60          | 50   | 184,00    |
| SP-5  | 476 | 4,60          | 50   | 193,28    |
| SP-6  | 476 | 4,30          | 50   | 180,67    |
| SP-7  | 476 | 3,80          | 50   | 159,66    |
| SP-8  | 509 | 4,80          | 50   | 188,61    |
| SP-9  | 598 | 4,70          | 50   | 157,19    |
| SP-10 | 576 | 4,40          | 50   | 152,78    |
| SP-11 | 560 | 4,40          | 50   | 157,14    |
| SP-12 | 560 | 4,40          | 50   | 157,14    |
| SP-13 | 530 | 4,30          | 50   | 162,26    |

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

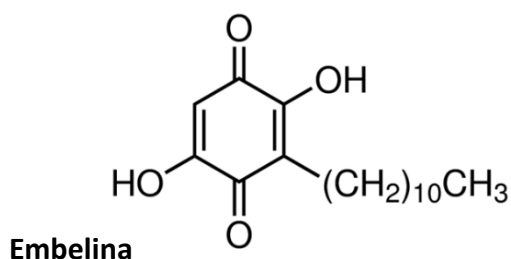
**Tabla 10 (continuación). Serie química “Espiroidímeros”.**

| ID    | PM  | CANTIDAD (mg) | [mM] | DMSO (μL) |
|-------|-----|---------------|------|-----------|
| SP-14 | 420 | 3,80          | 50   | 180,95    |
| SP-15 | 490 | 4,60          | 50   | 187,76    |
| SP-16 | 620 | 4,50          | 50   | 145,16    |
| SP-17 | 536 | 4,80          | 50   | 179,10    |
| SP-18 | 528 | 4,20          | 50   | 159,09    |
| SP-19 | 620 | 3,90          | 50   | 125,81    |
| SP-20 | 496 | 4,20          | 50   | 169,35    |
| SP-21 | 418 | 3,60          | 50   | 172,25    |
| SP-22 | 420 | 4,60          | 50   | 219,05    |
| SP-23 | 526 | 4,30          | 10   | 817,49    |
| SP-24 | 520 | 4,60          | 50   | 176,92    |
| SP-25 | 552 | 5,10          | 50   | 184,78    |
| SP-26 | 530 | 4,00          | 50   | 150,94    |
| SP-27 | 452 | 5,00          | 50   | 221,24    |
| SP-28 | 452 | 4,00          | 50   | 176,99    |
| SP-29 | 668 | 3,70          | 50   | 110,78    |
| SP-30 | 600 | 5,10          | 50   | 170,00    |
| SP-31 | 542 | 3,20          | 50   | 118,08    |
| SP-32 | 560 | 4,10          | 50   | 146,43    |
| SP-33 | 472 | 4,20          | 50   | 177,97    |
| SP-34 | 656 | 4,90          | 50   | 149,39    |
| SP-35 | 442 | 4,50          | 50   | 203,62    |
| SP-36 | 442 | 4,50          | 50   | 203,62    |
| SP-37 | 442 | 4,70          | 50   | 212,67    |
| SP-38 | 560 | 3,70          | 50   | 132,14    |
| SP-39 | 718 | 3,80          | 50   | 105,85    |
| SP-40 | 620 | 5,00          | 50   | 161,29    |
| SP-41 | 500 | 3,60          | 50   | 144,00    |
| SP-42 | 658 | 4,20          | 50   | 127,66    |
| SP-43 | 560 | 4,60          | 50   | 164,29    |
| SP-44 | 598 | 4,60          | 50   | 153,85    |
| SP-45 | 756 | 4,60          | 50   | 121,69    |
| SP-46 | 658 | 3,70          | 50   | 112,46    |
| SP-47 | 504 | 3,70          | 50   | 146,83    |

ID: identificación” de los compuestos; PM: Peso Molecular de los compuestos; Cantidad: peso de los compuestos en miligramos; [mM]: concentración milimolar; DMSO (μl): volumen en microlitros de dimetilsulfóxido utilizado para ajustar la concentración de los compuestos.

### 2.3. Derivados de Embelina fusionados a núcleos tipo pirazol o acridina

Esta serie química se compone de 70 derivados nitrogenados de embelina (**Figura 28**), una molécula de origen natural tipo quinona con actividad antiinflamatoria y anticancerígena (190). El primer subgrupo de estos compuestos (PMA-P), además contienen un núcleo de pirazol fusionado al anillo de dihidropiridina. Los pirazoles son grupos que se encuentran en menor medida en la naturaleza y que se asocian con actividades antimicrobianas, antivíricas, antiinflamatorias o antitumorales (191). El segundo subgrupo (PMA-Ac), son derivados tipo acridina en los que el anillo de dihidropiridina está fusionado a un anillo aromático. Es interesante comentar que las piridoacridinas tienen actividades biológicas importantes en la industria farmacológica, como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria o insecticida, y de forma destacada como antitumoral, concretamente contra líneas celulares de leucemia (192).



**Figura 28. Estructura química de la Embelina.** Es una para-benzoquinona natural que se aísla de bayas secas de las plantas *Embelia ribes*. PubChem CID 3218.

La serie PMA-P se compone de 38 compuestos, cuyas características principales se recogen en la **Tabla 11**.

**Tabla 11. Primer subgrupo de la serie química “Embelinas con núcleo pirazólico”.**

| ID      | PM     | CANTIDAD (mg) | [mM] | DMSO (μL) |
|---------|--------|---------------|------|-----------|
| PMA-P01 | 523,67 | 6,30          | 50   | 240,61    |
| PMA-P02 | 513,63 | 4,30          | 50   | 167,44    |
| PMA-P03 | 531,73 | 1,70          | 50   | 63,94     |
| PMA-P04 | 567,67 | 5,30          | 50   | 186,73    |
| PMA-P05 | 571,68 | 4,50          | 50   | 157,43    |
| PMA-P06 | 541,66 | 4,40          | 50   | 162,46    |
| PMA-P07 | 583,72 | 3,30          | 50   | 113,07    |
| PMA-P08 | 602,56 | 4,70          | 50   | 156,00    |
| PMA-P09 | 568,66 | 3,70          | 50   | 130,13    |
| PMA-P10 | 558,11 | 5,50          | 50   | 197,09    |

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 11 (continuación). Primer subgrupo de la serie química “Embelinas con núcleo pirazólico”.**

| ID       | PM     | CANTIDAD (mg) | [mM] | DMSO (μL) |
|----------|--------|---------------|------|-----------|
| PMA-P11  | 503,68 | 3,10          | 50   | 123,09    |
| PMA-P12  | 475,62 | 3,00          | 50   | 126,15    |
| PMA-P13  | 529,71 | 2,00          | 50   | 75,51     |
| PMA-P14  | 591,66 | 4,80          | 50   | 162,26    |
| PMA-P15b | 566,73 | 4,20          | 50   | 148,22    |
| PMA-P16a | 566,73 | 4,40          | 50   | 155,28    |
| PMA-P16b | 524,65 | 2,70          | 50   | 102,93    |
| PMA-P17  | 541,66 | 3,80          | 50   | 140,31    |
| PMA-P18  | 567,67 | 3,00          | 50   | 105,70    |
| PMA-P19  | 581,70 | 4,80          | 50   | 165,03    |
| PMA-P20  | 548,67 | 3,60          | 50   | 131,23    |
| PMA-P21  | 568,66 | 4,60          | 50   | 161,78    |
| PMA-P22  | 524,65 | 4,00          | 50   | 152,48    |
| PMA-P23  | 549,58 | 3,90          | 50   | 141,93    |
| PMA-P24  | 521,53 | 3,50          | 50   | 134,22    |
| PMA-P25  | 493,48 | 3,70          | 50   | 149,96    |
| PMA-P26  | 442,42 | 3,60          | 50   | 162,74    |
| PMA-P27  | 625,11 | 4,00          | 50   | 127,98    |
| PMA-P28  | 670,56 | 3,60          | 50   | 107,37    |
| PMA-P29  | 609,65 | 4,40          | 50   | 144,35    |
| PMA-P30  | 609,65 | 4,30          | 50   | 141,06    |
| PMA-P31  | 634,73 | 3,90          | 50   | 122,89    |
| PMA-P32  | 581,63 | 4,70          | 50   | 161,61    |
| PMA-P33  | 529,59 | 4,10          | 50   | 154,84    |
| PMA-P34  | 621,69 | 4,80          | 50   | 154,42    |
| PMA-P35  | 589,65 | 3,10          | 50   | 105,15    |
| PMA-P36  | 605,69 | 3,70          | 50   | 122,17    |

ID: identificación de los compuestos; PM: Peso Molecular de los compuestos; Cantidad: peso de los compuestos en miligramos; [mM]: concentración milimolar; DMSO (μL): volumen en microlitros de dimetilsulfóxido utilizado para ajustar la concentración de los compuestos.

La serie PMA-Ac la componen 32 compuestos con las características que se recogen en la **Tabla 12**.



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

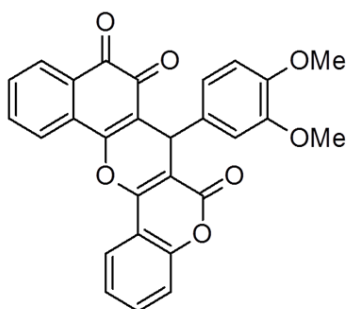
**Tabla 12. Segundo subgrupo de la serie química “Embelinas fusionadas a heterociclos de tipo acridinas”.**

| ID       | PM     | CANTIDAD (mg) | [mM] | DMSO (μL) |
|----------|--------|---------------|------|-----------|
| PMA-Ac1  | 457,60 | 2,30          | 50   | 100,52    |
| PMA-Ac2  | 536,50 | 3,00          | 50   | 111,84    |
| PMA-Ac3  | 492,05 | 3,80          | 50   | 154,46    |
| PMA-Ac4  | 475,59 | 3,80          | 50   | 159,80    |
| PMA-Ac5  | 502,60 | 4,00          | 50   | 159,17    |
| PMA-Ac6  | 475,59 | 3,20          | 50   | 134,57    |
| PMA-Ac7  | 485,66 | 3,30          | 50   | 135,90    |
| PMA-Ac8  | 517,66 | 2,60          | 50   | 100,45    |
| PMA-Ac9  | 515,64 | 3,30          | 50   | 128,00    |
| PMA-Ac10 | 463,63 | 3,50          | 50   | 150,98    |
| PMA-Ac11 | 475,59 | 3,20          | 50   | 134,57    |
| PMA-Ac12 | 532,63 | 4,10          | 50   | 153,95    |
| PMA-Ac13 | 581,50 | 3,20          | 50   | 110,06    |
| PMA-Ac14 | 455,59 | 2,20          | 50   | 96,58     |
| PMA-Ac15 | 534,48 | 3,30          | 50   | 123,48    |
| PMA-Ac16 | 490,03 | 3,30          | 50   | 134,69    |
| PMA-Ac17 | 473,58 | 3,10          | 50   | 130,92    |
| PMA-Ac18 | 473,58 | 2,60          | 50   | 109,80    |
| PMA-Ac19 | 483,64 | 3,90          | 50   | 161,28    |
| PMA-Ac20 | 515,64 | 2,00          | 50   | 77,57     |
| PMA-Ac21 | 500,48 | 2,50          | 50   | 99,90     |
| PMA-Ac22 | 513,62 | 2,90          | 50   | 112,92    |
| PMA-Ac23 | 461,62 | 3,80          | 50   | 164,64    |
| PMA-Ac24 | 528,64 | 6,30          | 30   | 476,69    |
| PMA-Ac25 | 530,61 | 3,40          | 50   | 128,15    |
| PMA-Ac26 | 473,58 | 2,00          | 50   | 84,46     |
| PMA-Ac27 | 369,50 | 2,90          | 50   | 156,97    |
| PMA-Ac28 | 397,55 | 2,10          | 50   | 105,65    |
| PMA-Ac29 | 399,52 | 2,20          | 50   | 110,13    |
| PMA-Ac30 | 414,49 | 2,00          | 50   | 96,50     |
| PMA-Ac31 | 448,39 | 3,40          | 50   | 151,65    |

ID: identificación” de los compuestos; PM: Peso Molecular de los compuestos; Cantidad: peso de los compuestos en miligramos; [mM]: concentración milimolar; DMSO (μl): volumen en microlitros de dimetilsulfóxido utilizado para ajustar la concentración de los compuestos.

#### 2.4. Análogos del híbrido naftoquinona-cumarina

Las naftoquinonas son compuestos de origen natural ampliamente utilizados como colorantes o como precursores de compuestos con actividad farmacológica. En concreto, esta serie contiene compuestos análogos a un híbrido naftoquinona-cumarina (NPQ-C6) (**Figura 29**), que fue seleccionado como compuesto líder precursor de esta quimioteca por sus propiedades antitumorales detectadas en leucemias humanas, destacando su efecto antitumoral frente a la LMC (74).



**Figura 29. Estructura química del híbrido naftoquinona-cumarina.** Compuesto líder de la serie JKST (NPQ-C6).

El compuesto líder puede ser modificado en distintas regiones, como son el grupo aldehído, la cumarina o el agrupamiento quinona (160). Los resultados de dichas variaciones dieron lugar a los compuestos de la serie “JKST” que se recogen en la **Tabla 13**.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 13. Serie química “Análogos del híbrido naftoquinona-cumarina”.**

| ID     | PM     | CANTIDAD (mg) | [mM] | DMSO (μL) |
|--------|--------|---------------|------|-----------|
| JKST1  | 478,45 | 6,00          | 50   | 250,81    |
| JKST2  | 478,45 | 4,40          | 50   | 183,93    |
| JKST3  | 458,46 | 3,50          | 50   | 152,69    |
| JKST4  | 458,46 | 5,80          | 50   | 253,02    |
| JKST5  | 458,46 | 6,00          | 50   | 261,75    |
| JKST6  | 430,41 | 4,20          | 50   | 195,16    |
| JKST7  | 436,41 | 4,60          | 50   | 210,81    |
| JKST8  | 448,42 | 4,30          | 50   | 191,78    |
| JKST9  | 436,41 | 6,00          | 50   | 274,97    |
| JKST10 | 448,42 | 3,70          | 50   | 165,02    |
| JKST11 | 416,42 | 3,50          | 50   | 168,10    |
| JKST12 | 416,42 | 4,20          | 50   | 201,72    |
| JKST13 | 444,48 | 4,10          | 50   | 184,49    |
| JKST14 | 448,47 | 6,50          | 50   | 289,87    |
| JKST15 | 474,38 | 5,40          | 50   | 227,67    |
| JKST16 | 446,45 | 4,10          | 50   | 183,67    |
| JKST17 | 434,44 | 4,10          | 50   | 188,75    |
| JKST18 | 418,40 | 3,50          | 50   | 167,30    |
| JKST19 | 462,41 | 4,50          | 50   | 194,63    |
| JKST20 | 450,40 | 4,80          | 50   | 213,14    |
| JKST21 | 538,50 | 3,20          | 50   | 118,85    |
| JKST22 | 496,46 | 4,80          | 50   | 193,37    |
| JKST23 | 466,41 | 3,20          | 50   | 137,22    |
| JKST24 | 454,40 | 4,00          | 50   | 176,06    |
| JKST25 | 496,46 | 3,80          | 50   | 153,08    |
| JKST26 | 538,50 | 3,60          | 50   | 133,70    |
| JKST27 | 496,46 | 4,50          | 50   | 181,28    |
| JKST28 | 538,50 | 4,30          | 50   | 159,70    |
| JKST29 | 191,14 | 2,60          | 50   | 272,05    |
| JKST30 | 236,18 | 3,00          | 50   | 254,04    |
| JKST31 | 164,11 | 2,80          | 50   | 341,23    |
| JKST32 | 252,24 | 3,20          | 50   | 253,73    |
| JKST33 | 180,18 | 3,10          | 50   | 344,10    |
| JKST34 | 178,18 | 4,00          | 50   | 448,98    |
| JKST35 | 425,43 | 3,50          | 50   | 164,54    |
| JKST36 | 204,18 | 4,20          | 50   | 411,40    |

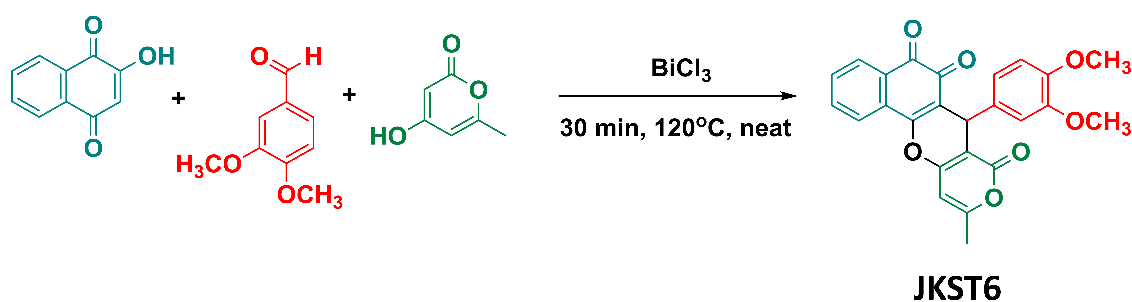
Tabla 13 (continuación). Serie química “Análogos del híbrido naftoquinona-cumarina”.

| ID     | PM     | CANTIDAD (mg) | [mM] | DMSO (μL) |
|--------|--------|---------------|------|-----------|
| JKST37 | 204,18 | 4,50          | 50   | 440,79    |
| JKST38 | 204,18 | 3,50          | 50   | 342,83    |
| JKST39 | 458,37 | 2,10          | 50   | 91,63     |
| JKST40 | 456,40 | 2,40          | 50   | 105,17    |
| JKST41 | 490,50 | 2,30          | 50   | 93,78     |
| JKST42 | 472,47 | 4,00          | 50   | 169,32    |
| JKST43 | 486,51 | 4,10          | 30   | 337,09    |
| JKST44 | 488,53 | 3,60          | 50   | 147,38    |
| JKST45 | 472,49 | 4,50          | 50   | 190,48    |
| JKST46 | 516,58 | 1,20          | 50   | 46,46     |
| JKST47 | 508,52 | 3,00          | 50   | 117,99    |
| JKST48 | 500,54 | 2,00          | 50   | 79,91     |

ID: identificación” de los compuestos; PM: Peso Molecular de los compuestos; Cantidad: peso de los compuestos en miligramos; [mM]: concentración milimolar; DMSO (μl): volumen en microlitros de dimetilsulfóxido utilizado para ajustar la concentración de los compuestos.

#### 2.4.1. Compuesto químico con actividad farmacológica seleccionado: JKST6

El producto JKST6 (**Figura 30**) es un híbrido naftoquinona-pirona, resultado de la reacción multicomponente entre 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (0,17 mmol), 3,4-dimetoxibenzaldehído (0,34 mmol) y 4-hidroxi-6-metil-2H-pirano-2-ona (0,34 mmol). Este compuesto constituye el centro de los estudios de esta tesis.

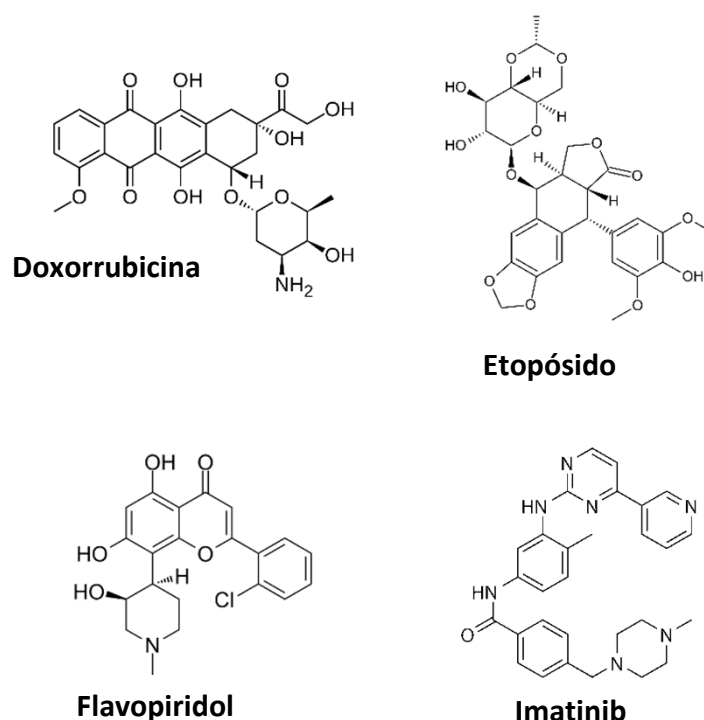


**Figura 30.** Síntesis de la molécula de JKST6 [7-(3,4-dimethoxyphenyl)-10-methylbenzo[h]pyrano[4,3-b]chromene-5,6,8(7H)-trione].

### 3. Fármacos

Para poder valorar los efectos antitumorales de los compuestos originales extraídos de las quimiotecas, se utilizaron fármacos con actividades citotóxicas conocidas y mecanismos moleculares identificados como controles positivos.

En primer lugar, como controles positivos de citotoxicidad se utilizaron la doxorrubicina, cuyo mecanismo molecular más destacado es su propiedad como agente intercalante entre las pares de bases de la doble hélice de ADN (PubChem CID 31703) y el flavopiridol, una dihidroxiflavona sintética capaz de inhibir CDK9 (PubChem CID 5287969). En segundo lugar, el etopósido, un análogo semisintético de la podofilotoxina cuyo mecanismo se vincula a su capacidad de inhibir a la Topoisomerasa II, se empleó como control positivo de apoptosis en ensayos realizados en células de LMC (K562) (PubChem CID 36462). Por último, para el estudio de la actividad moduladora de la vía BCR-ABL1/STAT5 se utilizó como control positivo el inhibidor de tirosina quinasa imatinib (IM, STI571) que posee como dianas principales Abl, Arg, *stem cell factor receptor* (c-KIT), PDGFR y, de manera destacable, BCR-ABL1 (91) (**Figura 31**).



**Figura 31. Estructuras químicas de los fármacos utilizados como controles positivos.** Concretamente, se utilizaron controles de citotoxicidad como doxorrubicina (PubChem CID 31703) y flavopiridol (PubChem CID 5287969), de apoptosis (etopósido, PubChem CID 36462) y de inhibición de la actividad tirosina quinasa de BCR-ABL1 (imatinib, PubChem CID 5291).

#### 4. Modelado molecular: determinación del *docking score*

Estos ensayos fueron realizados por el Dr. Ángel Amesty (QUIBIONAT, IUBO, ULL). Las estructuras cristalizadas correspondientes a los dominios quinasa de BCR-ABL1 y JAK2 fueron extraídas del *Protein Data Bank* (PDB code 1IEP, 1FPU, 1M52, 3CS9, 2HYY, 5HU9, 3K5U, 3QRI, 2GQG, 5CF4, 3TJD, 3TJC, 3FUP, y 3KCK). Las estructuras PDB fueron preparadas para la determinación del *docking score* usando el *Protein Preparation Workflow* accesible desde el programa Maestro 11.4 (193). Las moléculas de agua se retiraron a partir de 5 Å, las correcciones de las uniones se aplicaron a los ligandos co-cristalizados y se realizó un muestreo exhaustivo de las orientaciones de los grupos. Finalmente, los receptores se optimizaron en Maestro 11.4 usando el campo de fuerza OPLS3 antes del estudio de *docking*. En la fase final de optimización y minimización de los complejos ligando-proteína se utilizó el campo de fuerza OPLS3 y se utilizó el valor de 0,30 Å para la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) por defecto para los átomos no-hidrógeno.

Las cuadrículas (grids) de los receptores se generaron utilizando las proteínas preparadas, con las *docking grids* en el centro de la unión del ligando a cada receptor. La cuadrícula (grid) del receptor se generó utilizando un factor de escala de radio de Van der Waals (vdW) de 1,00 y un corte de carga parcial de 0,25. Los sitios de unión se delimitaron en una “caja” de 20 Å de *grid* con los parámetros establecidos por defecto y sin restricciones. Las estructuras tridimensionales del ligando para el *docking* se generaron y prepararon utilizando LigPrep como se implementó en Maestro 11.4 para producir los estados de ionización más probables a  $\text{pH} = 7 \pm 1$  (mantener el estado de ionización original). En esta etapa se aplican una serie de tratamientos a las estructuras. Finalmente, las geometrías son optimizadas utilizando el campo de fuerza OPLS3. Estas conformaciones se utilizaron como entrada inicial para el *docking*. Los ligandos se acoplaron utilizando el modo de precisión extra (XP) sin utilizar ninguna restricción y con un factor de escalado de radio de Van der Waals (vdW) de 0,80 y un corte de carga parcial de 0,15. Los *dockings* se llevaron a cabo con la flexibilidad de los residuos del bolsillo cercano al ligando. Las poses del ligando generadas se evaluaron con la función de puntuación empírica, XPGLideScore, una versión modificada de ChemScore. XPGLideScore implementado en Glide, se utilizó para estimar la afinidad de unión y clasificar los ligandos. El XP Pose Rank se utilizó para seleccionar la mejor posición para

la unión de cada ligando. La mejor correlación para la inhibición de BCR-ABL1 y JAK2 y los mejores valores de *docking score* se obtuvieron cuando se utilizaron 2GQG y 5CF4.

### 5. Cribado de las series químicas

El cribado de quimiotecas permite la selección de compuestos con actividad farmacológica de relevancia terapéutica y puede realizarse siguiendo una aproximación experimental y computacional.

En este trabajo, la selección de nuevos compuestos químicos con actividad biológica antitumoral se ha llevado a cabo siguiendo una estrategia que combina el cribado basado en el fenotipo (PDD, *Phenotypic Drug Discovery*) y el cribado basado en la diana (TDD, *Target-based Drug Discovery*) (194). Esto permite la detección de compuestos activos biológicamente evitando el sesgo de considerar una única diana predeterminada (139). Posteriormente, partiendo de la identificación del compuesto activo, se descifra su diana/dianas moleculares de forma que se acorta el tiempo de cribado que conduce al descubrimiento de nuevos productos farmacológicos (121). De forma más detallada, en nuestro proyecto se parte de series químicas que han sido sintetizadas a partir de compuestos líderes eficaces experimentalmente (alta citotoxicidad en células tumorales con dianas conocidas) y computacionalmente (valores de acoplamiento molecular o *docking score* que predicen alta afinidad de unión del compuesto a la diana). A continuación, los compuestos sintetizados a partir de estos líderes son analizados por métodos fenotípicos que detectan cambios en la viabilidad de modelos celulares con características patológicas conocidas. Este método de cribado inicial sigue las recomendaciones del NCI (EE. UU.) que aconseja ensayar los compuestos en distintos tipos de líneas tumorales humanas que representen una variedad de tumores con desregulación molecular determinada (195).

Los ensayos de PDD que se realizaron en este proyecto consisten en la realización de ensayos colorimétricos de metabolización mitocondrial de la sal de tetrazolio 3-(4,5-methyliazol-2yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (196), cuya técnica se explica en detalle más adelante, para investigar el efecto de los compuestos a una dosis única (10  $\mu$ M) sobre la viabilidad celular de las líneas tumorales seleccionadas. Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se trataron con los distintos compuestos durante 48-72 horas. Aquellos que mostraron una inhibición de la viabilidad celular (S) superior al 60 % ( $S > 60$  %;  $S = 100$  - viabilidad celular en % respecto a las

células tratadas con el vehículo), fueron seleccionados para realizar ensayos de dosis-efecto. En dichos ensayos, se utilizaron 6 niveles de concentración (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) de cada compuesto para calcular sus potencias inhibitorias (concentración inhibitoria media máxima o IC50) (197) sobre cada línea celular. Esto permitió clasificarlos por su potencia y selectividad.

Los datos del cribado se muestran en tablas, que recogen la siguiente información:

- Los efectos de los productos a una dosis única (10  $\mu\text{M}$ ) sobre la viabilidad celular (porcentaje de inhibición de viabilidad celular (S), 0-100 %) a 48-72 horas postratamiento.
- Para los productos más activos ( $S > 60\%$ ), se muestran sus respectivos valores de potencia inhibitoria (concentración que inhibe la viabilidad celular al 50% (IC50), media (m)  $\pm$  desviación estándar de los replicados de IC50 (SD)), resultado de los estudios dosis-respuesta realizados durante 48-72 horas.

A partir de estos resultados, se seleccionó un subgrupo de compuestos activos con un valor de IC50  $< 5 \mu\text{M}$ , que tuviesen propiedades químicas de interés (estables en su posición orto o para). De forma complementaria, los compuestos más activos fueron sometidos a estudios de tipo ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) *in silico* (QUIBIONAT, IUBO, ULL). Los parámetros medidos en estos estudios analizan las características farmacocinéticas de los compuestos, y permiten hacer un cribado con conocimientos que complementan los resultados obtenidos *in vitro* para reducir la tasa de fracaso de los compuestos a lo largo del proceso de selección. Evidentemente, el proceso de interacción fármaco-organismo *in vivo* es sumamente complejo, por lo que estas modelizaciones lo simplifican utilizando datos de los principales componentes implicados o lo dividen en múltiples procesos individuales (p. ej. Se considera una única enzima hepática para el estudio de la biotransformación, o se estudia la distribución del fármaco por su capacidad de unión a proteínas séricas o por la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica) (198). Los nombres y la definición de estas propiedades objeto de investigación se detallan en la **Tabla 14**.



Tabla 14. Parámetros del perfil ADME investigados *in silico* y sus rangos de variación.

| Propiedades | Rango (valores)                     | Definiciones  |
|-------------|-------------------------------------|---|
| #stars      | 0-1                                 | Similitud con otros fármacos (número de valores que caen fueran del rango del 95% de los valores de los fármacos conocidos) |
| CNS         | -2 (inactivo) a +2 (activo)         | Predicción de la actividad en el sistema nervioso central   |
| QPlogBB     | -3.0 a 1.2                          | Predicción del coeficiente de partición cerebro/sangre  |
| QPPCaco2    | <25 deficiente<br>>500 eficiente    | Predicción de la permeabilidad en la línea de adenocarcinoma colorrectal humana medida en nm/s.                             |
| QPPMDCK     | <25 deficiente<br>>500 eficiente    | Predicción de la permeabilidad en la línea de riñón canina Madin-Darby en nm/s.   |
| QPlogKhsa   | -1.5 a 1.5                          | Predicción de la unión a la albúmina humana sérica  |
| QPlogPo/w   | -2.0 a 6.5                          | Predicción del coeficiente de partición Octanol/Agua  |
| QPlogKp     | -8.0 a -1.0                         | Predicción de la permeabilidad en la piel   |
| QPlogS      | -6.5 a 0.5                          | Predicción de la solubilidad acuosa   |
| #metab      | 1 a 8                               | Número de reacciones metabólicas probables  |
| % HOA       | <80% alta<br><25% baja              | Predicción de la absorción oral humana de 0 al 100%   |
| HOA         | 1, 2 o 3 para bajo,<br>medio o alto | Predicción cualitativa de la absorción oral humana  |
| PSA         | 7 a 200                             | Área de superficie de las fuerzas de Van der Waals de los átomos polares (nitrógeno, oxígeno) y de carbonilos               |
| SASA        | 300 a 1000                          | superficie total accesible al disolvente  |
| MW          | 130 a 725                           | Peso molecular  |
| # rotor     | 0 a 15                              | Número de enlaces rotables no-triviales y no entorpecidos   |

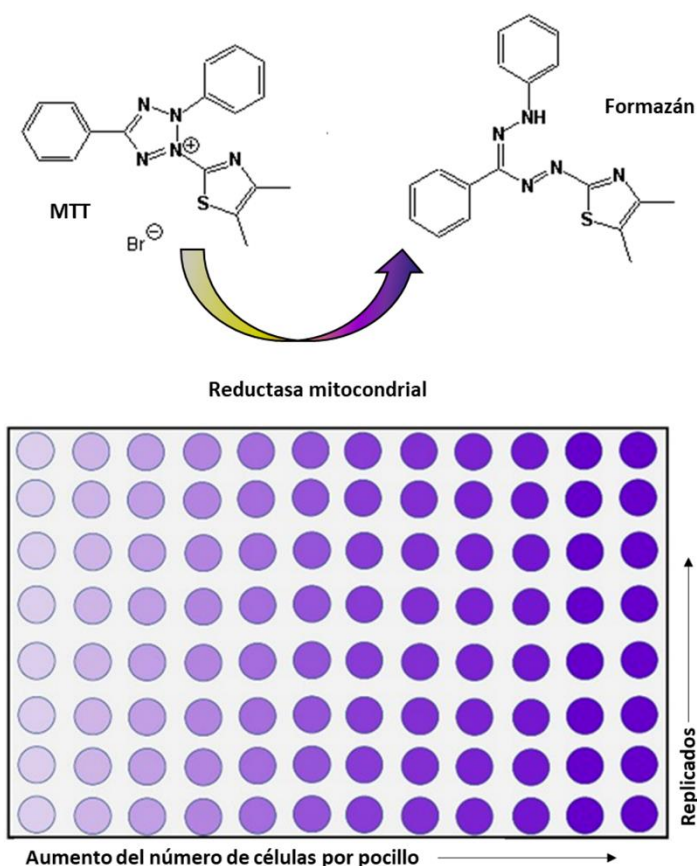
Una vez seleccionado el compuesto objeto de investigación, se emplearon técnicas TDD, que permitieron investigar las dianas moleculares y vías de señalización afectadas por el producto: medición de actividad transcripcional de STAT5 y STAT3 mediante líneas celulares que expresan el *reporter gene* de luciferasa, expresión proteica y génica de BCR-ABL1, entre otras.

## 6. Estudios de viabilidad celular

### 6.1. Estudios de metabolización mitocondrial de sales de tetrazolio

La determinación del efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular se investigó mediante la cuantificación de la metabolización mitocondrial de MTT (Applichen, Germany), según el método descrito por Mosmann en 1983 (196).

Este método aprovecha la actividad reductora de las enzimas mitocondriales de las células vivas, que cortan el anillo de tetrazolio, mientras que las células muertas o el medio de cultivo son incapaces de modificarla. El MTT inalterado es amarillo, y una vez se corta por dichas enzimas, se forman cristales de formazán azul oscuro. La cantidad de color azul oscuro del formazán es proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas (196) (**Figura 32**).



**Figura 32. Representación de la metabolización de MTT.** Adaptada del protocolo de determinación de viabilidad y de proliferación celular de Sigma Aldrich.

En estos ensayos, se sembraron las células a una densidad que permitiera su crecimiento exponencial, determinada previamente en curvas de crecimiento. En nuestro estudio se sembraron entre 5.000-10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos durante 48-72 horas de tratamiento. Como excepción, las PBMCs se sembraron a 100.000 células por pocillo durante 24 horas de tratamiento.

Las células se trataron con vehículo (0,05% DMSO) o con compuestos (0,01 a 30  $\mu$ M) durante 24–72 horas. Después, se añadió a las células el MTT que fue incubado entre 2–4 horas a 37 °C. A continuación, se lisaron las células en 10% SDS y una vez el color fue uniforme, se leyó la densidad óptica a 595 nm con un lector de placas iMark Microplate Reader (Bio–Rad, CA, EE. UU.).

Esta técnica fue empleada en este trabajo para el cribado fenotípico o (PDD) de las series químicas, la realización de curvas de crecimiento, estimación de IC50 de fármacos o estudios de la irreversibilidad del efecto (*wash-out*).

#### **6.1.1. Ensayos de *wash-out***

Este ensayo permite conocer el impacto de una corta exposición del tratamiento sobre la viabilidad celular para descubrir si los compuestos estudiados poseen mecanismos reversibles o permanentes (73,199). Las células se sembraron a 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y posteriormente se trataron con vehículo (0.05% DMSO), JKST6, IM o DOXO durante 3 o 6 horas. Posteriormente, los compuestos fueron retirados lavando intensamente con medio de cultivo (3 lavados retirando medio y añadiendo 150 $\mu$ l de medio nuevo) y las placas se incubaron a 37 °C entre lavados (durante 20 minutos). Después, las células se dejaron en medio fresco sin tratamiento durante 48 horas más. Finalmente, se determinó la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT (196).

#### **6.2. Ensayo de viabilidad celular por exclusión con azul tripán**

Estos experimentos fueron realizados en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC) por el grupo del Dr. Javier León, Universidad de Cantabria-CSIC, Santander.

El funcionamiento de esta técnica se basa en que las membranas de las células vivas están intactas y son, por tanto, impermeables a ciertos colorantes como el azul tripán, que sólo penetra en las células muertas (donde la integridad de la membrana está comprometida) tiñéndolas de azul mientras que las viables permanecen incoloras al

microscopio. Así, para estos estudios, las células se sembraron y trataron de igual forma que en los ensayos de metabolización de MTT. Tras 48-72 horas, se contabilizaron las células viables respecto a las células totales presentes en una alícuota de cada condición experimental, siguiendo el protocolo descrito por Strober (200).

## **7. Estudios de fotomicroscopía a tiempo real**

Estos ensayos se realizaron en el sistema IncuCyte™ (Essen BioScience, UK) que permite el análisis y cuantificación de los cambios fenotípicos de las células vivas a tiempo real sin interferencias por parte del investigador.

### **7.1. Cultivos celulares en dos dimensiones (2D)**

Se utilizaron placas de 96 pocillos pretratadas con polilisina (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) para garantizar una disposición uniforme de las células en suspensión, que fueron sembradas a 5.000 células por pocillo. Tras dejar estabilizar la monocapa de células durante 16 horas, se añadió el tratamiento con vehículo (0,05% DMSO) o compuestos (0,01–10  $\mu$ M). Para analizar la integridad de la membrana celular se añadió YOYO-1 (25 nM) (Invitrogen), agente no citotóxico que penetra en las células que poseen su membrana dañada y se intercala en el ADN aumentando notablemente su fluorescencia (74).

La proliferación celular y la citotoxicidad fueron monitorizadas durante 5 días. Después, los parámetros medidos como confluencia en contraste de fase y en fluorescencia verde fueron extraídos y transformados en valores de área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*) para estudiar la cinética y los efectos dependientes de la dosis de los compuestos. Estos análisis también permiten identificar el comportamiento citostático o citotóxico de los compuestos analizados.

### **7.2. Cultivos celulares en tres dimensiones (3D)**

Los resultados obtenidos en 2D se complementaron con estudios a tiempo real en placas de 96 pocillos con fondo redondeado y de fijación ultra baja (ULA, Corning) que permitieron analizar el crecimiento en 3D de los cultivos (esferoides). Las células (K562, AR230, AR230-R) se sembraron a una densidad de 3.000 células por pocillo. Después de 24 horas de la formación del esferoide, se realizó el tratamiento con vehículo (0,05% DMSO), JKST6 (2, 3 y 5  $\mu$ M) o IM (0,5 y 1  $\mu$ M). Posteriormente, se registró el tamaño

y la citotoxicidad de los esferoides durante 5 días (201).

Para hacer el cálculo del volumen del esferoide se extrajeron medidas de confluencia celular con dos tipos de parámetros diferentes: *average phase object area* ( $\mu\text{m}^2$ ) y *object count* (1/image), los cuales se multiplicaron para obtener la *total object area* ( $\mu\text{m}^2$ ), a partir de la cual se calculó el radio ( $r = \sqrt{\text{Total Object Area}/\pi}$ ) y el volumen del esferoide ( $\mu\text{m}^3$ ) ( $V = 4/3 \pi r^3$ ) (201).

### **8. Ensayos de medición de actividad transcripcional de STATs mediante líneas celulares *reporter* de luciferasa**

El efecto del compuesto JKST6 sobre la actividad transcripcional mediada por STAT5 y STAT3 fue estudiada en las líneas celulares Ba/F3 y HEK293 *Renilla Luciferase Reporter cell lines* (Leeporter™ Abeomics, **Tabla 5**), respectivamente. Son líneas que han sido transfectadas de forma estable para expresar el gen *Renilla Luciferase* bajo el control transcripcional del promotor que responde a STAT3 y STAT5. Por tanto, estos modelos hacen posible el estudio de la actividad transcripcional de dichos STATs y su modulación por los tratamientos de estudio.

En estos ensayos, se sembraron 600.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos en el caso de la línea BaF3 y 500.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos en el caso de las HEK293. Posteriormente, las células se trataron con vehículo (0,05% DMSO) o JKST6 (0,3–10  $\mu\text{M}$ ) durante 4 horas seguido de la estimulación de las BaF3 con 30 ng/ml de Interleucina-3 murina (mIL3) y de las HEK293 con 10 ng/ml de Interleucina-6 humana (hIL6) durante 16 horas. Después, las células se lisaron en *Passive Lysis Buffer* (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y la actividad luciferasa se midió utilizando el kit *Renilla-Firefly Luciferase Assay* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) en un lector de placas (Clarity™ R2, BioTek, Winooski, VT, EE. UU.). Los resultados se expresaron como unidades relativas de luciferasa o *relative luciferase units* (RLUs) por mg de proteína, normalizados por los valores obtenidos en las células tratadas con vehículo. Simultáneamente, se realizaron ensayos de MTT con los mismos tratamientos (dosis y tiempos) para investigar el posible efecto de los compuestos en la viabilidad de las líneas celulares que expresan el *reporter gene* de luciferasa.

## 9. Análisis del ciclo celular y apoptosis

### 9.1. Citometría de flujo

Estos experimentos se realizaron en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), CSIC y CIBERONC y el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) del grupo de investigación del Dr. Atanasio Pandiella.

Para el estudio del ciclo celular se utilizaron células K562 no sincronizadas, que se sembraron a 300.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Se trataron con vehículo (0,05% DMSO) o JKST6 (1, 1,5 y 2  $\mu\text{M}$ ) durante 12, 24 y 48 horas. Tras el tratamiento, se recogieron las células, se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y se fijaron en 70% de etanol frío *overnight*. Posteriormente, las células se suspendieron en PBS conteniendo *DNAse-free RNAse* (500  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 2 horas a 37 °C, se incubaron con yoduro de propidio (PI, *Propidium Iodide*) (5  $\mu\text{g/ml}$ ), y se analizaron en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD).

Para medir la muerte celular en células K562 se estudiaron las mismas condiciones con un kit *FITC-Annexin V Apoptosis Detection* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Brevemente, las células se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de *binding buffer* (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) con 5  $\mu\text{l}$  de Anexina V-FITC y 5  $\mu\text{l}$  de PI (50  $\mu\text{g/ml}$ ) en hielo y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de *binding buffer* adicionales y las muestras se pasaron por el citómetro de flujo Accuri C6 (BD). En ambos experimentos se analizaron 50.000 eventos mediante separación celular por citometría de flujo o *fluorescence-activated cell sorting* (FACS).

### 9.2. Tinción con bisbencimida

La apoptosis temprana fue evaluada utilizando la tinción con bisBenzimide Hoescht 33258 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.) que facilita la observación de la morfología nuclear (74). Para ello, las células K562 se sembraron a 125.000 células/ml en placas de 100 mm y se trataron con vehículo o JKST6 (1, 2  $\mu\text{M}$ ) durante 24 y 48 horas. Después las células se lavaron, se fijaron en 3% paraformaldehído, y se mezclaron con 20  $\mu\text{l}$  Hoescht (16  $\mu\text{g/ml}$ ) en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para contar la proporción de núcleos apoptóticos respecto a núcleos totales en la muestra se utilizaron microfotografías fluorescentes.

### 9.3. Medición de la actividad de las caspasas

Las células K562 se sembraron a 250.000 células por ml en placas de cultivo de 100 mm y se trataron con vehículo (0,05% DMSO) o JKST6 (2  $\mu$ M) durante 6, 12 y 24 horas o etopósido (30  $\mu$ M) como control positivo durante 24 horas. Posteriormente, se resuspendieron los pellets celulares en buffer de lisis (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, aprotinina y PMSF), se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes para el ensayo enzimático.

En el ensayo se utilizaron péptidos específicos que son sustratos conocidos de las caspasas e incluyen el residuo de corte (Aspartato) fusionado a un marcador colorimétrico. Concretamente, se utilizaron *N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroaniline* (DEVDpNA), *N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroaniline* (IETD-pNA), y *N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-p-nitroaniline* (LEHD-pNA) (Calbiochem, San Diego, CA) para las caspasas 3, 8 y 9, respectivamente. Dichos péptidos son cortados por la caspasa correspondiente produciendo la liberación de la p-nitroanilina (pNA), que incrementa la absorbancia en 405 nm proporcionalmente a la actividad caspasa. Los resultados se expresaron como absorbancia a 405 nm por mg de proteína, normalizados por la actividad detectada en células tratadas con vehículo (0,05% DMSO).

### 9.4. Medición de Anexina V a tiempo real

La activación de la apoptosis puede ser investigada a tiempo real utilizando el kit *IncuCyte Annexin V Reagents* (Essen BioScience, UK) en el sistema *IncuCyte*<sup>TM</sup> (Essen BioScience, UK) (202). Los reactivos del mencionado kit afectan específicamente a células apoptóticas, ya que en estas se pierde la asimetría de la membrana plasmática con la exposición de la fosfatidilserina en la superficie extracelular. Esto permite la unión de la Anexina V que entonces produce un brillo fluorescente estable.

Para estos ensayos, las células K562 se sembraron a una densidad de 5.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y tras 16 horas, se trataron con vehículo (0,05% DMSO), IM (3  $\mu$ M) o JKST6 (2  $\mu$ M). Los reactivos de marcaje de apoptosis fueron combinados también con estudios de confluencia celular durante 72 horas. De esta manera, se permite calcular la proporción de objetos rojos fluorescentes detectados por pocillo (Anexina V unida a fosfatidilserina) respecto al total de objetos detectados por pocillo (la ocupación total del pocillo).

## 10. Análisis de proteínas

Para el análisis de la expresión proteica, las células se sembraron a 300.000 células/ml en placas de 100 mm y se trataron con vehículo (0,05% DMSO) o compuestos a las dosis y tiempos correspondientes a cada experimento. Seguidamente, se lavaron con PBS-ortovanadato (1 mM) frío, se centrifugaron y resuspendieron en buffer RIPA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para producir la lisis celular, las células se sometieron a agitación durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, los lisados se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes que contienen las proteínas. La cantidad de proteína se cuantificó utilizando el método del ácido bicinónico (BCA) (Bio-Rad, CA, EE. UU.).

Para la detección de proteínas específicas por inmunoblot, los lisados celulares se desnaturalizaron (5 minutos a 95 °C en tampón de carga), se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE (6,5 – 12 %) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (iBlot® Gel Transfer Stacks; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para evitar uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon en 5% albúmina de suero bovino (BSA) o 1% BSA-1% blotto para los anticuerpos específicos de las formas fosforiladas de diferentes proteínas (Merck, Darmstadt, Alemania), o 5% blotto para los anticuerpos específicos de determinadas proteínas totales (Merck, Darmstadt, Alemania) diluidos en *Tris-buffered saline* con 0,05% del detergente Tween 20 (TBS-T) durante 1-2 horas. A continuación, las membranas se incubaron a 4 °C con la dilución correspondiente de los anticuerpos primarios citados en la **Tabla 15** durante toda la noche.



Tabla 15. Anticuerpos primarios, casas comerciales y diluciones utilizados en los experimentos de inmunoblot.

| Ac primario                  | Casa comercial | Dilución | Ac primario           | Casa comercial | Dilución |
|------------------------------|----------------|----------|-----------------------|----------------|----------|
| pSTAT5 <sup>Y694</sup>       | CST            | 1:1000   | pCDK1 <sup>Y15</sup>  | CST            | 1:8000   |
| STAT5                        | CST            | 1:1000   | pWee1 <sup>S642</sup> | CST            | 1:3000   |
| pBCR <sup>Y177</sup>         | CST            | 1:1000   | Wee1                  | CST            | 1:4000   |
| BCR                          | CST            | 1:1000   | p27                   | CST            | 1:3000   |
| pABL1 <sup>Y412</sup>        | CST            | 1:1000   | p21                   | CST            | 1:1000   |
| ABL                          | CST            | 1:1000   | pChk1 <sup>S296</sup> | CST            | 1:2500   |
| pJNK <sup>T183/Y185</sup>    | CST            | 1:500    | pChk2 <sup>T68</sup>  | CST            | 1:5000   |
| JNK1/3                       | SCB            | 1:1000   | caspase-8             | CST            | 1:1000   |
| pAKT <sup>S473</sup>         | CST            | 1:500    | caspase-9             | CST            | 1:1000   |
| pAKT <sup>T308</sup>         | CST            | 1:1000   | caspase-3             | SCB            | 1:1000   |
| AKT                          | CST            | 1:1000   | γH2AX                 | CST            | 1:3000   |
| pERK1/2 <sup>T202/Y204</sup> | CST            | 1:2000   | c-MYC                 | SCB            | 1:1000   |
| ERK1/2                       | CST            | 1:1000   | cyclin B              | SCB            | 1:3000   |
| pCrkL <sup>Y207</sup>        | CST            | 1:1000   | Mcl-1                 | SCB            | 1:2000   |
| CrkL                         | CST            | 1:1000   | calnexin              | SCB            | 1:5000   |
| pS6 <sup>S240/244</sup>      | CST            | 1:1000   | β-actin               | SCB            | 1:5000   |
| S6                           | CST            | 1:1000   | Cyclin A              | BDTL           | 1:5000   |
| PIM1                         | CST            | 1:1000   | BUBR1                 | BDTL           | 1:3500   |
| pRB <sup>S780</sup>          | CST            | 1:5000   | Polyubiquitin         | EMDM           | 1:1000   |
| pRB <sup>S807/S811</sup>     | CST            | 1:5000   | pH 3 <sup>S10</sup>   | EMDM           | 1:5000   |
| Cyclin E                     | CST            | 1:4000   |                       |                |          |

CST: Cell signaling Technology; SCB: Santa Cruz Biotech, BDTL: BD transduction Laboratories, EMDM: EMD Millipore.

Al día siguiente, tras los lavados con TBS-T para retirar exceso de anticuerpo primario, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (*goat anti-rabbit* y *goat anti-mouse* **Tabla 16**, Bio–Rad, CA, EE. UU.) conjugados con peroxidasa de rábano o *horseradish peroxidase* durante una hora, en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente, tras los últimos lavados, las bandas se visualizaron mediante el revelado de la señal emitida por quimioluminiscencia con la utilización del kit *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio–Rad, CA, EE. UU.) en el ChemiDoc XRS system (Bio–Rad, CA, EE. UU.). Las imágenes fueron analizadas con el software Quantity One (Bio–Rad, CA, EE. UU.).

Tabla 16. Anticuerpos secundarios, casas comerciales y diluciones utilizados en los experimentos de inmunoblot.

| Ac secundarios                              | Casa comercial | Dilución |
|---|----------------|----------|
| goat anti-rabbit- IgG (H + L)-HRP Conjugate | Bio–Rad        | 1:3000   |
| goat anti-mouse- IgG (H + L)-HRP Conjugate  | Bio–Rad        | 1:3000   |

## 11. Análisis de ARN

Para realizar la extracción del ARN se partió de cultivos celulares sembrados a 300.000 células por ml en placas de 100 mm que fueron tratados con vehículo (0,05% DMSO), JKST6 (3  $\mu$ M) o IM (1  $\mu$ M) durante 1, 3, 6 y 12 horas. Posteriormente, las células se recogieron y el ARN total se aisló utilizando *PureZOL RNA Isolation Reagent* (Bio–Rad, CA, EE. UU.). La concentración de ARN y su pureza se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Wilmington, EE. UU.). Se utilizó 1  $\mu$ g de ARN para realizar la retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) usando el kit iScript™ (Bio–Rad, CA, EE. UU.) con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

La PCR a tiempo real (qPCR) fue realizada utilizando la *Master Mix SYBR Green* (Applied Biosystems, Massachusetts, EE. UU.). Los cebadores específicos (**Tabla 17**) se diseñaron con la herramienta *primer-BLAST* (NCBI-NIH) (203) y fueron sintetizados por *STAB VIDA* (Caparica, Portugal). La amplificación génica fue determinada en un *Mx3005P qPCR System* (Agilent, CA, EE. UU.). Los valores de *cycle threshold* o Ct se determinaron con el software *MxPro qPCR* (Agilent, CA, EE. UU.) y la expresión de los genes investigados se normalizó por la del gen *GAPDH* utilizado como *housekeeping*. Se realizaron dos replicados de cada tratamiento y se utilizó la media de los valores de Ct para obtener la expresión relativa según el método comparativo de Ct para qPCR (204).

**Tabla 17. Nombre de los genes y secuencia de los cebadores (5'- 3') utilizados en la qPCR.**

| Gen          | Cebador <i>Forward</i> (5'-3')             | Cebador <i>Reverse</i> (5'-3')             |
|--------------|--|--|
| <b>BCR</b>   | GGA GTC ACT GCT GCT GCT TA                 | ACA CTT CTT CTG CTG CTC CC                 |
| <b>b3a2</b>  | GAG CGT GCA GAG TGG AGG GAG<br>AAC ATC CGG | TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGA<br>GCT TTT |
| <b>MYC</b>   | CCAGCAGCGACTCTGAGG                         | CCAAGACGTTGTGTGTTCC                        |
| <b>PIM1</b>  | GCTCGGTCTACTCAGGCATC                       | CATTAGGCAGCTCTCCCCAG                       |
| <b>SOCS2</b> | CAG ATG TGC AAG GAT AAG CGG                | CAG ATA AAG GTG AAC AGT GCC G              |
| <b>GAPDH</b> | CCATGGAGAAGGCTGGGG                         | CAAAGTTGTCATGGATGACC                       |

## 12. Ensayos de combinación de fármacos (sinergia)

Se utilizaron las células K562-GFP+ (**Tabla 6**) para monitorizar el crecimiento celular. Se sembraron 5.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se expusieron a un ratio (7,5:1) de combinación de dosis de compuestos constante (JKST6:IM). Las diluciones de los fármacos individuales se fueron duplicando en un amplio rango de concentraciones. La proliferación celular se estudió a partir de las microfotografías tomadas por el sistema IncuCyte™ HD (Essen BioScience, UK) de las que se extrajo el porcentaje de *green confluence*.

La inhibición detectada en la proliferación celular comparada con el crecimiento de las células tratadas con vehículo fue considerado el efecto, que oscila entre los valores 0 (cuando no hay inhibición de la proliferación) a 1 (el 100% de la proliferación celular se ve inhibida). Las curvas de dosis-efecto de los compuestos individuales o en combinación se analizaron por el método de Chou y Talalay (205) usando el software *Calculusyn software 2.0* (Biosoft, Cambridge, UK). Dichos análisis permiten la determinación de los valores del índice de combinación o *combination index* (CI), que según su valor (menor que 1; igual que 1 o mayor que 1) indican sinergismo, adición o antagonismo, respectivamente. Los resultados de estos ensayos, calculados para las dosis efectivas 25 (ED<sub>25</sub>), 50 (ED<sub>50</sub>), 75 (ED<sub>75</sub>) y 90 (ED<sub>90</sub>), se presentan como valores de CI (media ± SEM) obtenidos a partir de cuatro experimentos independientes con cuatro replicados por dosis.

## 13. Ensayos para determinar la influencia del medio condicionado y nicho tumoral (co-cultivos)

Las células mesenquimales humanas de médula ósea inmortalizadas con la transcriptasa inversa de la telomerasa recombinante (hTERT-MSCs) (206) (**Tabla 6**) fueron cedidas amablemente por el Dr. Juan M. Zapata del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols (Madrid).

Para generar el medio condicionado (CM), las células hTERT-MSCs se sembraron a 500.000 células por *flask T75* en una atmósfera humidificada a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, hasta que alcanzaron una confluencia de entre 75-80%. El CM incubado con las células durante 24-48 horas se recogió, se centrifugó para retirar restos o células contaminantes, y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. En estos ensayos se investigó el efecto de distintos porcentajes de CM (0, 20, 30, 50 y 100%) sobre la viabilidad de las

células de K562. El CM generado durante 24 horas de incubación con hTERT-MSCs y diluido al 50% fue elegido para los siguientes experimentos por producir un menor tiempo de división (*doubling time*) en las células K562. A continuación, se estudió su influencia en la potencia antitumoral (IC50) de los compuestos JKST6 (0,1-10  $\mu$ M) e IM (0,03-5  $\mu$ M) en ensayos de MTT.

Los co-cultivos se realizaron sembrando las hTERT-MSCs a 8.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos hasta que alcanzaron una confluencia de un 75-80% (2 días de crecimiento), que fue registrada mediante IncuCyte™ HD (Essen BioScience, UK). El día 3 post siembra, se aspiró cuidadosamente el medio de cultivo de las hTERT-MSCs y se sembraron encima las células K562-GFP+ a 5.000 células por pocillo. Las células se trataron con dosis crecientes de JKST6 (0,1-10  $\mu$ M) o IM (0,03-5  $\mu$ M) y se registró su crecimiento durante 5 días. De forma paralela, se sembraron las células K562-GFP+ sin la base de las hTERT-MSCs a modo de referencia, para comparar la influencia del nicho en las IC50 de los compuestos.

En otro conjunto de experimentos, se comprobó la influencia del nicho tumoral en un contexto proinflamatorio mediante la estimulación del co-cultivo con lipopolisacárido (LPS, 10 ng/ml, 16 horas) o con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, 10 ng/ml, 6 horas). Posteriormente, se realizó un tratamiento con dosis crecientes de JKST6 (0,1-10  $\mu$ M) o IM (0,03-5  $\mu$ M) y se registró su crecimiento durante 5 días.

#### **14. Estudios de toxicidad aguda y sub-crónica**

Los estudios de toxicidad aguda o test de Irwin fueron aprobados por el Comité de Bioética de La Universidad de La Laguna (CEIBA 2018–0291) y los de toxicidad sub-crónica por el Comité de Bioética de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (OEBA-44/2019R1). Los experimentos se realizaron según las recomendaciones de la OCDE para los ensayos de compuestos químicos (N° 407; 452).

El test de Irwin (207) se realizó con ratones macho de la cepa FVB (Código de Charles River: 207) para estudiar la toxicidad aguda del JKST6 cuando este se administró vía oral (v.o) y vía intraperitoneal (v.i). En resumen, 12 ratones se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos de tratamiento: 1) tratados (v.i) con vehículo (dimetilacetamida (DMA): polietilenglicol 400 (PEG400): suero salino; 10:40:50); 2) tratados (v.i) con JKST6 (10 mg/kg); 3) tratados (v.o) con vehículo (DMA: metilcelulosa

(MC) 0.5%; 10:90) y 4) tratados (v.o) con JKST6 (50 mg/kg). Los animales recibieron tratamiento diariamente durante 5 días. Tras la administración del tratamiento, dos investigadores independientes evaluaron la aparición de posibles signos clínicos. El último día, los animales fueron sacrificados por aturdimiento con dióxido de carbono. La necropsia permitió explorar los cambios morfológicos en los órganos (hígado, bazo, riñón) y registrar los pesos de cada órgano normalizado por el peso corporal del animal.

El ensayo de toxicidad sub-crónica fue desarrollado en ratones macho (n=10) y hembra (n=10) de la cepa BALB/c (código de Charles River: 028) durante 30 días. A los animales se les administró vehículo (DMSO: PEG400: suero salino; 10:40:50) o JKST6 (10 mg/kg) cada dos días (v.i). Se inspeccionó la aparición de signos clínicos diariamente, mientras que el peso corporal y el consumo de agua/comida fueron monitorizados cada día de tratamiento. Además, la composición corporal (masa magra, masa grasa y fluidos) fue determinada usando resonancia magnética (Bruker Minispec, Massachusetts, EE. UU.). El último día de experimento, se procedió al sacrificio de los animales mediante una sobredosis de isofluorano y se realizó la necropsia. A partir de la sangre y el plasma se realizó el conteo de células sanguíneas (MS4-5, Melet Schloesing, Osny, Francia) y determinados análisis bioquímicos (Pointcare v2, Mano Médical, Francia), respectivamente.

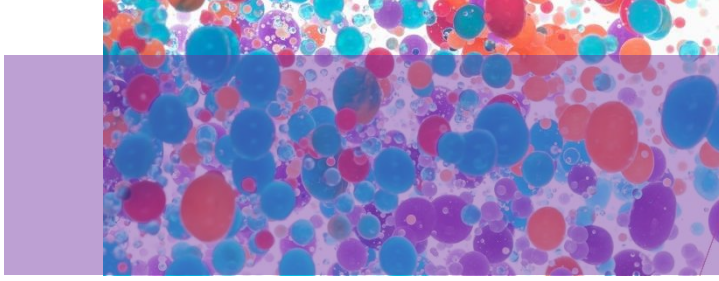
#### **15. Análisis estadístico**

Los datos presentados a lo largo de este trabajo de tesis doctoral son resultado de 2-6 experimentos independientes con al menos tres replicados por condición experimental. Estos resultados se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) en experimentos *in vitro* o como la media  $\pm$  la desviación estándar (SD) en los experimentos *in vivo*. Las diferencias entre las medias de dos grupos fueron analizadas con la prueba de *t de Student* de dos colas. En el caso de comparar las medias de más de dos grupos se utilizó *One way ANOVA* seguida de la prueba *post hoc* de Bonferroni. Ambos tipos de comparaciones de medias se realizaron utilizando el programa informático *GraphPad Prism 8.3.0 Software* (CA, EE. UU.). Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de  $p < 0,05$  con un intervalo de confianza del 95%.

La concentración necesaria para reducir la viabilidad o la proliferación celular al 50% del máximo (IC50) o de inducir el 50% de la citotoxicidad (EC50) fue determinada

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

utilizando una ecuación que se basa en el ajuste de la curva dosis-efecto utilizando también el programa informático *GraphPad Prism 8.3.0 Software* (CA, EE. UU.). Para los experimentos *in vivo*, el número mínimo de animales necesario para los ensayos de toxicidad fue determinado con el análisis de poder estadístico y del tamaño muestral usando el *G Power 3.1 Software* (Düsseldorf, Alemania) y las recomendaciones de la OCDE (N°407).



## **IV. RESULTADOS. PRIMERA PARTE**





## 1. Cribado de series químicas

El cribado o screening de quimiotecas es una herramienta eficaz para identificar dianas asociadas a enfermedades y establecer un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos. Además, el estudio de series químicas focalizadas o dirigidas, que normalmente contienen análogos de un compuesto con bioactividad conocida, permite mejorar las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, así como su potencia y toxicidad. En este sentido, los primeros estudios que conforman este trabajo se centraron en el cribado de un conjunto de quimiotecas, sintetizadas por el grupo QUIBIONAT en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO, Universidad de La Laguna), con el fin de identificar nuevas estructuras farmacológicas con actividad antitumoral en cánceres de tipo hematológico.

En aquellas quimiotecas que se estudiaron en mayor profundidad por su interés para la presente tesis doctoral, se adjuntan figuras que representan la relación estructura-actividad de los diferentes compuestos.

### 1.1. Complejos metálicos con chalconas y lapachol

Los resultados del cribado de los complejos metálicos, que representan estructuras químicas prometedoras por sus actividades biológicas asociadas (208,209), se presentan en dos subgrupos principales, según las líneas hematológicas en las que fueron estudiados. En primer lugar, un primer subgrupo de compuestos que fue investigado en las 3 neoplasias hematológicas (HEL, K562, HL60) (**Tabla 18**).

Tabla 18. Inhibición de la viabilidad celular de la serie de compuestos “metálicos con chalconas y lapachol” sobre líneas tumorales hematológicas (HEL, K562 y HL60), determinada por ensayo de MTT.

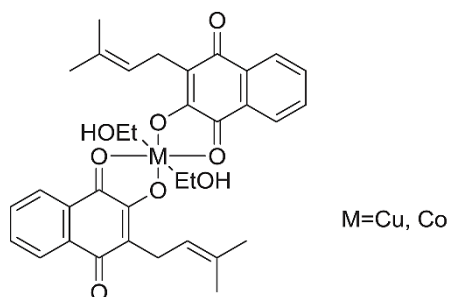
| ID      | HEL   |       |             |             | K562  |       |             |             | HL60  |       |             |             |
|---------|-------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|
|         | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             |
|         | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          |
| NQ      | 16,00 | 16,58 | >10         | nd          | 0,00  | 5,81  | >10         | nd          | 12,73 | 3,23  | >10         | nd          |
| Cophen  | 44,30 | 9,03  | >10         | nd          | 29,77 | 7,24  | >10         | nd          | 31,85 | 8,38  | >10         | nd          |
| Cuphen  | 60,88 | 6,82  | <b>6,62</b> | <b>4,20</b> | 80,02 | 1,87  | <b>4,95</b> | <b>2,61</b> | 52,63 | 1,75  | >10         | nd          |
| JG1     | 14,20 | 9,92  | >10         | nd          | 19,02 | 5,59  | >10         | nd          | 0,00  | 9,25  | >10         | nd          |
| JG2     | 2,29  | 4,40  | >10         | nd          | 4,06  | 14,18 | >10         | nd          | 0,00  | 9,11  | >10         | nd          |
| JG3     | 7,56  | 2,26  | >10         | nd          | 13,49 | 7,22  | >10         | nd          | 0,00  | 7,51  | >10         | nd          |
| JG4     | 12,98 | 5,24  | >10         | nd          | 2,97  | 10,95 | >10         | nd          | 0,00  | 13,73 | >10         | nd          |
| Mnphen  | 81,92 | 3,70  | <b>4,68</b> | <b>0,57</b> | 72,18 | 7,35  | <b>4,45</b> | <b>2,46</b> | 85,88 | 4,89  | <b>4,05</b> | <b>1,34</b> |
| Niphen  | 28,46 | 11,69 | >10         | nd          | 13,60 | 11,81 | >10         | nd          | 24,39 | 7,23  | >10         | nd          |
| NQCo(1) | 18,06 | 11,57 | >10         | nd          | 10,58 | 5,06  | >10         | nd          | 16,46 | 14,99 | >10         | nd          |
| NQCu(1) | 26,50 | 11,90 | >10         | nd          | 16,34 | 8,70  | >10         | nd          | 38,11 | 10,30 | >10         | nd          |
| NQCu(2) | 13,24 | 8,45  | >10         | nd          | 24,39 | 13,11 | >10         | nd          | 19,20 | 5,35  | >10         | nd          |
| NQMn(1) | 15,01 | 6,96  | >10         | nd          | 0,00  | 13,68 | >10         | nd          | 32,56 | 7,94  | >10         | nd          |
| NQNi(1) | 19,46 | 11,74 | >10         | nd          | 0,00  | 1,17  | >10         | nd          | 28,68 | 8,40  | >10         | nd          |
| NQZn(1) | 17,00 | 5,72  | >10         | nd          | 0,00  | 15,99 | >10         | nd          | 28,05 | 8,76  | >10         | nd          |
| Znphen  | 80,87 | 6,54  | <b>4,49</b> | <b>1,98</b> | 39,36 | 8,85  | >10         | nd          | 85,21 | 0,53  | <b>6,35</b> | <b>1,06</b> |

Se representa el porcentaje de inhibición de viabilidad celular (S) resultado del tratamiento con los diferentes compuestos a dosis fija (10 µM). Los valores de IC50 (µM), mostrados en negrita, fueron calculados en aquellos compuestos con una S mayor del 60% a dosis fija de 10 µM. Los tratamientos se mantuvieron 48-72 h. Tanto para los valores de S como para los de IC50, los datos se presentan como media (M) ± desviación estándar de la media (SD). ID: identificación de los compuestos; nd: no determinado.

Los resultados del cribado de la serie química de complejos metálicos describen un grupo que posee pocos compuestos activos en las líneas examinadas. Sin embargo, aquellos que muestran un alto porcentaje de inhibición de viabilidad celular a dosis única (S > 60%), poseen valores de IC50 que se encuentran dentro del rango micro molar (4-6 µM). Además, tal y como se observa en el caso de Mnphen, tienen una actividad similar en las tres líneas leucémicas. Cabe destacar que los complejos cuyos ligandos metálicos fueron Mn, Zn y Cu se asociaron con una actividad antitumoral significativa.

A continuación, se muestra un segundo subgrupo de complejos metálicos que fue evaluado en la línea HEL (**Tabla 19**) porque su transformación neoplásica se asocia con la presencia de la mutación *JAK2*<sup>V617F</sup>, que ha sido descrita como una diana eficaz para complejos metálicos con anterioridad (210). Además, los ligandos metálicos

predominantes en esta quimioteca fueron el Co y el Cu, que permitieron comparar sus efectos cuando se asocian al lapachol (**Figura 33**).



**Figura 33. Estructura química de los complejos Cu-Lap y Co-Lap.** M representa el centro metálico correspondiente. Tomada de Hernández-Molina *et al.* 2019 (208).

**Tabla 19. Inhibición de la viabilidad celular de la serie de compuestos “metálicos con chalconas y lapachol” sobre la línea tumoral hematológica (HEL) determinada por ensayo de MTT.**

| ID   | HEL    |       |             |             |
|--|--------|-------|-------------|-------------|
|  | S (%)  |       | IC50 (µM)   |             |
|  | M      | SD    | M           | SD          |
| T-CH1-Cu   | 41,68  | 5,87  | >10         | nd          |
| CH6-Cu   | 47,63  | 14,99 | >10         | nd          |
| CH2-Cu   | 100,00 | 1,45  | <b>1,23</b> | <b>0,99</b> |
| CH6-Ru   | 4,21   | 16,41 | >10         | nd          |
| CH3-Cuphen   | 98,49  | 2,22  | <b>2,00</b> | <b>0,47</b> |
| CH2-Ru   | 24,71  | 16,72 | >10         | nd          |
| Cu-Lap   | 10,30  | 20,53 | >10         | nd          |
| Co-Lap   | 70,74  | 5,26  | <b>3,69</b> | <b>1,22</b> |
| [Cu(phen)(lap) <sub>2</sub> :CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] | 100,00 | 3,72  | <b>1,79</b> | <b>0,80</b> |
| CH8-Cu   | 97,40  | 0,82  | <b>2,88</b> | <b>1,24</b> |
| CH10-Cu  | 43,18  | 13,56 | >10         | nd          |
| CH9-Cu   | 59,09  | 9,39  | >10         | nd          |
| Co-1   | 83,07  | 1,21  | <b>4,07</b> | <b>0,31</b> |
| Co   | 50,31  | 3,70  | >10         | nd          |
| CH3Cu  | 48,50  | 9,97  | >10         | nd          |

Se representa el porcentaje de inhibición de viabilidad celular (S) resultado del tratamiento con los diferentes compuestos a dosis fija (10 µM). Los valores de IC50 (µM), mostrados en negrita, fueron calculados en aquellos compuestos con una S mayor del 60% a dosis fija de 10 µM. Los tratamientos se mantuvieron 48-72h. Tanto para los valores de S como para los de IC50, los datos se presentan como media (M) ± desviación estándar de la media (SD). ID: identificación de los compuestos; nd: no determinado.

Los compuestos del segundo subgrupo demostraron una mayor potencia antitumoral, con valores de IC50 aproximadamente tres veces menores que los del primer subgrupo. Es destacable el cambio en la actividad antitumoral registrada en la línea HEL del complejo Co-Lap ( $3,69 \pm 1,22 \mu\text{M}$ ) respecto al Cu-Lap ( $> 10 \mu\text{M}$ ), lo que apunta a la importancia de la naturaleza del núcleo metálico en la citotoxicidad provocada por el compuesto.

Los resultados de este cribado contribuyeron a la publicación de Hernández-Molina *et al.* (2019) “*Synthesis, characterization and antiproliferative activity of mixed ligand complexes of Cu<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> with lapachol*” Polyhedron (**Anexo III: Aportaciones científicas**), que describe a los complejos metálicos con lapachol como potentes antitumorales en células leucémicas humanas en comparación con otros compuestos análogos publicados previamente, que demostraron valores de IC50 en torno a 32 -18  $\mu\text{M}$  en HL60 (209).

## 1.2. Espirodímeros

Esta serie, compuesta por 47 compuestos derivados de la 1-indanona, fue ensayada en los modelos celulares de leucemia que se citan a continuación (**Tabla 20**).

**Tabla 20. Inhibición de la viabilidad celular de la serie de compuestos “espirodímeros” sobre líneas tumorales hematológicas (HEL, K562 y HL60) determinada por ensayo de MTT.**

| ID    | HEL   |       |                        |             | K562  |       |                        |             | HL60  |       |                        |             |
|-------|-------|-------|------------------------|-------------|-------|-------|------------------------|-------------|-------|-------|------------------------|-------------|
|       | S (%) |       | IC50 ( $\mu\text{M}$ ) |             | S (%) |       | IC50 ( $\mu\text{M}$ ) |             | S (%) |       | IC50 ( $\mu\text{M}$ ) |             |
|       | M     | SD    | M                      | SD          | M     | SD    | M                      | SD          | M     | SD    | M                      | SD          |
| SP-01 | 38,15 | 7,23  | >10                    | nd          | 13,93 | 10,31 | >10                    | nd          | 44,67 | 6,94  | >10                    | nd          |
| SP-02 | 41,28 | 3,05  | >10                    | nd          | 0,00  | 10,19 | >10                    | nd          | 20,29 | 0,99  | >10                    | nd          |
| SP-03 | 43,20 | 13,59 | >10                    | nd          | 42,48 | 15,52 | >10                    | nd          | 28,88 | 13,55 | >10                    | nd          |
| SP-04 | 52,75 | 0,86  | >10                    | nd          | 46,97 | 15,48 | >10                    | nd          | 40,38 | 5,41  | >10                    | nd          |
| SP-05 | 67,52 | 13,37 | >10                    | nd          | 65,22 | 4,39  | <b>8,12</b>            | <b>2,65</b> | 60,75 | 5,34  | <b>5,22</b>            | <b>0,45</b> |
| SP-06 | 66,48 | 12,04 | >10                    | nd          | 46,75 | 5,47  | >10                    | nd          | 49,24 | 10,43 | nd                     | nd          |
| SP-07 | 23,11 | 12,47 | >10                    | nd          | 33,93 | 9,60  | >10                    | nd          | 25,84 | 2,17  | >10                    | nd          |
| SP-08 | 38,37 | 13,39 | >10                    | nd          | 36,34 | 5,07  | >10                    | nd          | 34,66 | 2,89  | >10                    | nd          |
| SP-09 | 54,21 | 5,60  | >10                    | nd          | 29,27 | 5,07  | >10                    | nd          | 35,54 | 8,09  | >10                    | nd          |
| SP-10 | 69,47 | 8,04  | <b>2,80</b>            | <b>1,47</b> | 5,54  | 7,41  | >10                    | nd          | 41,46 | 8,12  | >10                    | nd          |
| SP-11 | 52,30 | 10,27 | >10                    | nd          | 15,35 | 23,39 | >10                    | nd          | 25,36 | 13,50 | >10                    | nd          |
| SP-12 | 54,32 | 7,81  | >10                    | nd          | 38,24 | 13,71 | >10                    | nd          | 33,25 | 7,64  | >10                    | nd          |
| SP-13 | 36,44 | 11,91 | >10                    | nd          | 34,42 | 18,79 | >10                    | nd          | 18,02 | 5,85  | >10                    | nd          |
| SP-14 | 49,68 | 7,01  | >10                    | nd          | 36,34 | 16,38 | >10                    | nd          | 40,47 | 3,65  | >10                    | nd          |

IV. RESULTADOS. PRIMERA PARTE

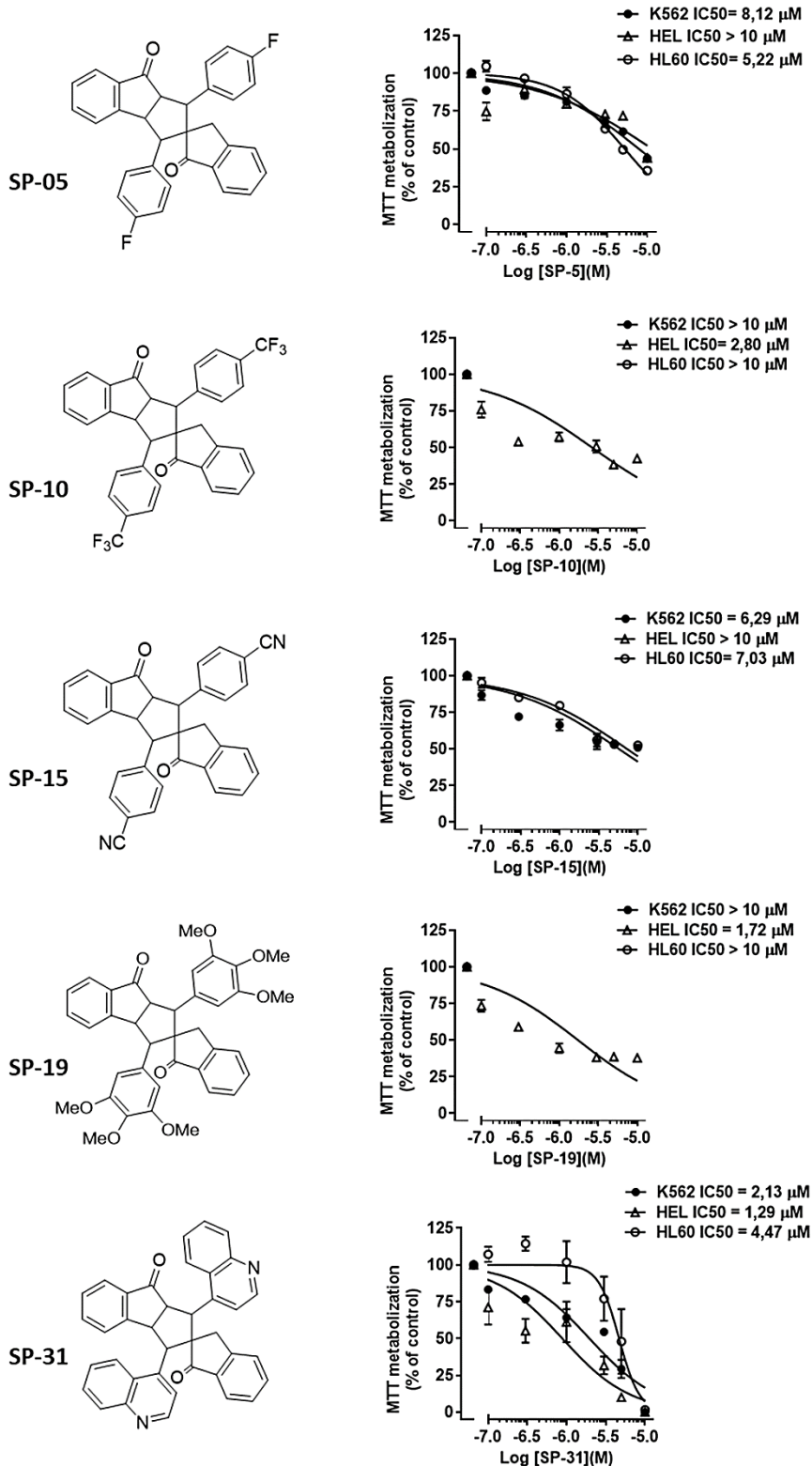
Tabla 20 (continuación). Inhibición de la viabilidad celular de la serie de compuestos “espirodímeros” sobre líneas tumorales hematológicas (HEL, K562 y HL60) determinada por ensayo de MTT.

| ID    | HEL   |       |             |             | K562  |       |             |             | HL60  |       |             |             |
|-------|-------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|
|       | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             |
|       | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          |
| SP-15 | 53,03 | 4,82  | >10         | nd          | 56,18 | 11,88 | <b>6,29</b> | <b>3,13</b> | 70,21 | 6,45  | <b>7,03</b> | <b>0,35</b> |
| SP-16 | 46,95 | 2,99  | >10         | nd          | 38,24 | 8,25  | >10         | nd          | 49,12 | 4,27  | nd          | nd          |
| SP-17 | 50,34 | 7,66  | >10         | nd          | 32,03 | 4,65  | >10         | nd          | 51,35 | 14,06 | nd          | nd          |
| SP-18 | 58,41 | 14,65 | >10         | nd          | 0,00  | 7,88  | >10         | nd          | 39,88 | 10,73 | >10         | nd          |
| SP-19 | 59,70 | 5,47  | <b>1,72</b> | <b>0,01</b> | 11,21 | 3,52  | >10         | nd          | 1,92  | 8,71  | >10         | nd          |
| SP-20 | 47,10 | 3,00  | >10         | nd          | 21,00 | 8,56  | >10         | nd          | 12,36 | 8,14  | >10         | nd          |
| SP-21 | 0,00  | 8,29  | >10         | nd          | 26,04 | 10,80 | >10         | nd          | 25,56 | 16,96 | >10         | nd          |
| SP-22 | 15,39 | 7,91  | >10         | nd          | 25,22 | 12,49 | >10         | nd          | 37,20 | 13,34 | >10         | nd          |
| SP-23 | 0,00  | 9,57  | >10         | nd          | 3,95  | 9,81  | >10         | nd          | 0,00  | 23,48 | >10         | nd          |
| SP-24 | 9,55  | 9,50  | >10         | nd          | 0,00  | 21,04 | >10         | nd          | 25,36 | 6,18  | >10         | nd          |
| SP-25 | 18,61 | 2,43  | >10         | nd          | 0,00  | 4,76  | >10         | nd          | 0,00  | 5,09  | >10         | nd          |
| SP-26 | 35,60 | 13,52 | >10         | nd          | 57,75 | 14,39 | >10         | nd          | 30,87 | 16,18 | >10         | nd          |
| SP-27 | 7,64  | 2,59  | >10         | nd          | 49,93 | 1,94  | nd          | nd          | 20,82 | 8,24  | >10         | nd          |
| SP-28 | 5,97  | 6,03  | >10         | nd          | 49,44 | 8,37  | nd          | nd          | 17,08 | 14,77 | >10         | nd          |
| SP-29 | 0,00  | 4,89  | >10         | nd          | 24,94 | 12,31 | >10         | nd          | 0,00  | 13,19 | >10         | nd          |
| SP-30 | 35,01 | 0,55  | >10         | nd          | 43,08 | 7,10  | >10         | nd          | 34,57 | 9,75  | >10         | nd          |
| SP-31 | 83,96 | 4,50  | <b>1,29</b> | <b>1,28</b> | 84,86 | 3,35  | <b>2,13</b> | <b>0,40</b> | 79,79 | 10,85 | <b>4,47</b> | <b>2,88</b> |
| SP-32 | 19,97 | 15,86 | >10         | nd          | 13,49 | 15,01 | >10         | nd          | 16,41 | 2,22  | >10         | nd          |
| SP-33 | 23,32 | 3,95  | >10         | nd          | 48,62 | 12,80 | >10         | nd          | 43,14 | 6,38  | >10         | nd          |
| SP-34 | 3,91  | 4,61  | >10         | nd          | 19,79 | 18,47 | >10         | nd          | 0,00  | 9,40  | >10         | nd          |
| SP-35 | 0,00  | 6,55  | >10         | nd          | 41,60 | 6,21  | >10         | nd          | 4,71  | 10,68 | >10         | nd          |
| SP-36 | 0,00  | 9,02  | >10         | nd          | 42,11 | 12,45 | >10         | nd          | 7,14  | 12,63 | >10         | nd          |
| SP-37 | 0,87  | 13,31 | >10         | nd          | 47,45 | 1,77  | >10         | nd          | 3,45  | 12,73 | >10         | nd          |
| SP-38 | 20,59 | 3,80  | >10         | nd          | 36,56 | 6,90  | >10         | nd          | 0,00  | 14,34 | >10         | nd          |
| SP-39 | 22,29 | 2,65  | >10         | nd          | 32,10 | 2,60  | >10         | nd          | 7,85  | 0,61  | >10         | nd          |
| SP-40 | 10,80 | 4,60  | >10         | nd          | 0,00  | 10,69 | >10         | nd          | 10,04 | 1,47  | >10         | nd          |
| SP-41 | 6,60  | 6,71  | >10         | nd          | 0,00  | 5,68  | >10         | nd          | 12,52 | 4,61  | >10         | nd          |
| SP-42 | 12,35 | 6,73  | >10         | nd          | 0,00  | 8,08  | >10         | nd          | 6,53  | 5,70  | >10         | nd          |
| SP-43 | 0,00  | 15,85 | >10         | nd          | 0,00  | 10,00 | >10         | nd          | 4,73  | 3,44  | >10         | nd          |
| SP-44 | 15,23 | 4,98  | >10         | nd          | 0,00  | 3,76  | >10         | nd          | 7,11  | 4,14  | >10         | nd          |
| SP-45 | 6,45  | 10,33 | >10         | nd          | 0,00  | 19,40 | >10         | nd          | 0,00  | 2,85  | >10         | nd          |
| SP-46 | 0,00  | 7,08  | >10         | nd          | 0,00  | 12,89 | >10         | nd          | 0,00  | 1,47  | >10         | nd          |
| SP-47 | 10,44 | 5,15  | >10         | nd          | 0,00  | 12,57 | >10         | nd          | 30,09 | 3,84  | >10         | nd          |

Se representa el porcentaje de inhibición de viabilidad celular (S) resultado del tratamiento con los diferentes compuestos a dosis fija (10 µM). Los valores de IC50 (µM), mostrados en negrita, fueron calculados en aquellos compuestos con una S mayor del 60% a dosis fija de 10 µM. Los tratamientos se mantuvieron 48-72h. Tanto para los valores de S como para los de IC50, los datos se presentan como media (M) ± desviación estándar de la media (SD). ID: identificación de los compuestos; nd: no determinado.

En general, los productos mostraron baja potencia antitumoral en las líneas humanas de cáncer hematológico estudiadas. Hay que destacar una cierta selectividad de los productos SP-10 y SP-19 por las células HEL, en comparación con las células K562 y HL60, que no mostraron alteraciones de su viabilidad tras los tratamientos. El producto SP-31 resultó el más potente de esta serie en las tres líneas celulares de leucemia. A continuación, se muestran los compuestos que mostraron mayor actividad antitumoral y que contribuyeron al estudio de la relación estructura-actividad (**Figura 34**).

IV. RESULTADOS. PRIMERA PARTE



**Figura 34.** Compuestos de la serie química “espirodímeros” que mostraron inhibición de viabilidad celular potente en las líneas hematológicas HEL, K562 y HL60. A la izquierda se observa la estructura química de los compuestos y a la derecha la gráfica dosis-efecto que representa la media de IC<sub>50</sub> calculada a partir de las réplicas experimentales (48-72 horas de tratamiento).

### 1.3. Derivados de embelina con núcleos tipo pirazol o acridina

La serie química compuesta por 70 derivados nitrogenados de embelina fusionados con núcleos de tipo dihidropiridina-pirazol (PMA-P) o acridina (PMA-Ac) fue investigada en las líneas hematológicas utilizadas en el cribado. Los datos de inhibición de viabilidad se subdividieron en estos dos grupos, atendiendo a las diferencias estructurales de los productos. Seguidamente, se muestran los resultados obtenidos en el primer subgrupo de 38 compuestos (**Tabla 21**).

**Tabla 21.** Inhibición de la viabilidad celular del primer subgrupo (pirazoles) de la serie sobre líneas tumorales hematológicas (HEL, K562 y HL60) determinada por ensayo de MTT.

| ID       | HEL   |       |             |             | K562  |       |             |             | HL60         |              |             |             |
|----------|-------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
|          | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%)        |              | IC50 (µM)   |             |
|          | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          | M            | SD           | M           | SD          |
| PMA-P01  | 90,85 | 0,52  | <b>2,55</b> | <b>0,07</b> | 57,57 | 2,53  | >10         | nd          | 78,34        | 1,53         | 1,95        | 0,49        |
| PMA-P02  | 20,36 | 1,06  | >10         | nd          | 3,11  | 2,95  | >10         | nd          | 16,68        | 3,67         | >10         | nd          |
| PMA-P03  | 63,71 | 0,85  | <b>5,75</b> | <b>0,35</b> | 58,91 | 5,27  | >10         | nd          | 49,53        | 3,65         | >10         | nd          |
| PMA-P04  | 91,47 | 1,25  | <b>2,60</b> | <b>0,42</b> | 67,45 | 2,98  | <b>3,40</b> | <b>0,14</b> | 82,41        | 1,30         | <b>1,85</b> | <b>0,21</b> |
| PMA-P05  | 88,51 | 0,56  | <b>3,20</b> | <b>0,00</b> | 63,58 | 3,88  | <b>5,50</b> | <b>1,84</b> | 79,22        | 0,52         | <b>2,85</b> | <b>0,07</b> |
| PMA-P06  | 91,22 | 1,70  | <b>1,80</b> | <b>0,28</b> | 69,43 | 4,19  | <b>3,30</b> | <b>0,42</b> | 85,46        | 2,24         | <b>1,00</b> | <b>0,00</b> |
| PMA-P07  | 62,19 | 2,58  | <b>5,50</b> | <b>0,99</b> | 52,67 | 11,42 | >10         | nd          | 65,85        | 4,92         | <b>3,15</b> | <b>0,35</b> |
| PMA-P08  | 92,18 | 1,23  | <b>2,10</b> | <b>0,28</b> | 78,70 | 6,31  | <b>2,50</b> | <b>0,14</b> | 79,38        | 0,76         | <b>1,80</b> | <b>0,14</b> |
| PMA-P09  | 86,19 | 1,22  | <b>1,05</b> | <b>0,35</b> | 62,84 | 6,00  | <b>1,25</b> | <b>0,35</b> | 78,67        | 0,83         | <b>0,70</b> | <b>0,14</b> |
| PMA-P10  | 89,33 | 0,24  | <b>2,10</b> | <b>0,42</b> | 69,29 | 4,83  | <b>2,05</b> | <b>0,64</b> | 83,87        | 2,10         | <b>0,90</b> | <b>0,14</b> |
| PMA-P11  | 73,11 | 3,64  | <b>2,70</b> | <b>0,42</b> | 92,99 | 0,73  | <b>3,30</b> | <b>1,27</b> | <b>50,50</b> | <b>3,81</b>  | >10         | nd          |
| PMA-P12  | 71,28 | 1,38  | <b>2,45</b> | <b>0,07</b> | 68,11 | 6,88  | <b>3,60</b> | <b>1,27</b> | <b>78,83</b> | <b>0,70</b>  | <b>6,50</b> | <b>0,99</b> |
| PMA-P13  | 85,20 | 0,08  | <b>1,30</b> | <b>0,28</b> | 62,46 | 11,88 | <b>4,15</b> | <b>0,64</b> | <b>55,22</b> | <b>3,90</b>  | >10         | nd          |
| PMA-P14  | 81,64 | 1,25  | <b>1,00</b> | <b>0,42</b> | 80,55 | 2,72  | <b>2,55</b> | <b>0,78</b> | <b>79,45</b> | <b>0,93</b>  | <b>1,75</b> | <b>0,21</b> |
| PMA-P15a | 0,00  | 3,56  | >10         | nd          | 6,27  | 7,68  | >10         | nd          | <b>0,00</b>  | <b>11,30</b> | >10         | nd          |
| PMA-P15b | 41,55 | 32,27 | >10         | nd          | 49,73 | 30,11 | >10         | nd          | <b>20,20</b> | <b>47,91</b> | >10         | nd          |
| PMA-P16a | 3,56  | 6,78  | >10         | nd          | 18,86 | 2,56  | >10         | nd          | <b>0,00</b>  | <b>9,33</b>  | >10         | nd          |
| PMA-P16b | 53,64 | 7,64  | >10         | nd          | 78,36 | 13,78 | <b>6,61</b> | <b>1,32</b> | <b>35,87</b> | <b>5,65</b>  | >10         | nd          |
| PMA-P17  | 34,74 | 65,07 | >10         | nd          | 46,17 | 1,73  | >10         | nd          | <b>20,32</b> | <b>37,45</b> | >10         | nd          |
| PMA-P18  | 30,44 | 17,31 | >10         | nd          | 41,86 | 21,80 | >10         | nd          | <b>18,89</b> | <b>8,73</b>  | >10         | nd          |
| PMA-P19  | 47,11 | 30,79 | >10         | nd          | 59,30 | 41,29 | <b>6,69</b> | <b>1,65</b> | <b>0,00</b>  | <b>19,00</b> | >10         | nd          |
| PMA-P20  | 50,83 | 24,67 | >10         | nd          | 85,00 | 5,71  | <b>0,92</b> | <b>0,32</b> | <b>21,25</b> | <b>13,44</b> | >10         | nd          |
| PMA-P21  | 43,73 | 33,79 | >10         | nd          | 47,76 | 34,69 | >10         | nd          | <b>38,07</b> | <b>51,61</b> | >10         | nd          |
| PMA-P22  | 70,59 | 12,09 | <b>5,40</b> | <b>0,81</b> | 52,41 | 38,62 | <b>5,75</b> | <b>2,33</b> | <b>62,84</b> | <b>3,26</b>  | >10         | nd          |
| PMA-P23  | 39,52 | 47,08 | >10         | nd          | 22,35 | 3,91  | >10         | nd          | <b>85,48</b> | <b>6,93</b>  | <b>3,99</b> | <b>0,12</b> |
| PMA-P24  | 78,55 | 18,02 | <b>2,13</b> | <b>0,81</b> | 63,95 | 55,08 | <b>2,30</b> | <b>0,28</b> | <b>76,75</b> | <b>0,59</b>  | <b>2,15</b> | <b>0,36</b> |
| PMA-P25  | 96,54 | 2,89  | <b>1,70</b> | <b>0,14</b> | 60,58 | 2,59  | <b>4,87</b> | <b>0,01</b> | <b>75,72</b> | <b>0,63</b>  | <b>2,70</b> | <b>1,70</b> |
| PMA-P26  | 20,60 | 9,42  | >10         | nd          | 0,00  | 0,00  | >10         | nd          | <b>0,00</b>  | <b>3,48</b>  | >10         | nd          |
| PMA-P27  | 78,10 | 1,91  | <b>4,20</b> | <b>1,27</b> | 72,73 | 3,40  | <b>3,65</b> | <b>0,21</b> | <b>65,52</b> | <b>0,86</b>  | <b>4,20</b> | <b>0,85</b> |



**Tabla 21 (continuación). Inhibición de la viabilidad celular del primer subgrupo (pirazoles) de la serie sobre líneas tumorales hematológicas (HEL, K562 y HL60) determinada por ensayo de MTT.**

| ID      | HEL   |      |             |             | K562  |       |             |             | HL60         |             |             |             |
|---------|-------|------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
|         | S (%) |      | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%)        |             | IC50 (µM)   |             |
|         | M     | SD   | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          | M            | SD          | M           | SD          |
| PMA-P28 | 72,55 | 2,36 | <b>5,45</b> | <b>1,48</b> | 69,03 | 0,85  | <b>5,45</b> | <b>0,78</b> | <b>64,26</b> | <b>4,31</b> | <b>5,00</b> | <b>0,14</b> |
| PMA-P29 | 82,10 | 0,94 | <b>2,75</b> | <b>0,07</b> | 75,10 | 0,68  | <b>2,10</b> | <b>0,57</b> | <b>75,10</b> | <b>2,03</b> | <b>1,95</b> | <b>0,07</b> |
| PMA-P30 | 91,37 | 0,47 | <b>2,15</b> | <b>0,92</b> | 82,77 | 1,94  | <b>0,95</b> | <b>0,35</b> | <b>74,04</b> | <b>0,49</b> | <b>1,05</b> | <b>0,64</b> |
| PMA-P31 | 64,01 | 1,31 | <b>5,60</b> | <b>2,12</b> | 52,00 | 7,75  | >10         | nd          | <b>73,76</b> | <b>0,85</b> | <b>4,00</b> | <b>0,99</b> |
| PMA-P32 | 90,06 | 0,96 | <b>2,25</b> | <b>0,78</b> | 72,35 | 1,98  | <b>2,30</b> | <b>0,57</b> | <b>83,87</b> | <b>2,12</b> | <b>1,10</b> | <b>0,14</b> |
| PMA-P33 | 96,77 | 0,96 | <b>3,90</b> | <b>0,28</b> | 72,96 | 0,33  | <b>4,35</b> | <b>1,48</b> | <b>82,57</b> | <b>2,65</b> | <b>3,90</b> | <b>0,57</b> |
| PMA-P34 | 83,45 | 1,45 | <b>1,95</b> | <b>0,07</b> | 81,00 | 3,02  | <b>2,95</b> | <b>0,35</b> | <b>86,39</b> | <b>1,27</b> | <b>1,10</b> | <b>0,14</b> |
| PMA-P35 | 57,07 | 1,74 | >10         | nd          | 45,59 | 8,97  | >10         | nd          | <b>62,82</b> | <b>4,69</b> | >10         | nd          |
| PMA-P36 | 11,77 | 8,09 | >10         | nd          | 14,55 | 11,54 | >10         | nd          | <b>5,68</b>  | <b>1,68</b> | >10         | nd          |

Se representa el porcentaje de inhibición de viabilidad celular (S) resultado del tratamiento con los diferentes compuestos a dosis fija (10 µM). Los valores de IC50 (µM), mostrados en negrita, fueron calculados en aquellos compuestos con una S mayor del 60% a dosis fija de 10 µM. Los tratamientos se mantuvieron 48-72h. Tanto para los valores de S como para los de IC50, los datos se presentan como media (M) ± desviación estándar de la media (SD). ID: identificación de los compuestos; nd: no determinado.

Estos resultados sugieren que, por un lado, se trata de un grupo con alta potencia antitumoral en células de cáncer hematológico. Si bien no parece haber selectividad por los distintos tipos de leucemias estudiadas, de forma que los efectos citotóxicos de los compuestos se observan en las tres líneas celulares con una potencia similar. Por otro lado, el segundo subgrupo PMA-Ac de 32 compuestos presentó los siguientes resultados (Tabla 22).

**Tabla 22. Inhibición de la viabilidad celular del segundo subgrupo (acridinas) de la serie sobre líneas tumorales hematológicas (HEL, K562 y HL60) determinada por ensayo de MTT.**

| ID      | HEL   |       |             |             | K562  |       |             |             | HL60  |    |             |             |
|---------|-------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|-------|----|-------------|-------------|
|         | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |    | IC50 (µM)   |             |
|         | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD | M           | SD          |
| FLAVO   | 72,43 | nd    | <b>0,20</b> | <b>0,05</b> | 91,00 | nd    | <b>0,21</b> | <b>0,02</b> | 95,90 | nd | <b>0,09</b> | nd          |
| DOXO    | 81,67 | 7,98  | <b>0,20</b> | <b>0,07</b> | 88,03 | 4,28  | <b>0,22</b> | <b>0,19</b> | 86,61 | nd | <b>0,07</b> | <b>0,02</b> |
| PMA-Ac1 | 14,83 | 20,97 | nd          | nd          | -0,03 | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd          | nd          |
| PMA-Ac2 | 24,18 | 34,20 | nd          | nd          | 62,21 | nd    | nd          | nd          | 22,59 | nd | nd          | nd          |
| PMA-Ac3 | 26,52 | 37,51 | nd          | nd          | 85,31 | 15,12 | <b>7,91</b> | <b>0,23</b> | 38,36 | nd | nd          | nd          |
| PMA-Ac4 | 30,00 | 42,42 | nd          | nd          | 76,11 | 25,86 | >10         | nd          | 40,24 | nd | nd          | nd          |
| PMA-Ac5 | 17,91 | 25,33 | nd          | nd          | 68,98 | nd    | nd          | nd          | 15,13 | nd | nd          | nd          |
| PMA-Ac6 | 20,84 | 29,47 | nd          | nd          | 48,15 | nd    | nd          | nd          | 7,67  | nd | nd          | nd          |

Tabla 22 (continuación). Inhibición de la viabilidad celular del segundo subgrupo (acridinas) de la serie sobre líneas tumorales hematológicas (HEL, K562 y HL60) determinada por ensayo de MTT.

| ID        | HEL   |       |           |    | K562  |       |             |             | HL60  |    |           |    |
|-----------|-------|-------|-----------|----|-------|-------|-------------|-------------|-------|----|-----------|----|
|           | S (%) |       | IC50 (µM) |    | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |    | IC50 (µM) |    |
|           | M     | SD    | M         | SD | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD | M         | SD |
| PMA-Ac7   | 39,78 | 36,99 | nd        | nd | 91,48 | 14,89 | <b>1,88</b> | <b>0,36</b> | 71,23 | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac8   | 49,58 | 30,81 | nd        | nd | 53,57 | nd    | nd          | nd          | 26,10 | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac9   | 38,61 | 33,80 | nd        | nd | 72,92 | 2,30  | <b>3,38</b> | <b>0,49</b> | 48,42 | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac10  | 24,75 | 15,47 | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac11  | 32,66 | 20,06 | nd        | nd | 6,04  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac12  | 57,92 | 34,49 | nd        | nd | 85,65 | 10,04 | <b>2,57</b> | <b>1,73</b> | 56,31 | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac13  | 19,25 | 27,23 | nd        | nd | 20,56 | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac14  | 14,48 | 10,84 | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac15  | 13,91 | 19,68 | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac16  | 23,03 | 26,49 | nd        | nd | 13,51 | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac17  | 21,96 | 14,07 | nd        | nd | 4,31  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac18  | 29,71 | 17,66 | nd        | nd | 24,81 | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac19  | 28,09 | 2,45  | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac20  | 38,44 | 11,76 | nd        | nd | 18,55 | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac21  | 22,78 | 6,10  | nd        | nd | 2,30  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac22  | 32,50 | 23,65 | nd        | nd | 51,19 | nd    | nd          | nd          | 4,94  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac23  | 13,70 | 19,37 | nd        | nd | 24,53 | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac24* | nd    | nd    | nd        | nd | nd    | nd    | nd          | nd          | nd    | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac25  | 30,97 | 6,41  | nd        | nd | 20,05 | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac26  | 28,84 | 10,45 | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac27  | 31,95 | 8,58  | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac28  | 31,30 | 7,98  | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac29  | 34,68 | 10,30 | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac30  | 21,37 | 3,51  | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Ac31  | 26,05 | 13,88 | nd        | nd | 0,00  | nd    | nd          | nd          | 0,00  | nd | nd        | nd |
| PMA-Emb   | 40,94 | 16,57 | nd        | nd | 15,42 | nd    | nd          | nd          | 5,30  | nd | nd        | nd |

Se representa el porcentaje de inhibición de viabilidad celular (S) resultado del tratamiento con los diferentes compuestos a dosis fija (10 µM). Los valores de IC50 (µM), mostrados en negrita, fueron calculados en aquellos compuestos con una S mayor del 60% a dosis fija de 10 µM. Los tratamientos se mantuvieron 48-72h. Tanto para los valores de S como para los de IC50, los datos se presentan como media (M) ± desviación estándar de la media (SD). ID: identificación de los compuestos; nd: no determinado. "FLAVO" y "DOXO": abreviaturas para Flavopiridol y Doxorubicina, respectivamente, que fueron utilizadas como controles positivos de toxicidad. El producto PMA-Ac24 tuvo problemas de disolución y no fue ensayado.

En este subgrupo de la quimioteca se detecta una baja acción antitumoral en general, con reducidos porcentajes de inhibición de la viabilidad celular a dosis fija que impidieron el cálculo de sus valores de IC50. De 32 compuestos, sólo se pudieron calcular las IC50 de 4 compuestos, todos en la línea K562, lo que sugiere que poseen selectividad antileucémica hacia células de LMC.

Los resultados del cribado del subgrupo de pirazoles de esta quimioteca contribuyeron a la publicación de Martín-Acosta *et al.* (2021) “*Modular Synthesis and Antiproliferative Activity of New Dihydro-1Hpyrazolo [1,3-b] pyridine Embelin Derivatives*” Pharmaceuticals (211).

#### 1.4. Análogos del híbrido naftoquinona-cumarina

Los resultados del cribado de los 48 compuestos análogos al híbrido naftoquinona-cumarina se recogen en la **Tabla 23**.

**Tabla 23.** Inhibición de la viabilidad celular de la serie de compuestos “análogos de híbrido naftoquinona-cumarina” sobre líneas tumorales hematológicas (HEL, K562 y HL60) determinada por ensayo de MTT.

| ID     | HEL   |       |             |             | K562  |       |             |             | HL60  |       |             |             |
|--------|-------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|
|        | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             |
|        | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          |
| NPQ-C6 | 95,52 | 0,49  | <b>1,30</b> | <b>0,60</b> | 70,75 | 5,01  | <b>1,40</b> | <b>0,70</b> | 96,22 | 2,78  | <b>0,30</b> | <b>0,10</b> |
| JKST1  | 17,40 | 13,95 | >10         | nd          | 23,00 | 12,44 | >10         | nd          | 24,71 | 5,55  | >10         | nd          |
| JKST2  | 0,00  | 0,00  | >10         | nd          | 7,49  | 4,29  | >10         | nd          | 0,00  | 7,77  | >10         | nd          |
| JKST3  | 18,02 | 15,16 | >10         | nd          | 44,55 | 23,49 | >10         | 0,00        | 28,04 | 36,71 | >10         | nd          |
| JKST4  | 53,88 | 2,16  | >10         | nd          | 52,03 | 13,50 | >10         | nd          | 24,04 | 2,89  | >10         | nd          |
| JKST5  | 89,96 | 6,93  | <b>3,81</b> | <b>0,44</b> | 76,41 | 20,94 | <b>7,49</b> | <b>0,87</b> | 87,19 | 8,42  | <b>5,22</b> | <b>0,59</b> |
| JKST6  | 91,97 | 6,81  | <b>1,02</b> | <b>0,27</b> | 93,98 | 3,89  | <b>0,66</b> | <b>0,23</b> | 90,21 | 12,28 | <b>0,88</b> | <b>0,16</b> |
| JKST7  | 50,78 | 26,67 | >10         | nd          | 76,58 | 11,66 | <b>7,18</b> | <b>1,16</b> | 65,10 | 2,66  | <b>3,39</b> | <b>1,32</b> |
| JKST8  | 14,41 | 20,38 | >10         | nd          | 15,05 | 8,28  | >10         | nd          | 0,00  | 8,45  | >10         | nd          |
| JKST9  | 16,25 | 22,21 | >10         | nd          | 1,93  | 4,93  | >10         | nd          | 0,00  | 11,79 | >10         | nd          |
| JKST10 | 34,22 | 8,33  | >10         | nd          | 29,38 | 23,44 | >10         | nd          | 0,00  | 3,54  | >10         | nd          |
| JKST11 | 91,38 | 11,41 | <b>1,69</b> | <b>0,93</b> | 93,23 | 14,07 | <b>1,85</b> | <b>0,78</b> | 77,85 | 19,04 | <b>1,87</b> | <b>0,76</b> |
| JKST12 | 99,47 | 4,67  | <b>1,20</b> | <b>0,05</b> | 91,01 | 5,99  | <b>2,06</b> | <b>0,70</b> | 90,76 | 10,30 | <b>1,93</b> | <b>0,52</b> |
| JKST13 | 92,24 | 9,06  | <b>1,51</b> | <b>0,84</b> | 95,99 | 6,38  | <b>1,01</b> | <b>0,42</b> | 76,68 | 22,02 | <b>1,82</b> | <b>0,87</b> |
| JKST14 | 57,77 | 32,43 | >10         | nd          | 91,02 | 5,70  | <b>3,74</b> | <b>0,94</b> | 41,79 | 24,72 | >10         | nd          |
| JKST15 | 96,81 | 2,66  | <b>2,83</b> | <b>0,95</b> | 95,21 | 6,06  | <b>4,09</b> | <b>0,26</b> | 82,18 | 10,12 | <b>4,34</b> | <b>0,23</b> |
| JKST16 | 17,32 | 24,50 | >10         | nd          | 0,00  | 12,01 | >10         | nd          | 0,00  | 5,10  | >10         | nd          |
| JKST17 | 66,60 | 33,59 | >10         | nd          | 85,08 | 10,67 | <b>5,97</b> | <b>1,07</b> | 83,60 | 6,01  | <b>4,00</b> | <b>0,70</b> |
| JKST18 | 43,15 | 37,48 | >10         | nd          | 73,21 | 23,61 | <b>3,47</b> | <b>0,24</b> | 47,26 | 24,10 | >10         | nd          |
| JKST19 | 55,87 | 25,29 | >10         | nd          | 61,23 | 33,60 | >10         | nd          | 56,56 | 10,10 | >10         | nd          |
| JKST20 | 38,87 | 27,15 | >10         | nd          | 48,39 | 13,14 | >10         | nd          | 43,61 | 25,90 | >10         | nd          |
| JKST21 | 43,88 | 16,66 | >10         | nd          | 49,00 | 50,73 | >10         | nd          | 21,86 | 12,30 | >10         | nd          |
| JKST22 | 16,22 | 22,93 | >10         | nd          | 7,88  | 12,09 | >10         | nd          | 0,00  | 24,06 | >10         | nd          |

Tabla 23 (continuación). Inhibición de la viabilidad celular de la serie de compuestos “análogos de híbrido naftoquinona-cumarina” sobre líneas tumorales hematológicas (HEL, K562 y HL60) determinada por ensayo de MTT.

| ID     | HEL    |       |             |             | K562   |       |             |             | HL60  |       |             |             |
|--------|--------|-------|-------------|-------------|--------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------------|-------------|
|        | S (%)  |       | IC50 (µM)   |             | S (%)  |       | IC50 (µM)   |             | S (%) |       | IC50 (µM)   |             |
|        | M      | SD    | M           | SD          | M      | SD    | M           | SD          | M     | SD    | M           | SD          |
| JKST23 | 36,17  | 17,42 | >10         | nd          | 15,98  | 33,72 | >10         | nd          | 45,09 | 30,02 | >10         | nd          |
| JKST24 | 11,33  | 16,03 | >10         | nd          | 0,00   | 24,38 | >10         | nd          | 0,00  | 21,10 | >10         | nd          |
| JKST25 | 65,60  | 12,75 | <b>9,29</b> | <b>0,90</b> | 48,23  | 6,59  | >10         | nd          | 60,31 | 5,84  | <b>7,93</b> | <b>1,90</b> |
| JKST26 | 25,35  | 1,47  | >10         | nd          | 0,00   | 32,96 | >10         | nd          | 0,00  | 17,31 | >10         | nd          |
| JKST27 | 55,91  | 2,95  | >10         | nd          | 23,54  | 13,58 | >10         | nd          | 46,24 | 14,51 | >10         | nd          |
| JKST28 | 28,09  | 4,91  | >10         | nd          | 44,38  | 10,90 | >10         | nd          | 0,00  | 25,60 | >10         | nd          |
| JKST29 | 19,71  | 0,49  | >10         | nd          | 0,00   | 25,17 | >10         | nd          | 0,00  | 18,84 | >10         | nd          |
| JKST30 | 12,13  | 17,16 | >10         | nd          | 0,00   | 15,17 | >10         | nd          | 19,37 | 11,45 | >10         | nd          |
| JKST31 | 12,13  | 19,94 | >10         | nd          | 0,00   | 31,56 | >10         | nd          | 0,00  | 21,60 | >10         | nd          |
| JKST32 | 12,88  | 11,37 | >10         | nd          | 0,00   | 21,71 | >10         | nd          | 0,00  | 13,82 | >10         | nd          |
| JKST33 | 11,03  | 15,60 | >10         | nd          | 6,56   | 35,30 | >10         | nd          | 0,00  | 11,19 | >10         | nd          |
| JKST34 | 12,47  | 15,10 | >10         | nd          | 0,00   | 36,56 | >10         | nd          | 0,00  | 15,70 | >10         | nd          |
| JKST35 | 98,82  | 4,27  | <b>0,91</b> | <b>0,24</b> | 91,84  | 11,31 | <b>1,65</b> | <b>0,61</b> | 91,09 | 8,51  | <b>2,03</b> | <b>0,25</b> |
| JKST36 | 5,56   | 7,86  | >10         | nd          | 0,00   | 39,81 | >10         | nd          | 0,00  | 4,12  | >10         | nd          |
| JKST37 | 7,60   | 10,75 | >10         | nd          | 0,00   | 39,26 | >10         | nd          | 0,00  | 19,56 | >10         | nd          |
| JKST38 | 8,29   | 11,73 | >10         | nd          | 1,35   | 34,24 | >10         | nd          | 0,00  | 44,78 | >10         | nd          |
| JKST39 | 100,00 | 0,00  | <b>2,28</b> | <b>0,85</b> | 100,00 | 2,50  | <b>1,24</b> | <b>0,06</b> | 90,54 | 2,81  | <b>5,03</b> | <b>1,52</b> |
| JKST40 | 13,25  | 12,03 | >10         | nd          | 21,11  | 13,20 | >10         | nd          | 16,38 | 10,65 | >10         | nd          |
| JKST41 | 100,00 | 0,00  | <b>1,59</b> | <b>0,57</b> | 100,00 | 4,10  | <b>1,76</b> | <b>0,76</b> | 92,26 | 1,65  | <b>3,55</b> | <b>1,77</b> |
| JKST42 | 30,30  | 5,56  | >10         | nd          | 4,72   | 12,60 | >10         | nd          | 0,77  | 5,72  | >10         | nd          |
| JKST43 | 14,12  | 0,85  | >10         | nd          | 0,00   | 7,80  | >10         | nd          | 0,00  | 23,91 | >10         | nd          |
| JKST44 | 4,49   | 2,79  | >10         | nd          | 0,00   | 8,90  | >10         | nd          | 0,00  | 23,71 | >10         | nd          |
| JKST45 | 3,81   | 1,91  | >10         | nd          | 0,00   | 6,30  | >10         | nd          | 0,00  | 20,94 | >10         | nd          |
| JKST46 | 0,00   | 3,28  | >10         | nd          | 1,49   | 3,80  | >10         | nd          | 0,00  | 18,13 | >10         | nd          |
| JKST47 | 1,18   | 5,37  | >10         | nd          | 8,28   | 5,00  | >10         | nd          | 0,00  | 15,89 | >10         | nd          |
| JKST48 | 5,37   | 1,84  | >10         | nd          | 4,45   | 1,50  | >10         | nd          | 0,00  | 11,14 | >10         | nd          |

Se representa el porcentaje de inhibición de viabilidad celular (S) resultado del tratamiento con los diferentes compuestos a dosis fija (10 µM). Los valores de IC50 (µM), mostrados en negrita, fueron calculados en aquellos compuestos con una S mayor del 60% a dosis fija de 10 µM. Los tratamientos se mantuvieron 48-72h. Tanto para los valores de S como para los de IC50, los datos se presentan como media (M) ± desviación estándar de la media (SD). ID: identificación de los compuestos; nd: no determinado.

Este grupo de compuestos mostró actividades citotóxicas muy diversas, lo cual permitió realizar estudios estructura-actividad reuniendo información sobre las modificaciones estructurales que dieron lugar a potencias antitumorales intensificadas o reducidas. A continuación, se muestra una figura representativa de compuestos JKST que contribuyeron al estudio de la relación estructura-actividad de la quimioteca (**Figura 35**).

IV. RESULTADOS. PRIMERA PARTE

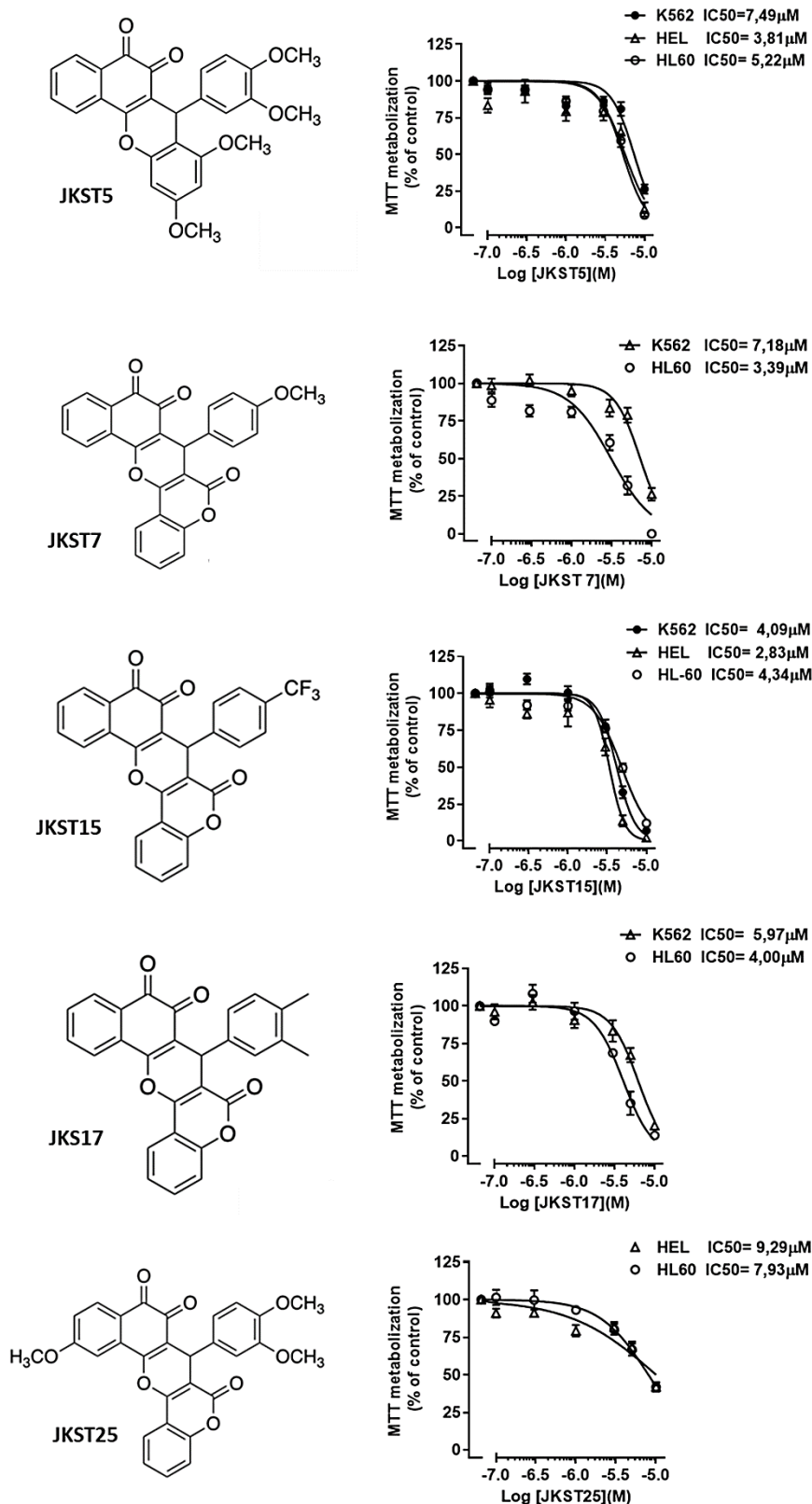
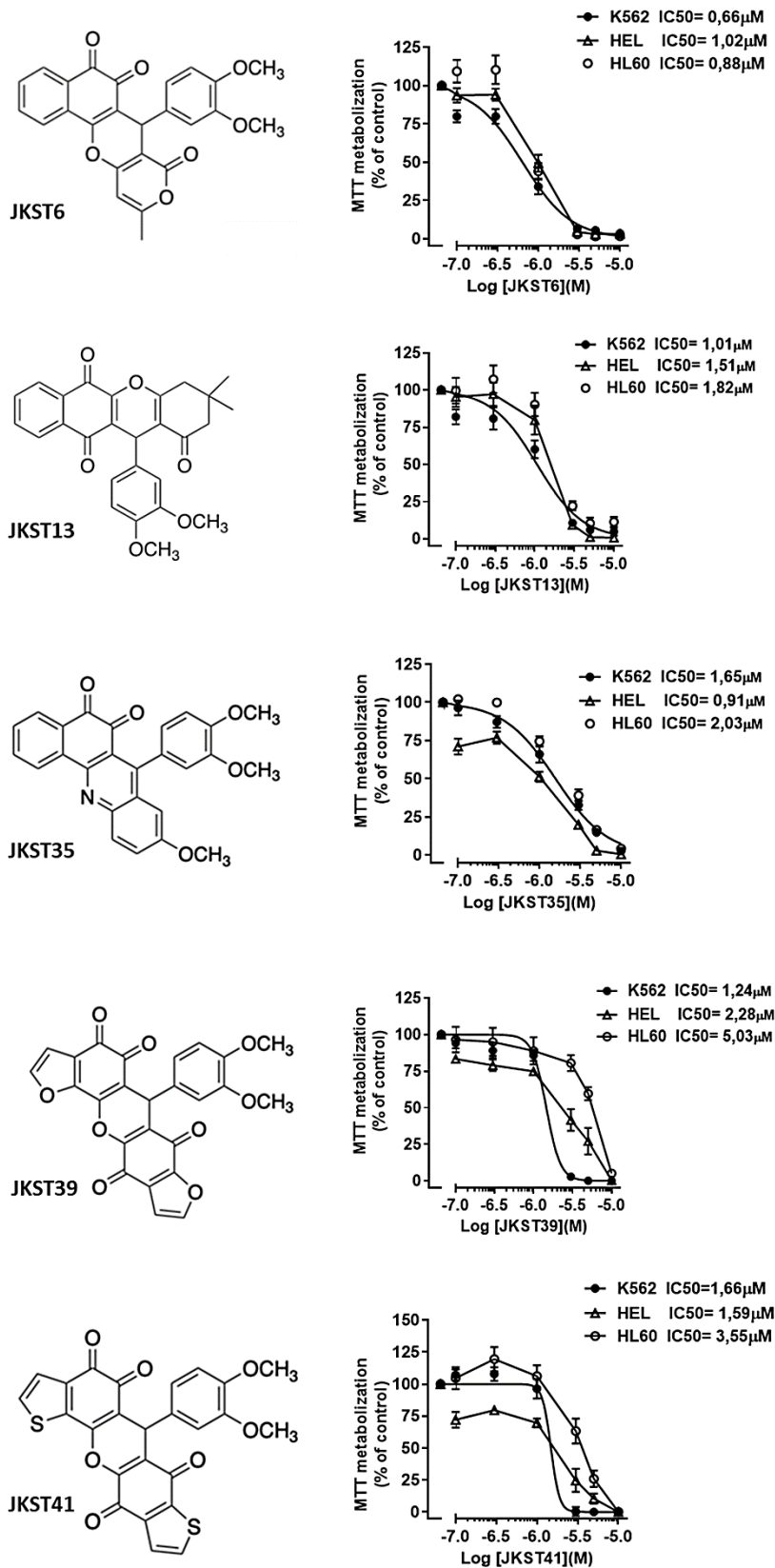


Figura 35. Muestra representativa de los compuestos de la serie “análogos del híbrido naftoquinona-cumarina” empleados en el estudio de la relación estructura-actividad en las líneas hematológicas HEL, K562 y HL60. A la izquierda se muestra la estructura química de los compuestos y a la derecha la inhibición de la viabilidad celular en forma de IC<sub>50</sub> media de las réplicas experimentales (48-72 horas de tratamiento) en las células de la leyenda.

De estos estudios, se pueden extraer las siguientes ideas principales: las modificaciones estructurales en el grupo aldehído supusieron una disminución de la actividad citotóxica de los compuestos, destacando la importancia de los grupos metoxilos ( $\text{OCH}_3$ ) en la actividad antitumoral; además, las modificaciones en el grupo quinona dieron lugar a compuestos inestables, que impidieron en ciertos casos el estudio de su actividad biológica; por último, las modificaciones en el grupo cumarina dieron lugar a compuestos con actividad antitumoral eficaz. Sin embargo, en estos grupos separados por modificaciones estructurales se pueden encontrar compuestos que representan una excepción a estas características generales (160).

En este contexto, los compuestos JKST6, JKST13, JKST35, JKST39 y JKST41 fueron seleccionados por presentar una actividad antitumoral destacada (valores de  $\text{IC}_{50} < 5\mu\text{M}$ ) (**Figura 36**).

IV. RESULTADOS. PRIMERA PARTE



**Figura 36.** Compuestos de la serie química “análogos de naftoquinona-cumarina” que mostraron inhibición de viabilidad celular potente en las líneas hematológicas HEL, K562 y HL60. A la izquierda se expone la estructura química de los compuestos y a la derecha la gráfica de dosis-efecto que representa la media de IC50 calculada a partir de las réplicas experimentales (48-72 horas de tratamiento).

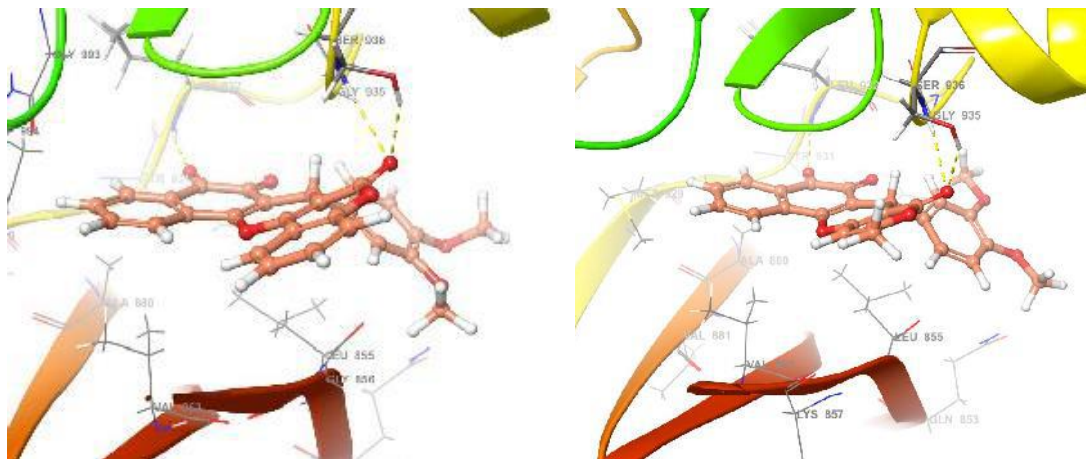
Las modificaciones concretas observadas en el compuesto líder (NPQ-C6) que dieron lugar a estos compuestos con actividad antitumoral eficaz se resumen brevemente a continuación. En el caso del JKST6, el núcleo cumarina se sustituyó por una pirona, en el JKST13 se sustituyó por una dimedona; en el JKST35 por un grupo quinolina. Por otro lado, de la modificación estructural de la quinona, se encontraron dos compuestos con alta actividad citotóxica, JKST39 y JKST41.

El compuesto que mostró mejor actividad citotóxica tras las modificaciones en las líneas de leucemia humana investigadas fue el JKST6, para el que se obtuvo una actividad antitumoral mejorada en todas las líneas estudiadas respecto al compuesto líder, excepto para la línea celular HL60, donde el NPQ-C6 tenía menor IC<sub>50</sub> ( $0,30 \pm 0,10 \mu\text{M}$ ) que el JKST6 ( $0,88 \pm 0,16 \mu\text{M}$ ).

Una forma de impulsar la elección del compuesto candidato para seguir investigando su mecanismo de acción antitumoral es realizar estudios de *docking* molecular que “predicen” posibles uniones de los compuestos a dianas de interés. En este caso se eligieron las proteína-quinasa JAK2 y ABL1, dado su papel crítico en vías de señalización desreguladas en cánceres hematológicos, como es JAK/STAT. Al tratarse de una quimioteca sintetizada a partir del compuesto líder precursor NPQ-C6, los datos de *docking score* se compararon directamente con los obtenidos para dicho producto.

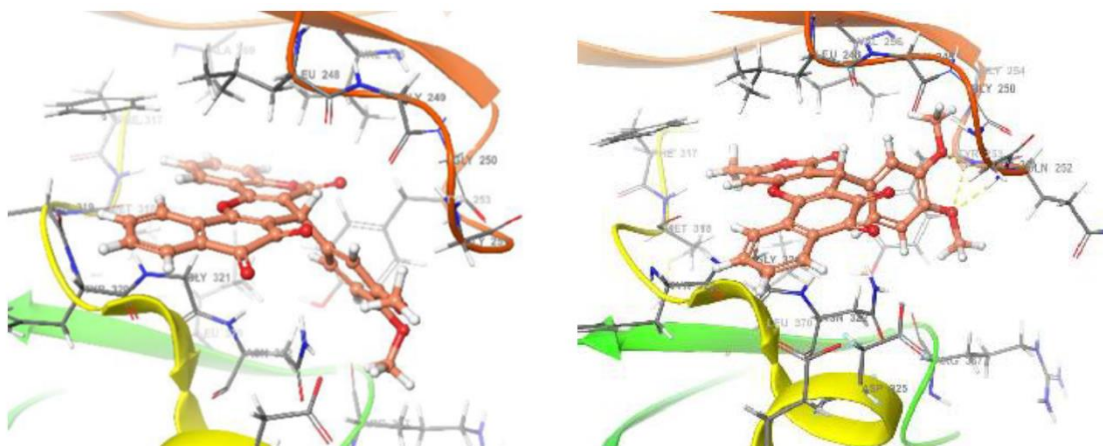
Como puede observarse en la **Figura 37**, el JKST6 establece las mismas interacciones que el compuesto NPQ-C6 con el sitio catalítico de JAK2 ya que se forman dos enlaces de hidrógeno entre el compuesto y los residuos Leu 932 y Ser 936, con un valor alto de *docking score* con esta quinasa ( $-9,60 \text{ Kcal/mol}$ ). De forma muy similar, los valores más altos de *docking score* para NPQ-C6 y JAK2 se encontraban en el rango ( $-8,32$  a  $-10,1 \text{ Kcal/mol}$ ).





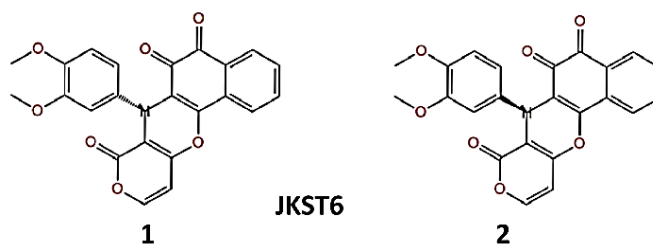
**Figura 37. Modelado molecular de la unión con JAK2.** Predicción del modo de unión al dominio catalítico de JAK2 del compuesto líder NPQ-C6 (PDB:2CQC, izquierda) y del JKST6 (PDB:5GF4, derecha).

El patrón de unión del JKST6 a ABL1 fue estudiado también por *docking* molecular flexible, mostrando un valor de *docking score* similar al del compuesto líder, siendo -6,07 Kcal/mol para JKST6 y -6,12 Kcal/mol para NPQ-C6. Además, la predicción de unión del compuesto al sitio catalítico de la enzima también resultó análoga a la del NPQ-C6. El cambio del anillo aromático de la cumarina por un grupo pirona permite una inserción más profunda en la zona de bisagra de la proteína. Esta variación motiva la presencia de más interacciones entre el compuesto y la diana en comparación con las establecidas por el compuesto líder. Algunas de ellas son: interacciones  $\pi$ - $\pi$  *stacking* del anillo aromático del aldehído con la Tyr 253, tres interacciones por enlaces de hidrógeno entre Gln 252 y Tyr 253 y los dos grupos metoxilo, así como un gran número de interacciones hidrofóbicas entre esta molécula y diferentes residuos del centro activo de la proteína (Leu 248, Gly 251, Tyr 253, Phe 317, Met 318 y Leu 370) (**Figura 38**).



**Figura 38. Modelado molecular de la unión con BCR-ABL1.** Predicción del modo de unión del compuesto líder NPQ-C6 (izquierda) y del derivado JKST6 (derecha) con el dominio catalítico de ABL1 (PDB:2GQG).

Para completar la elección del compuesto, se realizaron estudios *ADME in silico* para determinar las características tipo fármaco del JKST6. En concreto, se estudiaron las propiedades farmacocinéticas y las cualidades fisicoquímicas de los enantiómeros del JKST6, que se muestran en la **Figura 39**.



**Figura 39. Enantiómeros del JKST6 investigados en el estudio ADME.** Los enantiómeros se simbolizan como 1 y 2.

Los resultados del estudio *ADME in silico* de los enantiómeros del JKST6 se detallan en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Tabla con las predicciones del estudio ADME *in silico* de los enantiómeros 1-2.

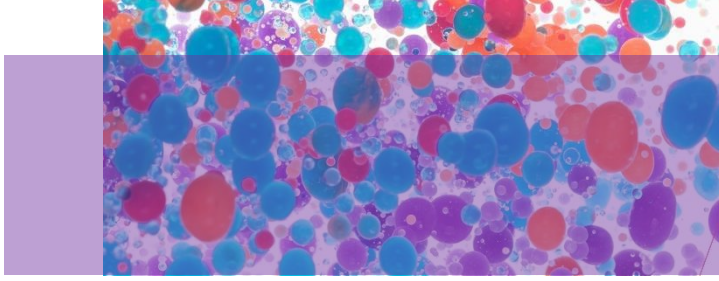
| Propiedades | Rango (valores)                     | 1       | 2       |
|-------------|-------------------------------------|---------|---------|
| #stars      | 0-1                                 | 0       | 0       |
| CNS         | -2 (inactivo) a +2 (activo)         | -1      | -1      |
| QPlogBB     | -3.0 a 1.2                          | -0,801  | -0,801  |
| QPPCaco2    | <25 deficiente<br>>500 eficiente    | 527,498 | 526,791 |
| QPPMDCK     | <25 deficiente<br>>500 eficiente    | 247,801 | 247,443 |
| QPlogKhsa   | -1.5 a 1.5                          | -0,333  | -0,333  |
| QPlogPo/w   | -2.0 a 6.5                          | 2,246   | 2,246   |
| QPlogKp     | -8.0 a -1.0                         | -2,711  | -2,712  |
| QPlogS      | -6.5 a 0.5                          | -3,459  | -3,459  |
| #metab      | 1 a 8                               | 3       | 3       |
| % HOA       | <80% alta<br><25% baja              | 88,822  | 88,81   |
| HOA         | 1, 2 o 3 para bajo,<br>medio o alto | 3       | 3       |
| PSA         | 7 a 200                             | 92,04   | 92,04   |
| SASA        | 300 a 1000                          | 634,208 | 634,188 |
| MW          | 130 a 725                           | 416,386 | 416,386 |
| #rotor      | 0 a 15                              | 2       | 2       |
| donorHB     | 0 a 6                               | 0       | 0       |
| accptHB     | 2 a 20                              | 8,5     | 8,5     |

#stars (Similitud con otros fármacos como número de valores que caen fuera del rango del 95% de los valores de los fármacos conocidos); CNS (Predicción de la actividad en el sistema nervioso central en una escala de -2 (inactivo) a +2 (activo), QPlogBB (Predicción del coeficiente de partición cerebro/sangre), QPPCaco2 (Predicción de la permeabilidad en la línea de adenocarcinoma colorrectal humana medida en nm/s), QPPMDCK (Predicción de la permeabilidad en la línea de riñón canina Madin-Darby en nm/s), QPlogKhsa (Predicción de la unión a la albúmina humana sérica), QPlogPo/w (Predicción del coeficiente de partición Octanol/Agua), QPlogKp (Predicción de la permeabilidad en la piel), QPlogS (Predicción de la solubilidad acuosa), #metab (Número de reacciones metabólicas probables), % HOA (Predicción de la absorción oral humana de 0 al 100%), HOA (Predicción cualitativa de la absorción oral humana), PSA (Área de superficie de las fuerzas de Van der Waals de los átomos polares (nitrógeno, oxígeno) y de carbonilos), SASA (superficie total accesible al disolvente), MW (Peso molecular), #rotor (Número de enlaces rotables no-triviales y no entorpecidos), donorHB (número de donadores de enlace por puente de hidrógeno), accptHB (número de aceptores de enlace por puente de hidrógeno).

Los valores de predicción obtenidos para los enantiómeros del JKST6 poseen valores muy similares entre ellos, lo que indica que ambas disposiciones estructurales no difieren notablemente en sus propiedades. Además, sus valores dentro de los rangos analizados son intermedios, describiendo un compuesto con características tipo-fármaco potencialmente adecuadas. Por ejemplo, posee un valor predictivo de coeficiente de repartición octanol/agua (QPlogPo/w) adecuado, un valor de solubilidad en medio acuoso

aceptable (QPlogS), unos valores de absorción oral altos (%HOA, HOA), y unos valores de superficie total accesible con solvente altos (SASA). Por otro lado, posee un valor de reacciones metabólicas por vía hepática (#metab) de 3, que aun siendo un valor relativamente bajo requiere consideración. El valor de permeabilidad en el modelo celular Caco-2 se ha descrito como un valor eficaz para predecir la absorción intestinal humana en caso de administración oral, y en este estudio *in silico* el valor predictivo del JKST6 se clasificaría como eficaz (198).

Dados los resultados del modelado molecular, las predicciones del ADME y las características químicas del compuesto, junto con los potentes valores de inhibición de la viabilidad celular detectado en el cribado, el compuesto JKST6 fue seleccionado para ser estudiado en profundidad desde el punto de vista de su mecanismo de acción antitumoral. En concreto en el contexto de las leucemias humanas, con especial atención a la leucemia mieloide crónica, convirtiéndose así en el centro de los estudios realizados en esta tesis doctoral.



## **V. RESULTADOS. SEGUNDA PARTE**



## 1. JKST6 inhibe la viabilidad de células leucémicas

Para investigar la actividad antitumoral del JKST6 se estudió su efecto sobre la viabilidad celular medida por MTT en ensayos de dosis-respuesta, en distintas líneas celulares (tumores hematológicas, tumorales de mama y no tumorales). Como se observa en la **Tabla 25**, el compuesto demostró ser altamente efectivo en las líneas celulares derivadas de neoplasias sanguíneas (ej. K562, MOLM-13, HL60, HEL, MV 4.11, JURKAT), comparado con su efecto en células derivadas de cáncer de mama o endometrio (BT-549, MDA-MB-231, HS-578T, ISHIKAWA) o células no malignas (RAW 264.7, Vero, hMSC-TERT, PBMCs).

**Tabla 25. Efecto de JKST6 sobre la viabilidad de células de cáncer (sanguíneas y tumores sólidos) y células sanas.**

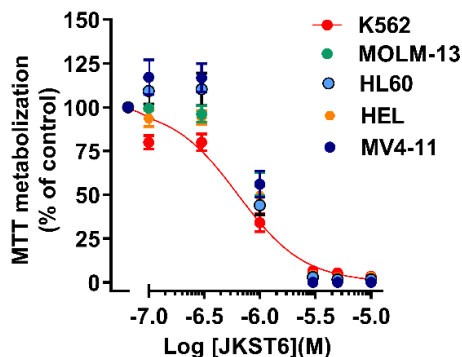
| Tipo celular | Línea celular | IC50 ( $\mu\text{M}$ ; media $\pm$ SEM) | Tipo celular | Línea celular   | IC50 ( $\mu\text{M}$ ; media $\pm$ SEM) |
|--------------|---------------|---|--------------|-----------------|---|
| NH           | K562          | 0.66 $\pm$ 0.29                         | BC           | MDA-MB-231      | 2.70 $\pm$ 0.16                         |
| NH           | MOLM-13       | 0.71 $\pm$ 0.20                         | BC           | MCF7            | 3.18 $\pm$ 0.21                         |
| NH           | HL60          | 0.88 $\pm$ 0.09                         | BC           | HS-578T         | 3.25 $\pm$ 1.20                         |
| NH           | HEL           | 1.02 $\pm$ 0.16                         | NM           | hMSC-TERT       | 4.61 $\pm$ 1.27                         |
| NH           | MV4.11        | 1.04 $\pm$ 0.08                         | BC           | SKBR3           | 4.68 $\pm$ 0.62                         |
| CE           | ISHIKAWA      | 1.43 $\pm$ 0.19                         | NM           | RAW 264.7       | 5.13 $\pm$ 0.95                         |
| NH           | JURKAT        | 1.69 $\pm$ 0.01                         | NM           | PMBC            | 5.68 $\pm$ 0.9                          |
| BC           | BT-549        | 1.99 $\pm$ 0.87                         | NM           | Vero            | 6.44 $\pm$ 2.02                         |
| NM           | MCF10A        | 2.27 $\pm$ 0.16                         | NM           | EV6 lymphocytes | >10 $\pm$ nd                            |

Células tratadas con vehículo (0,05 % DMSO) o JKST6 (0,01 a 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24-72 h. La viabilidad celular se estudió con el ensayo de MTT tal como se describe en Material y Métodos. NH: neoplasia hematológica; CE: cáncer de endometrio; NM: no malignas; BC: cáncer de mama. nd: no determinado.

## 2. JKST6 afecta a la viabilidad de células de LMC

Para evaluar la potencial especificidad del JKST6 se compara su potencia antitumoral en distintas líneas tumorales hematológicas, demostrando tener un mayor efecto en la inhibición de la viabilidad celular en la línea leucémica mieloide crónica

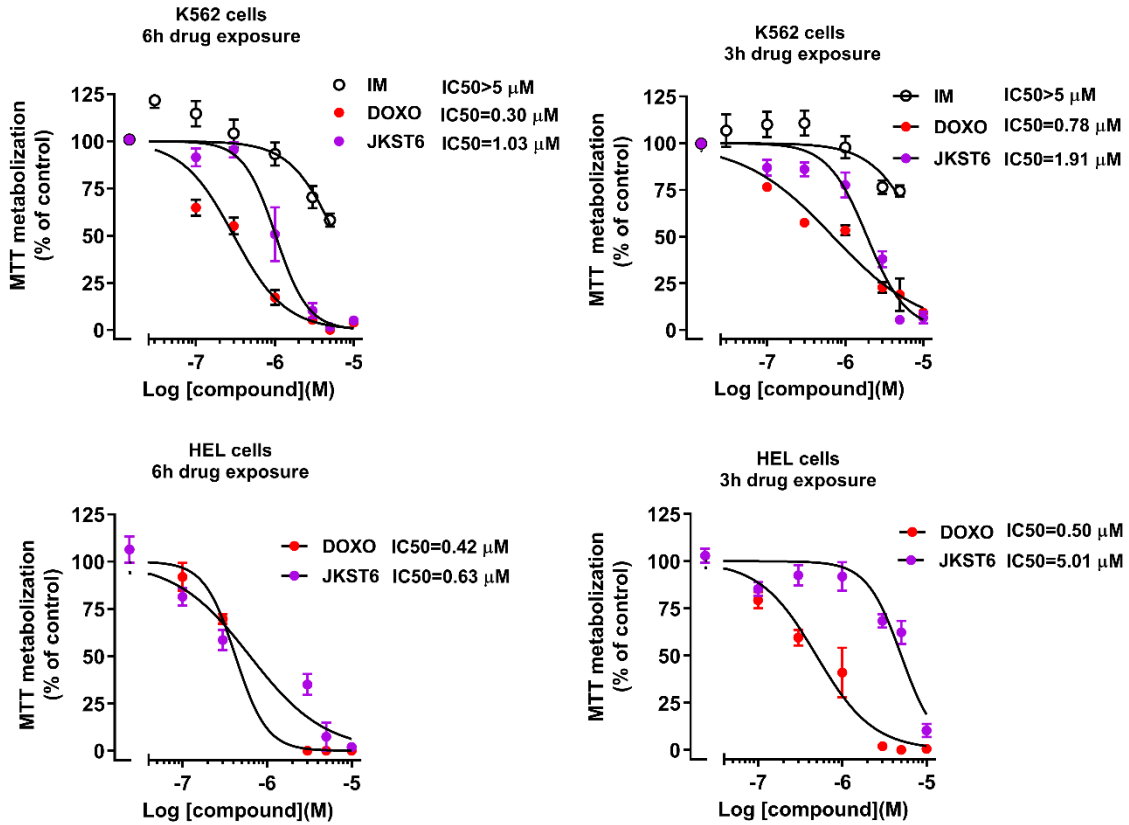
humana K562, en comparación con otras líneas celulares derivadas de neoplasias sanguíneas (**Figura 40**).



**Figura 40. Determinación de viabilidad celular en neoplasias hematológicas tratadas con JKST6.** Células derivadas de NH humanas expuestas a diferentes concentraciones de JKST6 (0,01 - 10  $\mu$ M) durante 48 horas. La viabilidad celular se analizó mediante ensayo de MTT tal como se describe en material y métodos.

Este hallazgo determinó la selección de la línea K562 para futuros experimentos. En concreto, se investigó el efecto del JKST6 tras una corta exposición temporal (6 y 3 horas), seguido de *wash-out* en la viabilidad de las células de LMC comparada con las células HEL (eritroleucemia), 48 horas después del tratamiento. Los datos revelaron que el JKST6 mantenía su potencia antitumoral tras una exposición corta de 6 horas o incluso de 3 horas en células K562. Lo mismo ocurrió con la doxorubicina (DOXO), pero no con el imatinib (IM), que vio reducido su efecto antitumoral a 6 y 3 horas de tratamiento. Estos mismos ensayos en la línea HEL resultaron reveladores ya que el JKST6 conservó su actividad antitumoral tras 6 horas de exposición, pero se vio notablemente reducida cuando la exposición se redujo a 3 horas (**Figura 41**).

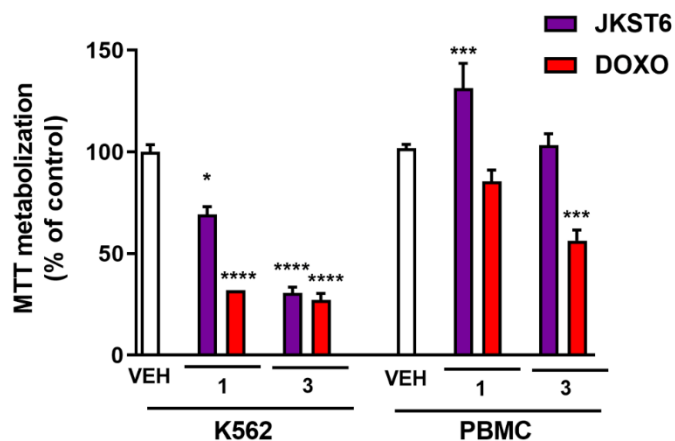




**Figura 41.** Estudio de los efectos irreversibles del JKST6 en la viabilidad de células de LMC y de eritroleucemia. Viabilidad celular medida en K562 (panel superior) y HEL (panel inferior) expuestas a concentraciones crecientes (0.01–10 μM de JKST6, DOXO o IM) durante 6 o 3 horas seguido de pasos de wash-out detallados en el apartado de material y métodos.

### 3. JKST6 causa baja toxicidad *in vitro* e *in vivo*

Para analizar la posible citotoxicidad del JKST6 *in vitro* se evaluó su efecto sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a distintas dosis. Tal como se observa en la **Tabla 25**, la IC<sub>50</sub> del JKST6 en PBMCs resultó 4 veces más alta que en las células de LMC (K562). De hecho, como se muestra en la **Figura 42**, concentraciones bajas del JKST6 (1 y 3 μM) no tuvieron un efecto significativo en la viabilidad de PBMCs pero sí en la de las células K562, mientras que la DOXO redujo la viabilidad celular de K562 y de las PBMCs con una potencia similar (**Figura 42**).



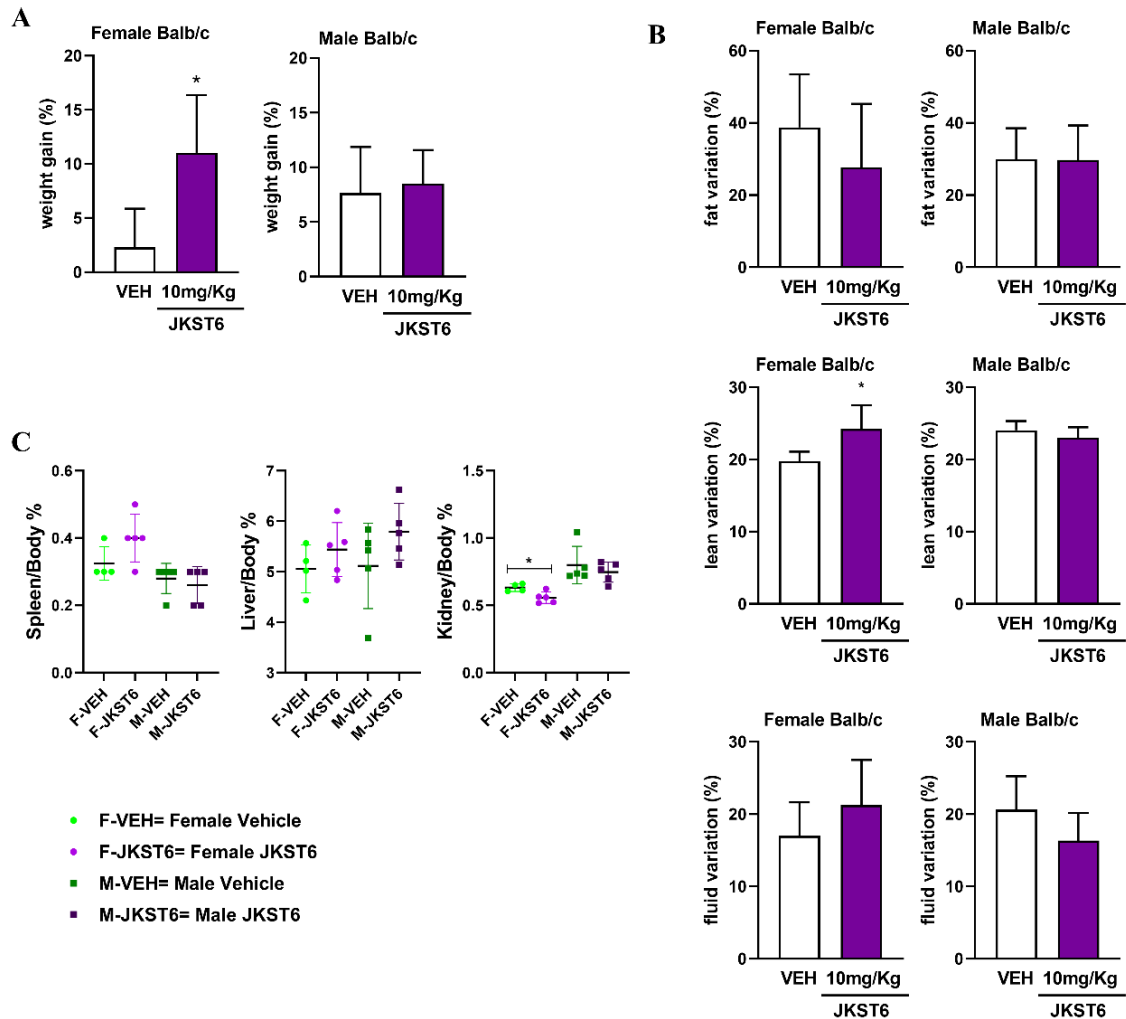
**Figura 42. Efecto del JKST6 en la viabilidad celular determinada en K562 y PBMC.** Las células fueron incubadas con JKST6 o DOXO (ambos a 1 y 3  $\mu$ M) durante 24 horas. Se representa la media  $\pm$  SEM. Valor estadístico calculado con ANOVA de una vía y Bonferroni *post hoc test*. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

La baja toxicidad del JKST6 observada *in vitro* fue confirmada *in vivo*. Para ello, el compuesto JKST6 se administró en ratones mediante ensayos de toxicidad aguda (durante 5 días) y sub-crónica (durante 30 días), y se analizaron sus efectos a nivel local y sistémico.

El test de Irwin o test de toxicidad aguda fue realizado en la Universidad de La Laguna (ULL). Este ensayo determinó que los ratones macho de la cepa FVB experimentaban una leve excitación tras las administraciones del compuesto vía oral (v.o) (50mg/kg) e intraperitoneal (v.i) (10mg/kg). Sin embargo, no hubo alteraciones significativas en el peso corporal total de los animales, ni hubo características morfológicas reseñables en las necropsias realizadas tras la finalización del experimento (**Anexo I. Resultados: test de Irwin**), a excepción de una tendencia al incremento de peso hepático en los ratones tratados con JKST6 por v.o. Para valorar este fenómeno se realizó un estudio de hepatotoxicidad en el cual se aumentó el número de animales tratados, y se demostró que no se producía dicho efecto (**Anexo I. Resultados: informe de hepatotoxicidad**).

El ensayo de toxicidad sub-crónica fue realizado en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). La administración del JKST6 (10 mg/kg) por v.i confirmó la ausencia de signos clínicos asociados al tratamiento (**Anexo I. Resultados: registro de signos clínicos**). El peso y la composición corporal de los ratones macho no cambió significativamente durante el experimento, sin embargo, en el caso de las hembras, hubo

un aumento significativo del peso corporal acompañado de un aumento en la masa magra (**Figura 43**). Por otro lado, la formulación del vehículo (dimetilacetamida (DMA): PEG400: suero salino; 10:40:50) tuvo que ser revisada y cambiada por (dimetilsulfóxido (DMSO): PEG400: suero salino; 10:40:50), debido a la presencia de signos de excitación y dolor en el momento de la administración en ambos grupos de tratamiento (vehículo y JKST6).



**Figura 43. Ensayo de toxicidad sub-crónica del JKST6 en ratones Balb/c.** **A.** Ganancia de peso (%): diferencia del peso corporal entre el día final (día 30 de experimento) y el inicial (día 0 de experimento, antes de la primera inyección). **B.** Composición corporal (magra, grasa y fluido) expresadas como la diferencia entre los valores finales e iniciales recogidos durante el procedimiento. **C.** Peso del bazo, el riñón y el hígado en el punto final del estudio (día 30) expresado como porcentaje del peso corporal total. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM de  $n= 4-5$  animales por grupo. Para comparar grupos tratamiento con grupos control en machos y hembras, se realizaron pruebas de t-Student no pareadas. \*  $p < 0,05$  con respecto a los animales tratados con el vehículo (VEH).

Tampoco se encontraron cambios significativos en las poblaciones celulares sanguíneas ni en los parámetros bioquímicos estudiados en las muestras sanguíneas de los ratones (**Tablas 26-27**).

Tabla 26. Valores de análisis bioquímicos analizados en ratones BALB/c.

| Parámetros      | Hembras (N=5; media ± SD) |                | Machos (N=5; media ± SD) |                |
|-----------------|---------------------------|----------------|--------------------------|----------------|
|                 | Control                   | 10 mg/Kg JKST6 | Control                  | 10 mg/Kg JKST6 |
| TP (g/dl)       | 5,47 ± 0,38               | 5,58 ± 0,22    | 5,92 ± 0,90              | 5,26 ± 1,40    |
| Glu (mg/dl)     | 458,33 ± 14,22            | 297,5 ± 123,75 | 327 ± 125,54             | 386,60 ± 73,23 |
| BUN (mg/dl)     | 16,13 ± 1                 | 17,1 ± 4,88    | 16,72 ± 4,64             | 15,96 ± 3,36   |
| AST (GOT) (U/L) | 56,67 ± 19,5              | 53,75 ± 10,5   | 125 ± 86,69              | 115 ± 55,24    |
| CK (U/L)        | 297,5 ± 183,14            | 145,5 ± 73,55  | 191,5 ± 97,02            | 242,25 ± 99,97 |
| ALT (GPT) (U/L) | 55,67 ± 45,32             | 43,75 ± 15,63  | 113,6 ± 51,25            | 134 ± 43,57    |
| LDH (U/L)       | 262 ± 69,40               | 198,25 ± 27,05 | 323,4 ± 140,22           | 372,2 ± 146,42 |
| ALP (U/L)       | 87,33 ± 7,57              | 82,75 ± 6,45   | 102 ± 35,08              | 75 ± 19,44     |
| CRE (mg/dl)     | 0,69 ± 0,32               | 0,87 ± 0,05    | 0,91 ± 0,3               | 0,75 ± 0,22    |
| BUN/CRE         | 20 ± 4,24                 | 19,75 ± 6,08   | 21,4 ± 4,28              | 22 ± 4,42      |

Valores de análisis bioquímicos para ratones BALB/c hembra (n=10) y macho (n=10) tratados (v.i.) con JKST6 (10mg/kg) o vehículo (VEH; DMSO: PEG400: SALINO) cada 2 días durante 30 días. Los datos se presentan como la media ± SD de grupo tratado y vehículo de hembras y machos. Abreviaturas: TP: proteína total; GLU: glucosa; BUN: nitrógeno ureico en sangre; AST: aspartato aminotransferasa; CK: creatinina quinasa; ALT: alanina aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; ALP: fosfatasa alcalina; CRE: creatinina; BUN/CRE: nitrógeno ureico en la sangre/creatinina

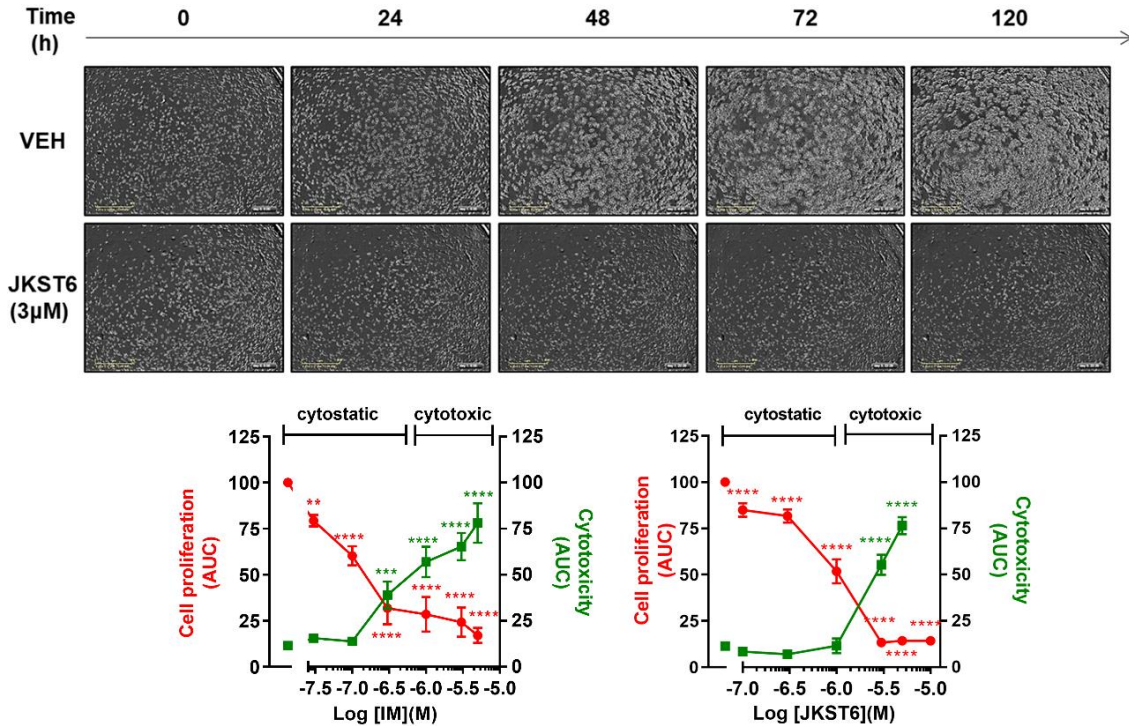
Tabla 27. Valores hematológicos analizados en ratones BALB/c.

| Parámetros medidos                        | Hembras<br>(N=5; media ± SD) |                 | Machos<br>(N=5; media ± SD) |                 |
|---|------------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
|   | Control                      | 10 mg/Kg JKST6  | Control                     | 10 mg/Kg JKST6  |
| Hto (%)                                   | 39,35 ± 5,05                 | 39,56 ± 4,36    | 39,88 ± 5,05                | 37,38 ± 7,64    |
| Hgb (g/dl)                                | 12,35 ± 1,53                 | 12,34 ± 1,13    | 12,86 ± 1,23                | 11,50 ± 1,87    |
| RBC (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )  | 7,42 ± 0,86                  | 7,53 ± 0,49     | 7,22 ± 0,99                 | 6,57 ± 1,43     |
| MCV (fl)                                  | 53,10 ± 1,39                 | 52,50 ± 2,56    | 55,68 ± 6,89                | 57,56 ± 8,29    |
| MCH (pg)                                  | 16,60 ± 0,45                 | 16,32 ± 0,73    | 18,02 ± 3,03                | 17,86 ± 3,61    |
| MCHC (g/dl)                               | 31,35 ± 0,42                 | 31,24 ± 1,69    | 32,34 ± 2,05                | 30,94 ± 2,10    |
| RDW                                       | 9,95 ± 0,24                  | 10,82 ± 0,69*   | 11,16 ± 0,85                | 11,02 ± 0,96    |
| WBC (m/mm <sup>3</sup> )                  | 8,16 ± 4,19                  | 4,72 ± 1,42     | 4,29 ± 1,95                 | 5,03 ± 2,43     |
| LINF (%)                                  | 58,98 ± 5,40                 | 55,42 ± 8,19    | 55,96 ± 7,51                | 50,78 ± 4,94    |
| MON (%)                                   | 8,43 ± 0,99                  | 9,28 ± 2,70     | 9,10 ± 2,20                 | 8,50 ± 3,42     |
| GRA (%)                                   | 32,60 ± 5,39                 | 35,30 ± 7,43    | 34,94 ± 6,48                | 40,72 ± 6,17    |
| LINF (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 4,68 ± 2,12                  | 2,61 ± 0,80     | 2,28 ± 0,84                 | 2,46 ± 1,06     |
| MON (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )  | 0,67 ± 0,34                  | 0,43 ± 0,15     | 0,40 ± 0,26                 | 0,43 ± 0,29     |
| GRA (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )  | 2,82 ± 1,75                  | 1,68 ± 0,69     | 1,60 ± 0,90                 | 2,13 ± 1,22     |
| Pct (%)                                   | 0,22 ± 0,16                  | 0,26 ± 0,10     | 0,31 ± 0,14                 | 0,32 ± 0,23     |
| PLT (m/mm <sup>3</sup> )                  | 429,67 ± 263,39              | 488,50 ± 100,29 | 611,25 ± 52,73              | 681,33 ± 349,16 |
| VPM (fl)                                  | 6,13 ± 0,10                  | 6,06 ± 0,22     | 6,06 ± 0,09                 | 6,38 ± 0,13**   |
| PDW                                       | 8,53 ± 1,37                  | 8,22 ± 1,00     | 7,22 ± 0,96                 | 8,18 ± 0,91     |

Valores hematológicos de ratones BALB/c hembra y macho tratados (v.i) con JKST6 (10mg/Kg) durante 30 días. Los datos como media ± SD de grupo tratado y vehículo de hembras y machos. Para comparar grupos tratamiento con grupos control en machos y hembras, se realizaron pruebas t-Student no pareadas. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  con respecto a los animales tratados con el vehículo (VEH). Abreviaturas: Hto: hematocrito; Hgb: hemoglobina; RBC: recuento de glóbulos rojos; MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: amplitud de distribución eritrocitaria; WBC: recuento de glóbulos blancos; Pct: plaquetocrito; PLT: conteo de plaquetas; VPM: volumen medio de plaquetas; PDW: amplitud de distribución de plaquetas.

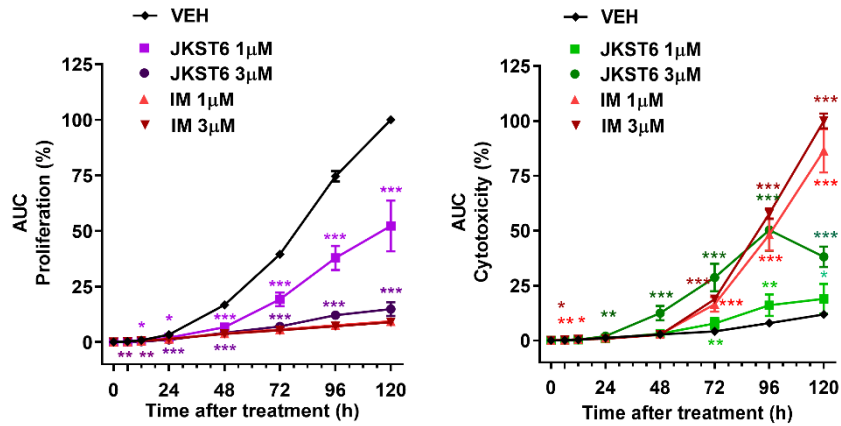
#### 4. JKST6 afecta a la proliferación de células de LMC

Con el sistema Incucyte de adquisición de microfotografías a tiempo real se realizó un estudio detallado del efecto del JKST6 en el crecimiento y la viabilidad de las células K562 en experimentos de larga exposición (5 días). En primer lugar, el ensayo permitió distinguir las dosis a las que se producen efectos citostáticos (menores que 1  $\mu\text{M}$ ) y citotóxicos (mayores que 3  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 44**).



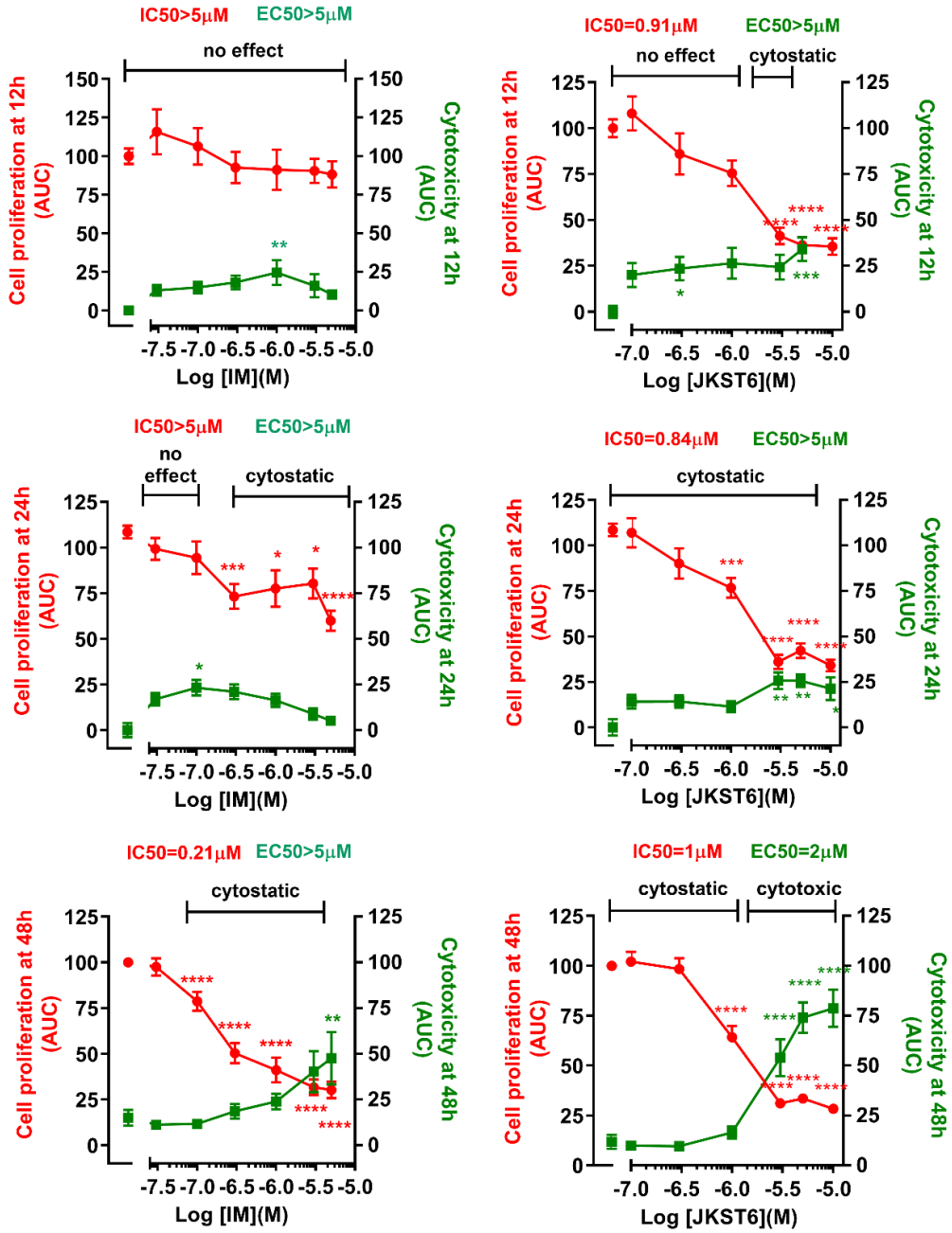
**Figura 44. Determinación de la proliferación y citotoxicidad de K562 expuestas a JKST6 120 horas.** Las células se trataron con vehículo (VEH, DMSO 0,05%) o dosis crecientes (0,01-10µM) de JKST6 durante 5 días. Panel superior: imágenes representativas de células K562 creciendo exponencialmente en presencia de VEH o JKST6 durante 0, 24, 48, 72 y 120 horas. Panel inferior: gráfica que representa el área bajo la curva (AUC) de los parámetros de confluencia en contraste de fase (proliferación) o confluencia verde fluorescente (citotoxicidad) respecto a las concentraciones del IM (control positivo, izquierda) y del JKST6 (derecha). La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguido del *post hoc test* de Bonferroni. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con VEH.

Además, con este sistema se analizó la cinética de los efectos antiproliferativos y procitotóxicos del JKST6 en las células K562 en comparación con el IM. En primer lugar, se compararon y caracterizaron los efectos del JKST6 y el IM a las dosis seleccionadas (1 y 3 µM) a lo largo del tiempo (**Figura 45**).



**Figura 45. Representación comparativa de la acción anti-proliferativa y pro-citotóxica del JKST6 y del IM en K562.** Las células se trataron con 1 y 3 μM de JKST6 o IM durante 120 horas. Se representan las AUC de los parámetros de confluencia en contraste de fase (proliferación, panel izquierdo) o confluencia verde fluorescente (citotoxicidad, panel derecho) respecto al tiempo. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguido del *post hoc test* de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

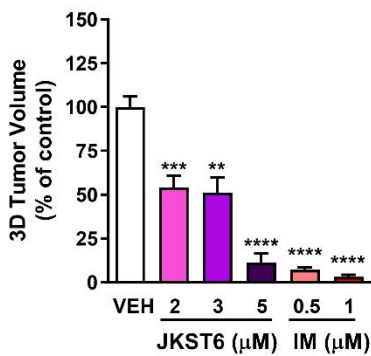
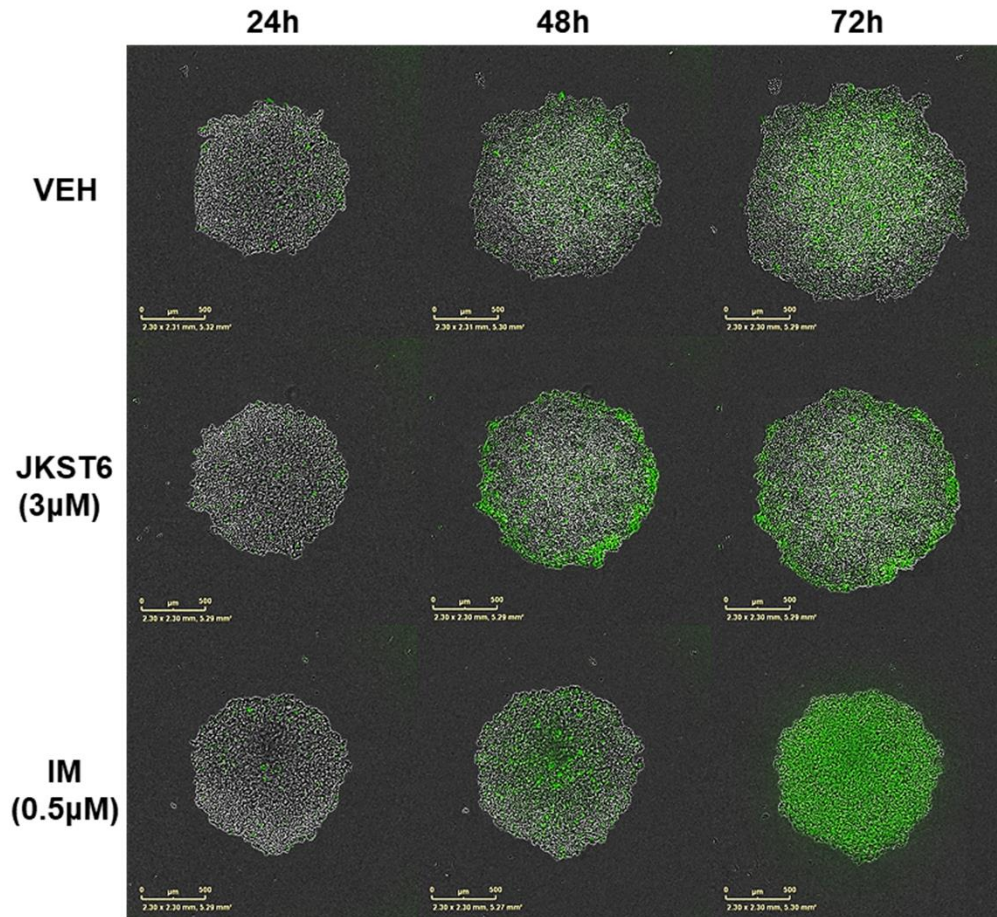
En segundo lugar, se realizaron análisis de la variación de las curvas dosis-efecto a distintos tiempos finales (12, 24 y 48 horas) (**Figura 46**), que proporcionaron información valiosa sobre las dosis eficaces de ambos compuestos en células de LMC que fueron utilizadas en los experimentos posteriores.



**Figura 46. Determinación de la proliferación y citotoxicidad de K562 tratadas con JKST6 a distintos tiempos.** Análisis del área bajo la curva (AUC) registradas a 12, 24 y 48 horas. Se muestran los valores de IC50 y de EC50 de IM (panel izquierdo) y JKST6 (panel derecho). La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguido del *post hoc test* de Bonferroni. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con el vehículo (VEH).

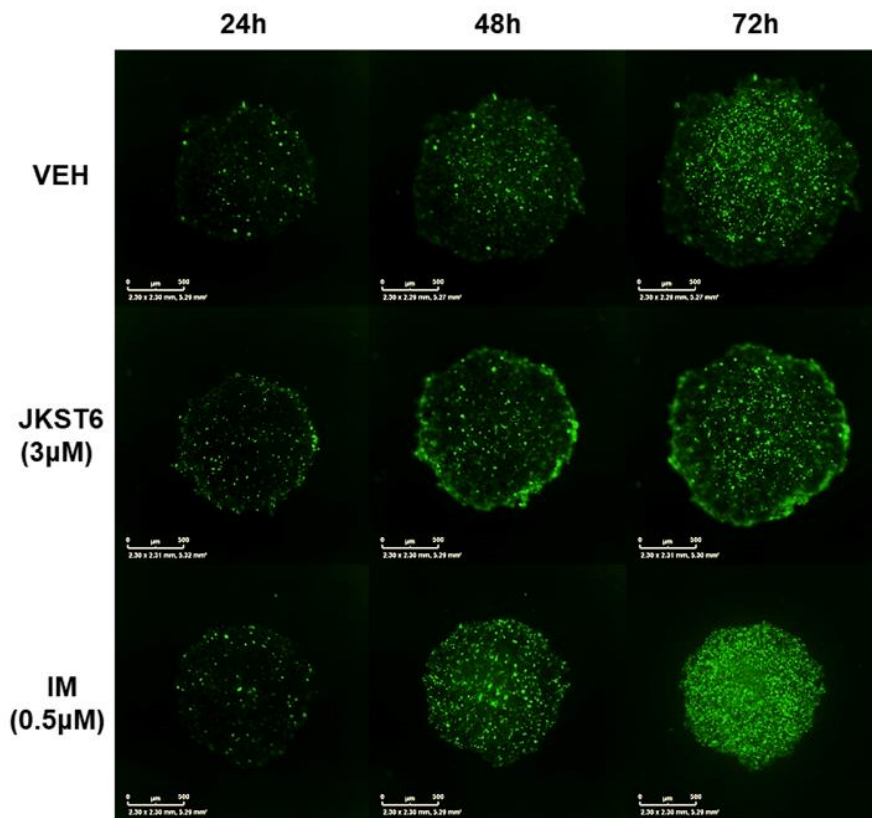


Con el fin de recrear con mayor fidelidad las condiciones de un tumor real *in vivo*, se realizaron cultivos en 3D con las células K562 y se analizó su crecimiento tumoral (esferoide) en presencia de distintas dosis de JKST6 e IM. Como se observa en la **Figura 47**, el tratamiento con JKST6 produjo una reducción significativa del crecimiento del esferoide respecto al esferoide tratado con vehículo.



**Figura 47. Volumen del cultivo 3D de K562 expuestas a vehículo (VEH), JKST6 (2, 3, y 5  $\mu\text{M}$ ), o IM (0.5 y 1  $\mu\text{M}$ ) durante 5 días.** Microfotografías representativas del experimento con esferoides crecidos en ausencia (VEH) o presencia de compuestos (3  $\mu\text{M}$  JKST6 y 0.5  $\mu\text{M}$  IM) a 24, 48 y 72 horas (panel izquierdo) y cuantificación del volumen tumoral calculado como porcentaje del control (panel derecho). La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguido del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  con respecto a células tratadas con VEH.

Además, se analizó la confluencia verde a partir de las microfotografías de fluorescencia para obtener información sobre la citotoxicidad provocada por los compuestos (**Figura 48**).



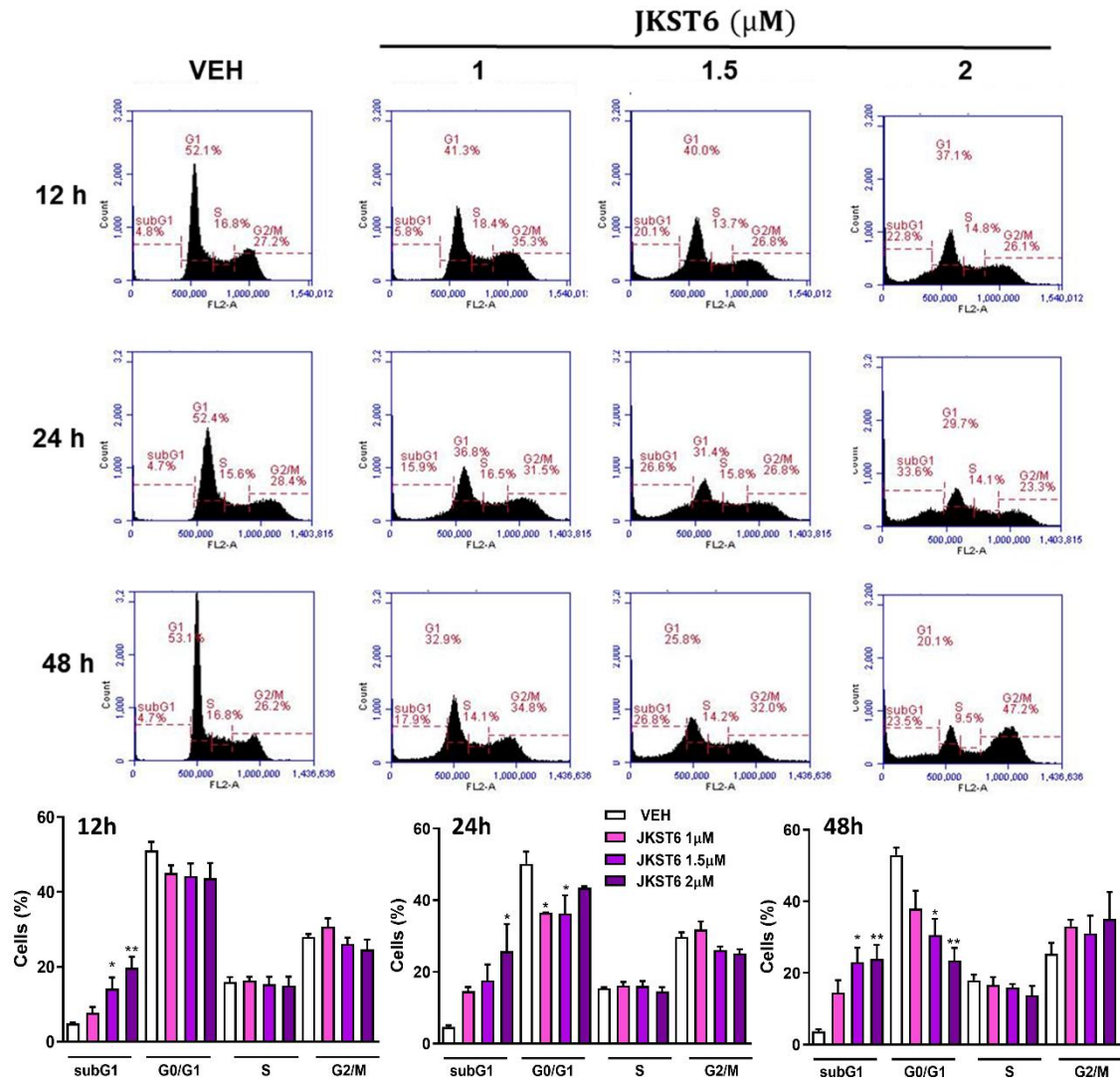
**Figura 48.** Citotoxicidad del cultivo 3D de K562 expuestas a vehículo (VEH), JKST6 (2, 3, y 5  $\mu\text{M}$ ), o IM (0.5 y 1  $\mu\text{M}$ ) durante 5 días. Microfotografías de fluorescencia representativas del experimento con esferoides de células K562 mantenidos en ausencia (vehículo, VEH) o presencia de compuestos (3  $\mu\text{M}$  JKST6 y 0.5  $\mu\text{M}$  IM) durante 24, 48 y 72 horas, y teñidos con el colorante YOYO-1 para visualizar la citotoxicidad tal como se describe en material y métodos.

En concreto, el JKST6 afectó especialmente a las células periféricas del esferoide a tiempos cortos (48 h), mientras que el IM mostró un aumento de citotoxicidad apreciable a las 72 h (**Figura 48**).

## 5. JKST6 inhibe la entrada en el ciclo celular de células de LMC

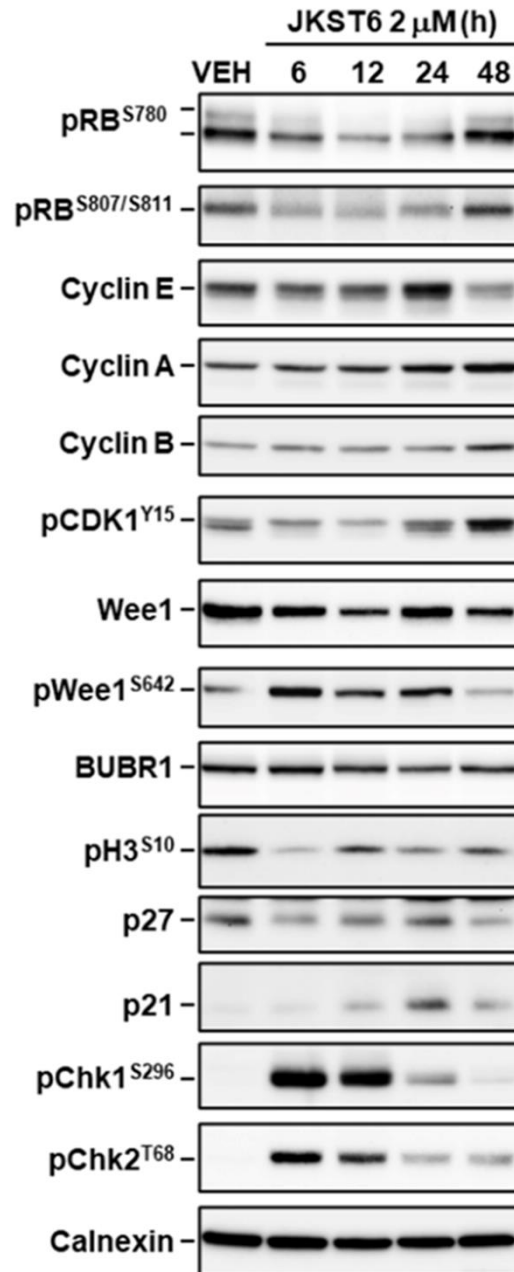
Para elucidar el mecanismo de acción por el cual el JKST6 inhibe el crecimiento de las células K562, se procedió a estudiar los perfiles de ciclo celular por citometría de flujo. Todas las dosis investigadas de JKST6 desencadenaron un incremento en la fase subG1 del ciclo celular, que se vio acompañado de una reducción proporcional en las

fases G0/G1, especialmente después de 24 y 48 horas de exposición al producto (**Figura 49**).



**Figura 49.** Estudio del ciclo celular en células K562 tratadas con vehículo (VEH; 0.05% DMSO) o distintas dosis de JKST6 (1, 1.5 y 2 μM) durante 12, 24 y 48 horas. En el panel superior se muestran imágenes representativas de citometría de flujo donde se clasifican las células según sus perfiles en las fases subG1, G0/G1, S, y G2/M del ciclo celular. En el panel inferior se muestran las gráficas de cuantificación de los porcentajes de células en las distintas subregiones a cada tiempo de tratamiento. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  con respecto a las células tratadas con VEH.

En línea con estos resultados, los ensayos de inmunodetección de proteínas (immunoblot) revelaron cambios en la expresión de proteínas implicadas en la regulación de la progresión del ciclo celular tras el tratamiento con JKST6 (**Figura 50**).



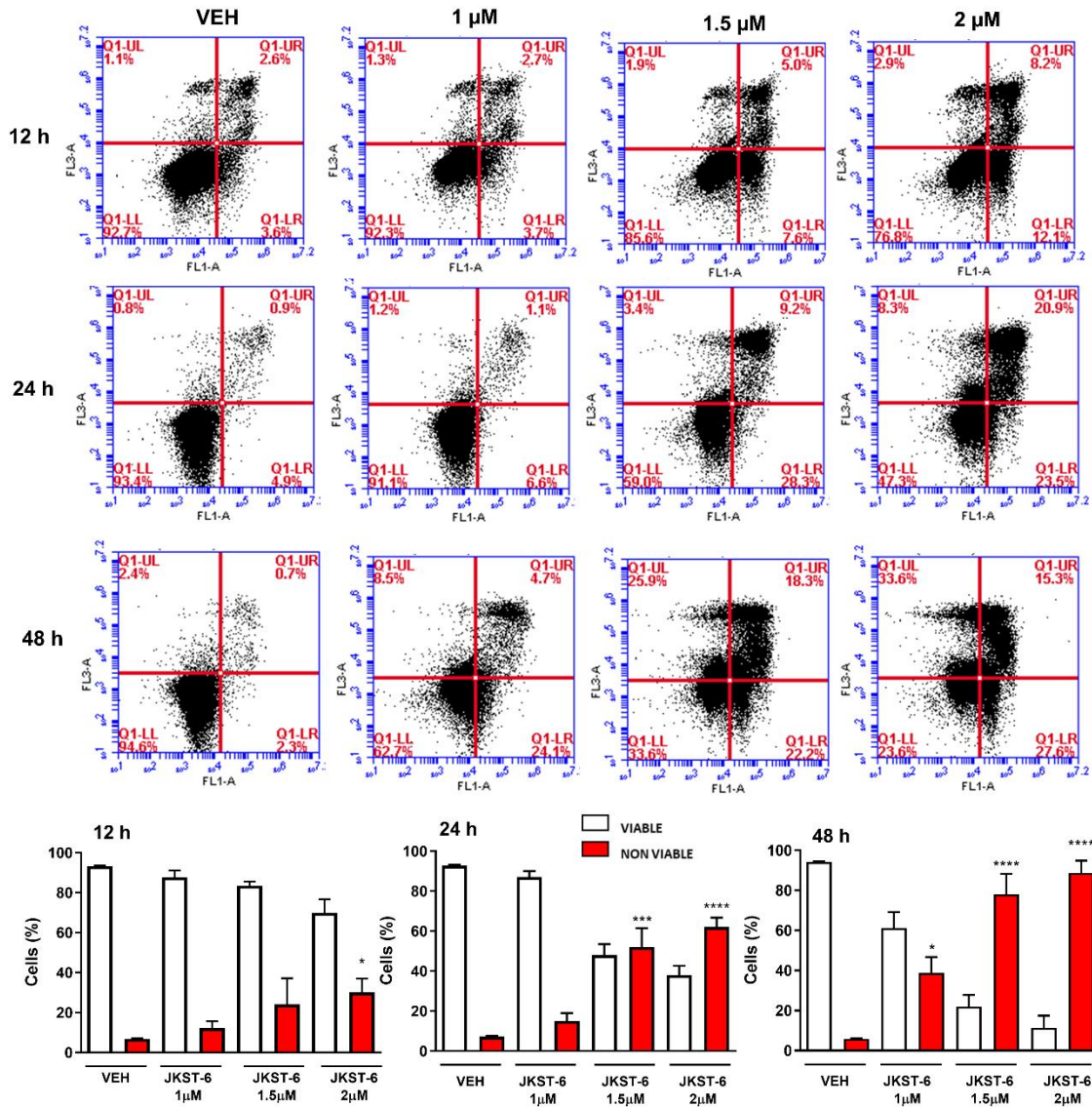
**Figura 50. Análisis de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en K562 tratadas con JKST6.** Se realizaron ensayos de inmunoblot con extractos proteicos totales procedentes de células K562 tratadas con vehículo (VEH; 0.05% DMSO) o JKST6 (2  $\mu$ M) durante 6, 12, 24 y 48 horas. La proteína calnexina fue utilizada como control de carga en estos ensayos.

Estos resultados muestran que el compuesto reduce marcadamente la fosforilación de la proteína RB tras 6 horas de tratamiento, lo cual provoca que esta proteína pase a su estado activo y que pueda unirse al factor de transcripción E2F, inhibiéndolo, y evitando así la progresión del ciclo celular (212). Además, el JKST6 incrementó los niveles de la ciclina E, asociada con la transición entre las fases G1-S (213), a las 24 horas de tratamiento para posteriormente, reducirlos a las 48 horas.

Otras proteínas con funciones clave en las fases S y M (213) también resultaron alteradas por el tratamiento con JKST6. Por ejemplo, se observó un incremento de las ciclinas A y B tras 48 horas de tratamiento. Por otro lado, el JKST6 produjo una inducción rápida de la fosforilación de Wee1, una proteína específica que controla negativamente la entrada a la mitosis (214). Además, el producto redujo (de 6 a 48 horas) de manera evidente la fosforilación de la histona H3, la cual está relacionada con la entrada en la fase de mitosis del ciclo celular (215). Finalmente, cabe destacar que el compuesto indujo la fosforilación de otros reguladores negativos de la progresión del ciclo, como por ejemplo Chk1, Chk2 y p21 (216) (**Figura 50**).

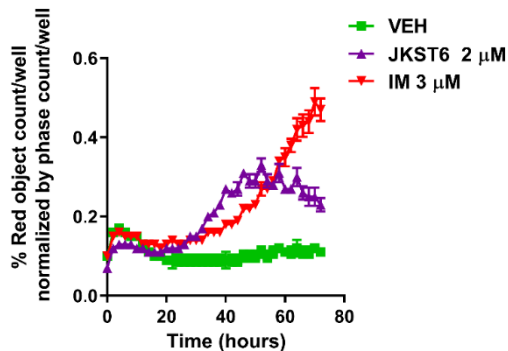
## **6. JKST6 induce apoptosis en células de LMC**

Los resultados previos muestran que el tratamiento con JKST6 en células K562 provoca una reducción en la viabilidad celular y un incremento en la fase subG1, la cual está representada fundamentalmente por células hipodiploides o muertas. Así, con el fin de identificar el mecanismo de muerte celular inducido por el producto, se estudió el proceso de muerte celular programada o apoptosis mediante la determinación de Anexina V, usando las mismas condiciones experimentales utilizadas en los ensayos de ciclo celular (**Figura 51**). Estos ensayos demostraron que el tratamiento con JKST6 provoca un incremento significativo en células Anexina V positivas de manera dependiente de la dosis y del tiempo.



**Figura 51. Estudio del proceso de muerte celular programada o apoptosis en células K562 tratadas con vehículo (VEH; 0.05% DMSO) o JKST6 (1, 1.5 y 2  $\mu$ M) durante 12 y 24 horas usando un kit de detección de Anexina V- FITC y de yoduro de propidio (PI). Panel superior: imágenes representativas de citometría de flujo (FACS) que miden la translocación de la fosfatidilserina a la superficie de la célula y el estado de la membrana celular. Panel inferior: cuantificación del porcentaje de células viables y no viables a cada tiempo experimental. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con VEH.**

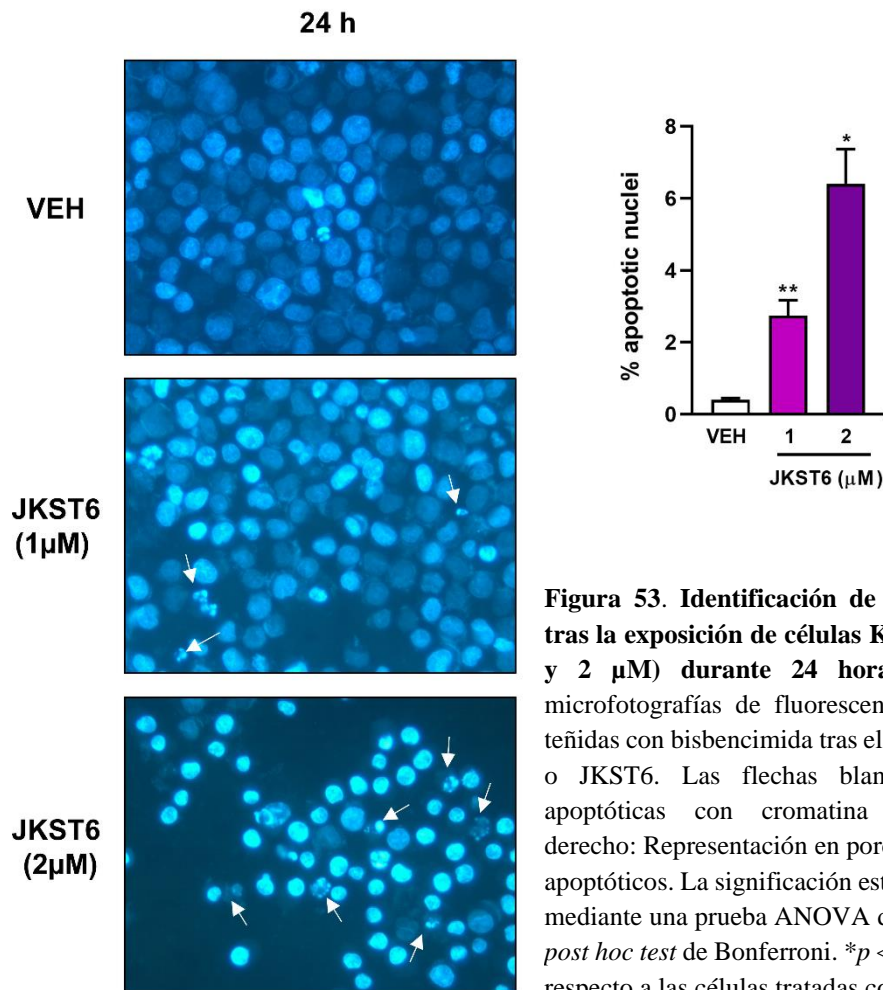
En otra serie de experimentos llevados a cabo en el Incucyte, se midió la apoptosis a tiempo real mediante la unión de Anexina V a fosfatidil serina (PS) (medición de la externalización de la PS a la superficie extracelular). Como se observa en la **Figura 52**, los resultados se expresaron en forma de índice de apoptosis que tienen en cuenta los eventos detectados de Anexina V positivos respecto al total de eventos detectados (ocupación del pocillo).



**Figura 52. Medición de apoptosis a tiempo real con el sistema Incucyte Zoom en células K562 en ausencia (vehículo; VEH) o presencia de JKST6 (2  $\mu$ M) e IM (3  $\mu$ M) durante tres días.** La Anexina V que se ha unido a la fosfatidilserina se cuantifica como objetos fluorescentes rojos (*red object count*) y, este parámetro, se divide por el total de objetos detectados en el pocillo.

Analizar este indicador de activación de apoptosis a tiempo real permitió distinguir la cinética de activación de la Anexina V, que tiene un pico a las 40-48 horas para el tratamiento con el JKST6, mientras que para el tratamiento con IM el punto máximo se alcanza a las 72 horas postratamiento. Estos resultados respaldan las diferencias en la velocidad de actuación de ambos compuestos, detectadas en ensayos previos.

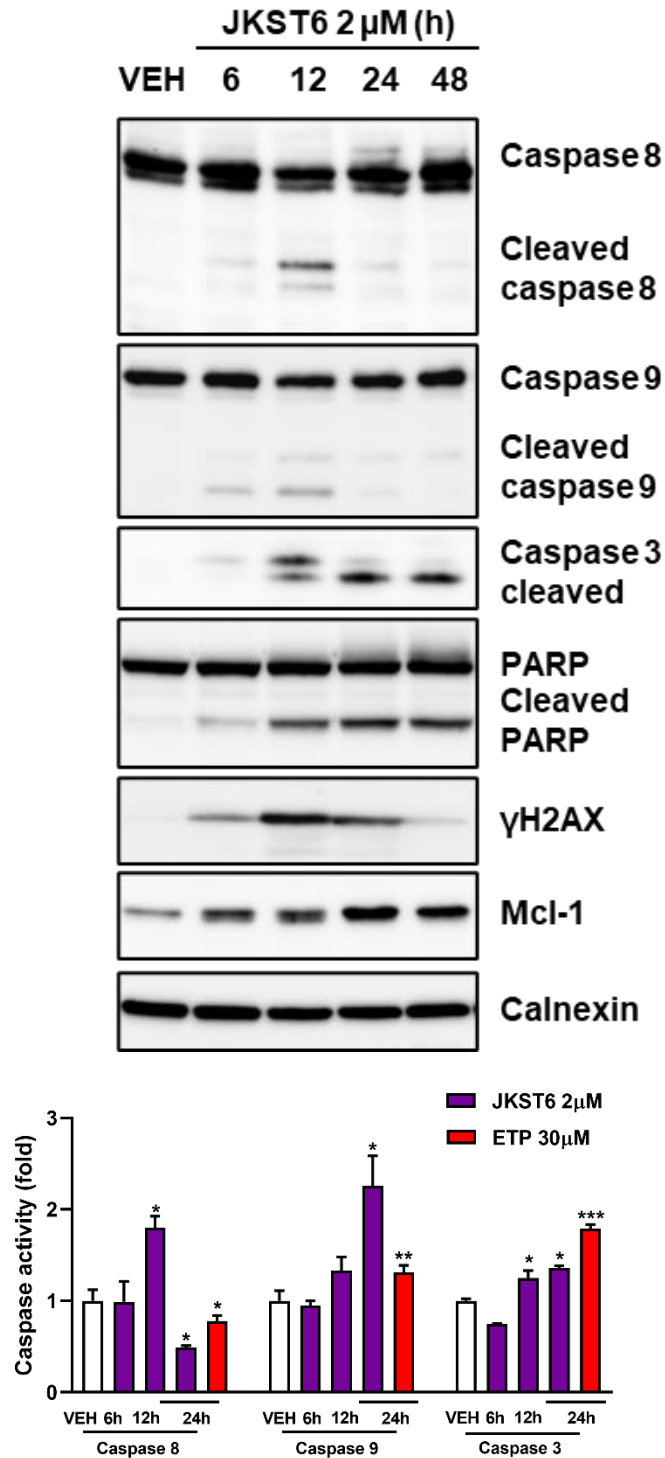
De forma adicional, se detectó un aumento significativo de núcleos apoptóticos 24 horas después del tratamiento con JKST6 (1 y 2  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 53**).



**Figura 53. Identificación de núcleos apoptóticos tras la exposición de células K562 a JKST6 (1  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas.** Panel izquierdo: microfotografías de fluorescencia de células K562 teñidas con bisbenzimida tras el tratamiento con VEH o JKST6. Las flechas blancas marcan células apoptóticas con cromatina condensada. Panel derecho: Representación en porcentaje de los núcleos apoptóticos. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  con respecto a las células tratadas con VEH.

La activación de la apoptosis puede ser dependiente de la actividad de distintas caspasas. Por esta razón, se estudió el corte y la actividad de las diversas pro-caspasas iniciadoras y efectoras, así como de *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP). Como se observa en las imágenes de inmunoblot de la **Figura 54**, el tratamiento con JKST6 desencadenó el corte y la activación de las pro-caspasas 8 y 9 tras 12 horas de tratamiento, mientras que el corte de la pro-caspasa 3 y de PARP se detectó desde las 12 hasta las 48 horas de exposición al compuesto. Además, se observó la fosforilación de H2AX, un marcador de daño en la doble cadena de ADN, 6 horas después del tratamiento, lo cual, junto con la activación de Chk1 y Chk2, indican la presencia de daño en el material genético celular. Por último, Mcl-1, una proteína de antiapoptótica de la familia de Bcl2, fue inducida rápidamente tras el tratamiento con JKST6 (**Figura 54**).



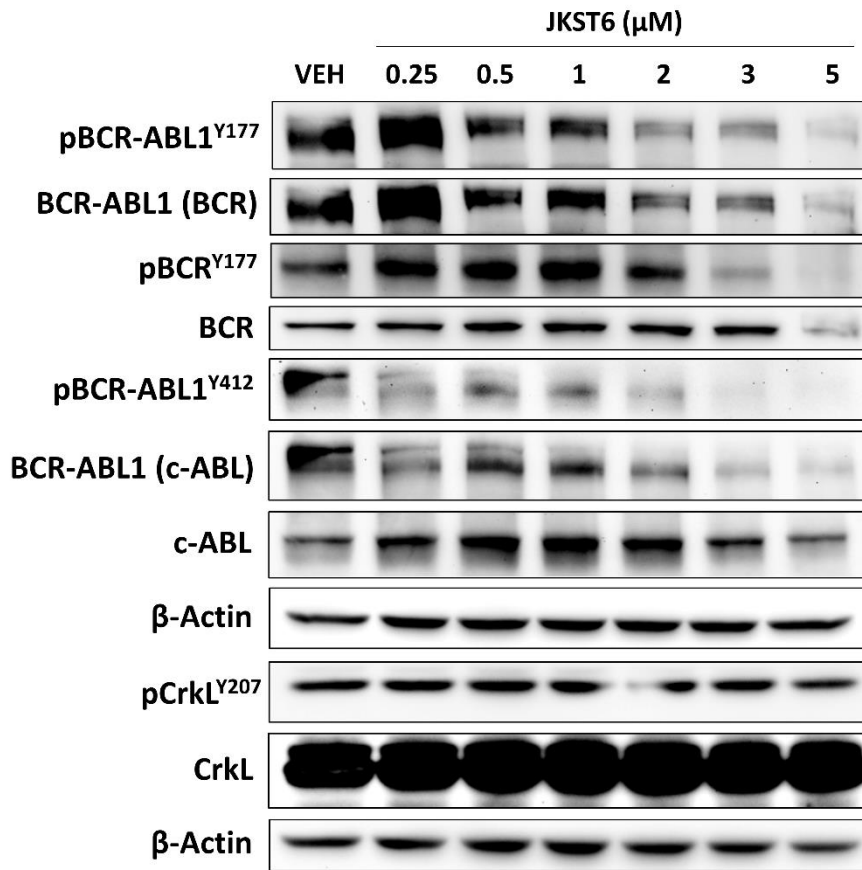


**Figura 54. Inmunodetección de proteínas implicadas en la apoptosis realizados con extractos proteicos totales y determinación de la actividad de las caspasas 8, 9 y 3 en células K562 expuestas a vehículo (VEH) o JKST6 (2  $\mu$ M) durante 6, 12, 24 y 48 horas.** La proteína calnexina fue utilizada como control de carga. Panel superior: imágenes representativas de dos experimentos independientes de inmunoblot. Panel inferior: cuantificación de la actividad de las caspasas -8, -9 y -3 realizada en células K562 expuestas a VEH, JKST6 (2  $\mu$ M) o etopósido (ETP) (30  $\mu$ M) durante 6, 12 y 24 horas. Los resultados se representan como incremento en *fold* de la actividad caspasa respecto a las células tratadas con el VEH. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc* test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , con respecto a las células tratadas con VEH.

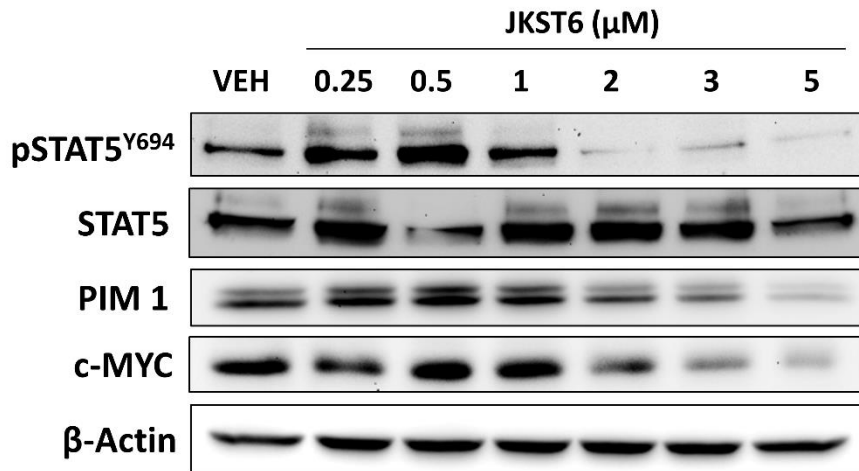
## 7. JKST6 inhibe la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 en células de LMC

Como se ha descrito anteriormente, las células de LMC poseen como característica fisiopatológica la presencia de una oncoquinasa (BCR-ABL1) que está constitutivamente activa, desencadenando señales *downstream* que promueven el crecimiento celular descontrolado a través de la actividad transcripcional de STAT5 (59). Por esta razón, es de vital interés que un fármaco de uso potencial en la terapéutica de la LMC inhiba eficazmente esta vía de señalización.

En primer lugar, se realizaron estudios de dosis respuesta con el producto JKST6 para determinar la concentración óptima capaz de modular eficazmente la expresión de la oncoquinasa y sus principales dianas (**Figura 55A-B**).



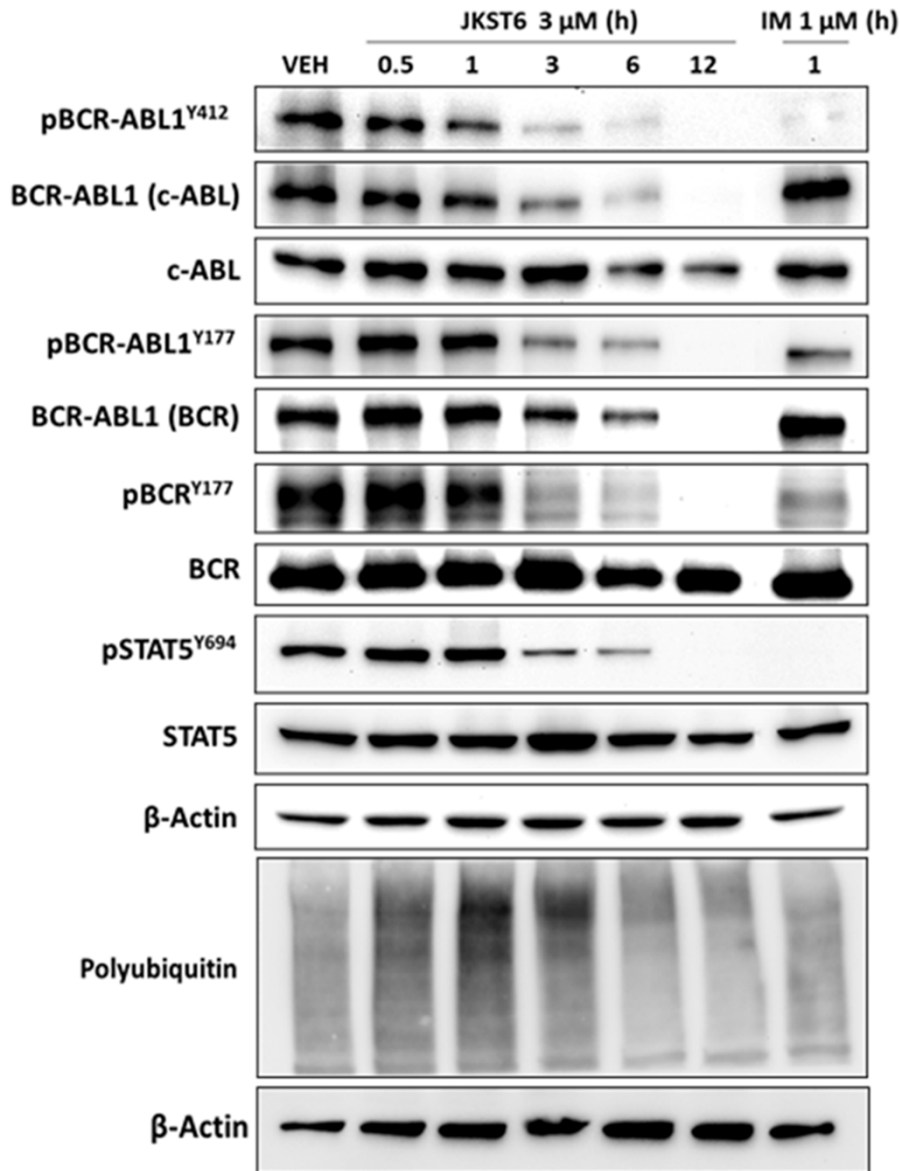
**Figura 55-A.** Ensayo dosis respuesta del JKST6 sobre proteínas de la ruta BCR-ABL1/STAT5 en células K562. Las células se incubaron con vehículo (VEH; 0.05% DMSO) o JKST6 (0,25, 0,5, 1, 2, 3, y 5 $\mu\text{M}$ ) durante 3 horas. A continuación, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron utilizados para realizar los ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos. La proteína  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga.



**Figura 55-B. Ensayo dosis respuesta del JKST6 sobre proteínas de la ruta BCR-ABL1/STAT5 en células K562.** Las células se incubaron con vehículo (VEH; 0,05% DMSO) o JKST6 (0,25, 0,5, 1, 2, 3, y 5 μM) durante 3 horas. A continuación, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron utilizados para realizar los ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos. La proteína β-actina fue utilizada como control de carga.

Los resultados mostraron que, a 3 horas de tratamiento, tiempo en que ya se observa una actividad antiproliferativa del producto en estas células, las dosis de JKST6 utilizadas (1-5 μM) provocan una inhibición significativa *upstream* (pY412/pY177 BCR-ABL1) de la vía, que desencadena cambios en proteínas diana de BCR-ABL1 como por ejemplo STAT5, y, a su vez, en otras cuya activación depende de esta última, como c-MYC y PIM1. Curiosamente, no se observó una alteración apreciable de la fosforilación de CrkL en estas condiciones (**Figura 55 A-B**).

A partir de estos resultados, se decidió seleccionar la dosis de 3 μM de JKST6 para estudiar en profundidad el mecanismo molecular del compuesto en las células de LMC. Para ello, se realizaron experimentos de dosis tiempo (**Figura 56**) que demostraron que el compuesto JKST6 (3 μM) inhibe eficazmente la activación constitutiva de BCR-ABL1 (Y412 y Y177) y de STAT5 (Y694) desde las 3 horas de tratamiento.



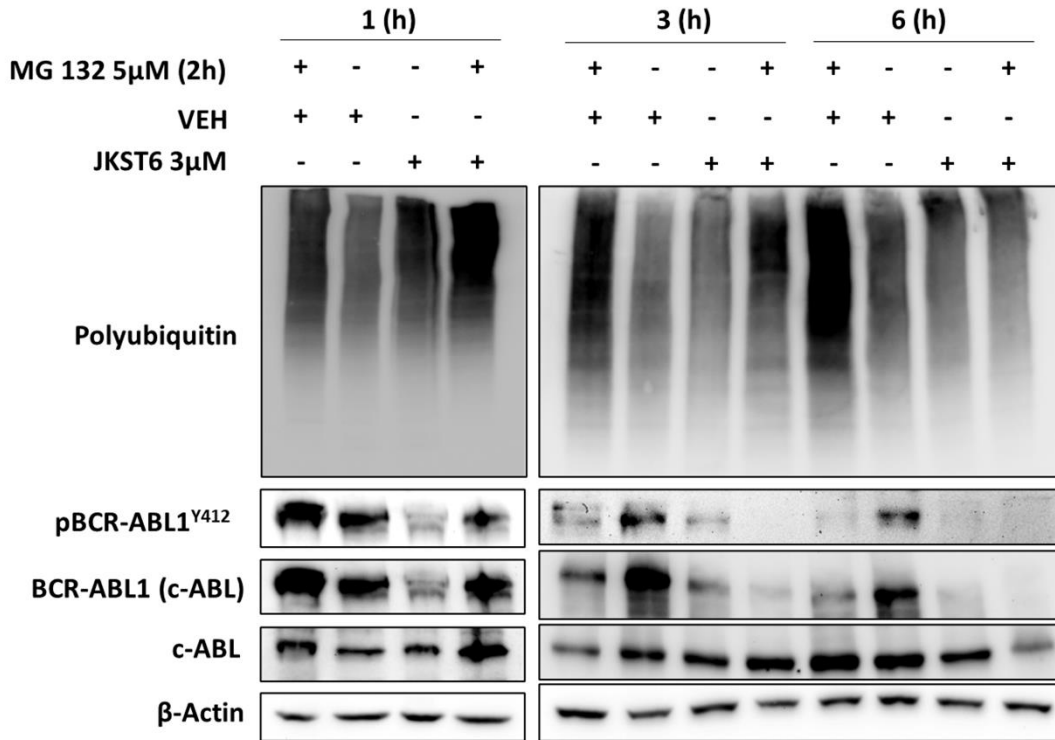
**Figura 56. Ensayo dosis tiempo del JKST6 sobre proteínas de la ruta BCR-ABL1/STAT5 en células K562.** Detección por inmunoblot de las formas fosforiladas y totales de BCR-ABL1 (pY<sup>412</sup>)/(pY<sup>177</sup>), BCR, c-ABL y STAT5 (pY<sup>694</sup>) (panel superior) o poli-ubiquitina (panel inferior) a partir de extractos proteicos totales procedentes de células K562 incubadas con vehículo (VEH; 0,05% DMSO) o JKST6 (3 μM) durante 0,5, 1, 3, 6 y 12 horas. La proteína β-actina fue utilizada como control de carga.

Cabe destacar que la disminución de los niveles de fosforilación de BCR-ABL1 ocurre simultáneamente a la reducción de la proteína quimérica total medida en los dominios ABL y BCR, mientras que las proteínas *wild type* BCR y c-ABL no se ven alteradas por el tratamiento con JKST6 (**Figura 56, panel superior**). Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de proteína fosforilada detectada es consecuencia de la reducción concomitante de sus niveles proteicos totales.

Por otro lado, la inhibición de la fosforilación de STAT5 inducida por el compuesto no afecta a sus niveles de proteína total. De esta forma, para explorar el

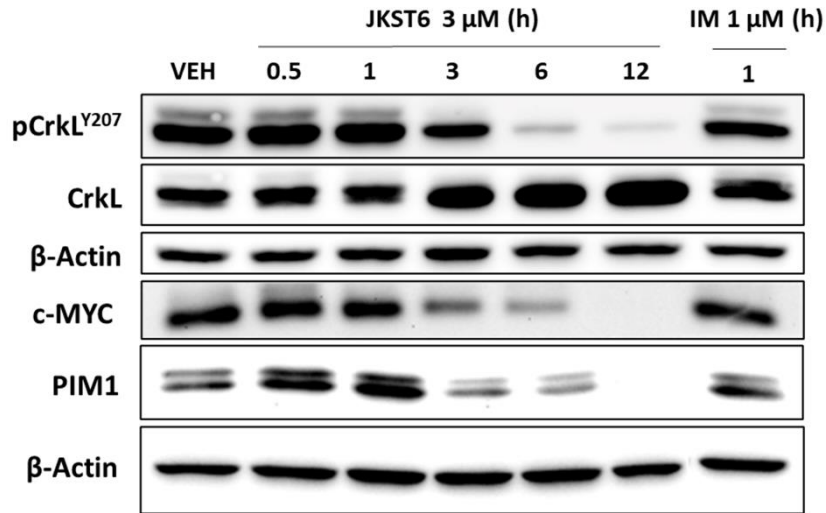
mecanismo por medio del cual el producto reduce los niveles de BCR-ABL1, se procedió a estudiar los niveles de proteínas poliubiquitinadas mediante ensayos de inmunoblot (**Figura 56, panel inferior**). Los resultados mostraron un incremento evidente de la cantidad de estas proteínas tras tiempos cortos de tratamiento (0,5, 1 y 3 horas), en comparación con los niveles detectados en las células K562 tratadas con el vehículo. Cabe remarcar que el incremento de proteínas poliubiquitinadas antecedió a la desaparición de la proteína BCR-ABL1 total.

Con el objetivo de determinar la potencial implicación del proteasoma en el efecto postraduccional provocado por el JKST6, se utilizó el inhibidor MG132, un péptido aldehído que bloquea, de manera potente y selectiva, la actividad proteolítica del proteasoma (217). En estos experimentos, las células K562 se incubaron durante 2 horas con MG132 antes de la adición del tratamiento con JKST6, el cual se extendió durante 1, 3 o 6 horas. Además, se investigaron los efectos de ambos compuestos por separado (**Figura 57**). Los resultados del tratamiento utilizando sólo JKST6 vuelven a mostrar un pico de ubiquitinación tras 1 hora de tratamiento, como se había observado anteriormente. El péptido aldehído MG132 aumenta la cantidad de proteínas poliubiquitinadas a todos los tiempos de tratamiento con respecto a las células tratadas con el vehículo. Finalmente, la pre-incubación con MG132 seguida de la adición del JKST6 impide parcialmente la reducción de los niveles proteicos de BCR-ABL1 tras 1 hora de exposición al producto, pero, sin embargo, los potencia tras 3 y 6 horas de exposición al compuesto (**Figura 57**).



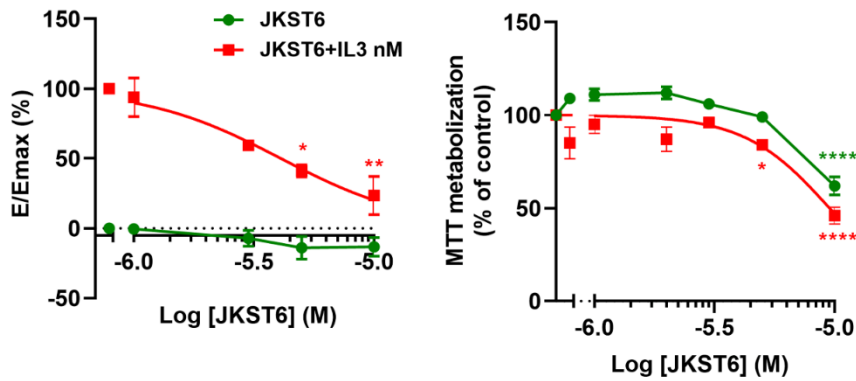
**Figura 57.** Ensayo dosis tiempo del JKST6 tras la inhibición del proteasoma sobre los niveles proteicos de BCR-ABL1 en células K562. Detección por inmunoblot de las formas fosforiladas (pY<sup>412</sup>) y totales de BCR-ABL1, c-ABL, y de proteínas poliubiquitinadas realizada en extractos proteicos totales obtenidos a partir de células K562 expuestas durante 2 horas al vehículo (VEH) o al inhibidor del proteasoma MG132, seguido del tratamiento con VEH o JKST6 (3  $\mu$ M) durante los tiempos que se indican en la figura.

A continuación, se estudiaron los efectos del compuesto sobre otros componentes clave en la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5. En concreto, se analizaron los cambios en la fosforilación (Y<sup>207</sup>) de la proteína CrkL, sustrato principal de la quinasa BCR-ABL1 (218), y las proteínas c-MYC y PIM1, cuya expresión depende de STAT5 (59). Como se muestra en la **Figura 58**, el producto JKST6 redujo los niveles de todas estas proteínas, lo que indica que el bloqueo de la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 tiene un efecto persistente *downstream*.



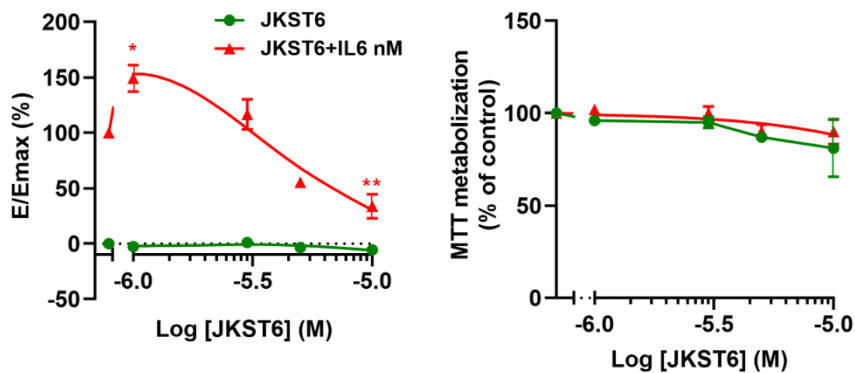
**Figura 58.** Ensayo dosis tiempo del JKST6 sobre proteínas relevantes *downstream* de la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 en células K562. Análisis por inmunoblot de pY<sup>207</sup>-CrkL, CrkL, PIM1, c-MYC realizados en extractos proteicos totales procedentes de cultivos de células K562 tratadas con vehículo (VEH), JKST6 o IM durante los tiempos indicados en la figura. La proteína β-actina fue usada como control de carga.

Una vez confirmada la capacidad del JKST6 para modular los niveles proteicos de componentes clave de la vía BCR-ABL1/STAT5, se investigó su potencial para modular la actividad transcripcional dependiente de STAT. Para ello, se utilizaron modelos celulares transfectados con el *reporter gene* de luciferasa. En concreto, en la línea BaF3 que expresa luciferasa bajo un promotor de respuesta a STAT5 cuando es estimulada por mIL-3, el JKST6 inhibió significativamente la señal luciferasa ( $IC_{50} = 4,26 \pm 0,05 \mu M$ ) sin alterar considerablemente la viabilidad celular ( $IC_{50} = 9,58 \pm 0,58 \mu M$ ) (**Figura 59**).



**Figura 59. Efecto del JKST6 sobre la actividad transcripcional de STAT5.** Panel izquierdo: actividad transcripcional de STAT5 determinada en células BaF3, transfectadas establemente con el *reporter gene* de luciferasa. Las células fueron expuestas a vehículo (VEH; 0,05% DMSO) o a dosis crecientes de JKST6 (0,3–10  $\mu$ M) durante 4 horas, seguido de la inducción de la actividad transcripcional de STAT5 con interleucina 3 murina (mIL3, 30 ng/ml) durante 16 horas (rojo). Las células no estimuladas representan el nivel basal de señal (verde). Panel derecho: viabilidad celular medida por MTT en la línea BaF3 analizada a las mismas dosis y tiempos que en el ensayo de luciferasa. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con VEH y mIL3.

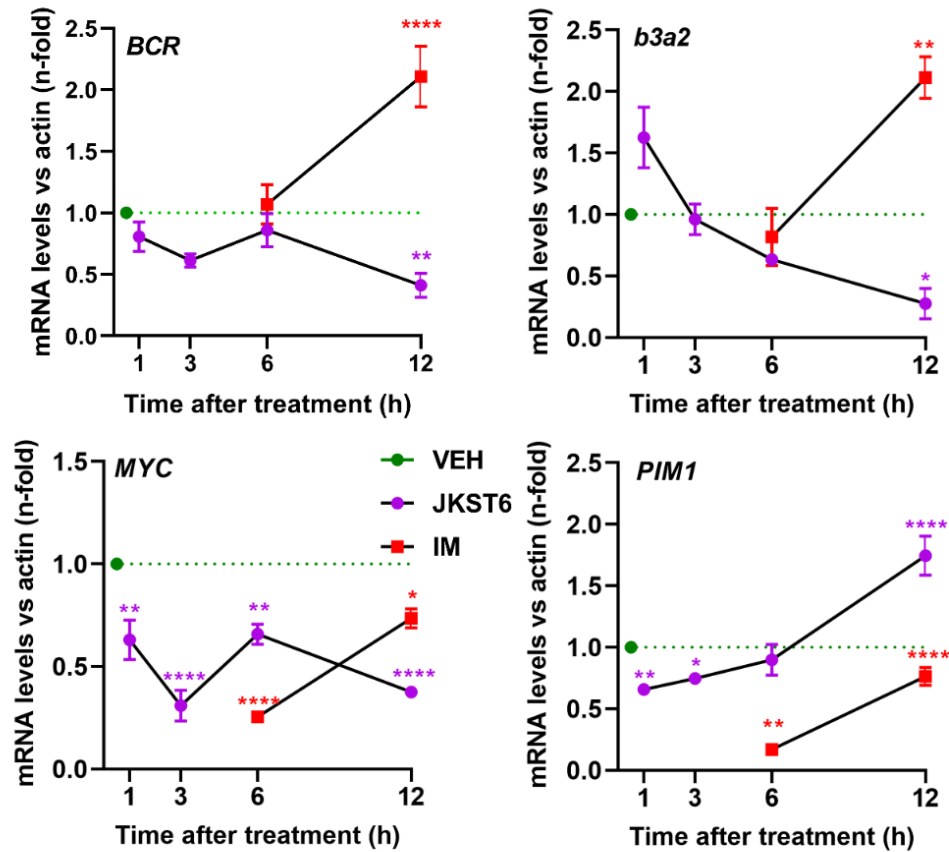
Además, el tratamiento con JKST6 también redujo, aunque de manera menos potente ( $IC_{50} = 7,18 \pm 1,48 \mu M$ ), la actividad transcripcional mediada por STAT3 en la línea HEK293 transfectada establemente con el *reporter gene* de luciferasa dependiente de la estimulación con hIL-6, sin causar una inhibición apreciable de su viabilidad ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) (Figura 60).



**Figura 60. Efecto del JKST6 sobre la actividad transcripcional de STAT3.** Panel izquierdo: actividad transcripcional de STAT3 determinada en la línea celular HEK293, transfectada establemente con el *reporter gene* de luciferasa. Las células fueron expuestas a vehículo (VEH; 0,05% DMSO) o a dosis crecientes de JKST6 (0,3–10  $\mu$ M) durante 4 horas, seguido de la inducción de la actividad transcripcional de STAT3 con interleucina humana-6 (hIL6, 10 ng/ml) durante 16 horas (rojo). Las células no estimuladas representan el nivel basal de señal (verde). Panel derecho: viabilidad celular medida por MTT de la línea HEK293 analizada a las mismas dosis y tiempos que en el ensayo de luciferasa. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  con respecto a las células tratadas con VEH y hIL6.



Para investigar si el JKST6 provocaba también una modulación de la expresión génica de BCR-ABL1 que explicase la reducción de sus niveles proteicos, se utilizaron dos pares de cebadores (*primers*) distintos que amplifican específicamente, el primero en los exones 12 y 13 de *BCR*, y el segundo en la zona de unión (*b3a2*) del gen fusionado. Además, se estudiaron dos genes diana de STAT5, como son *MYC* y *PIM1* (**Figura 61**).



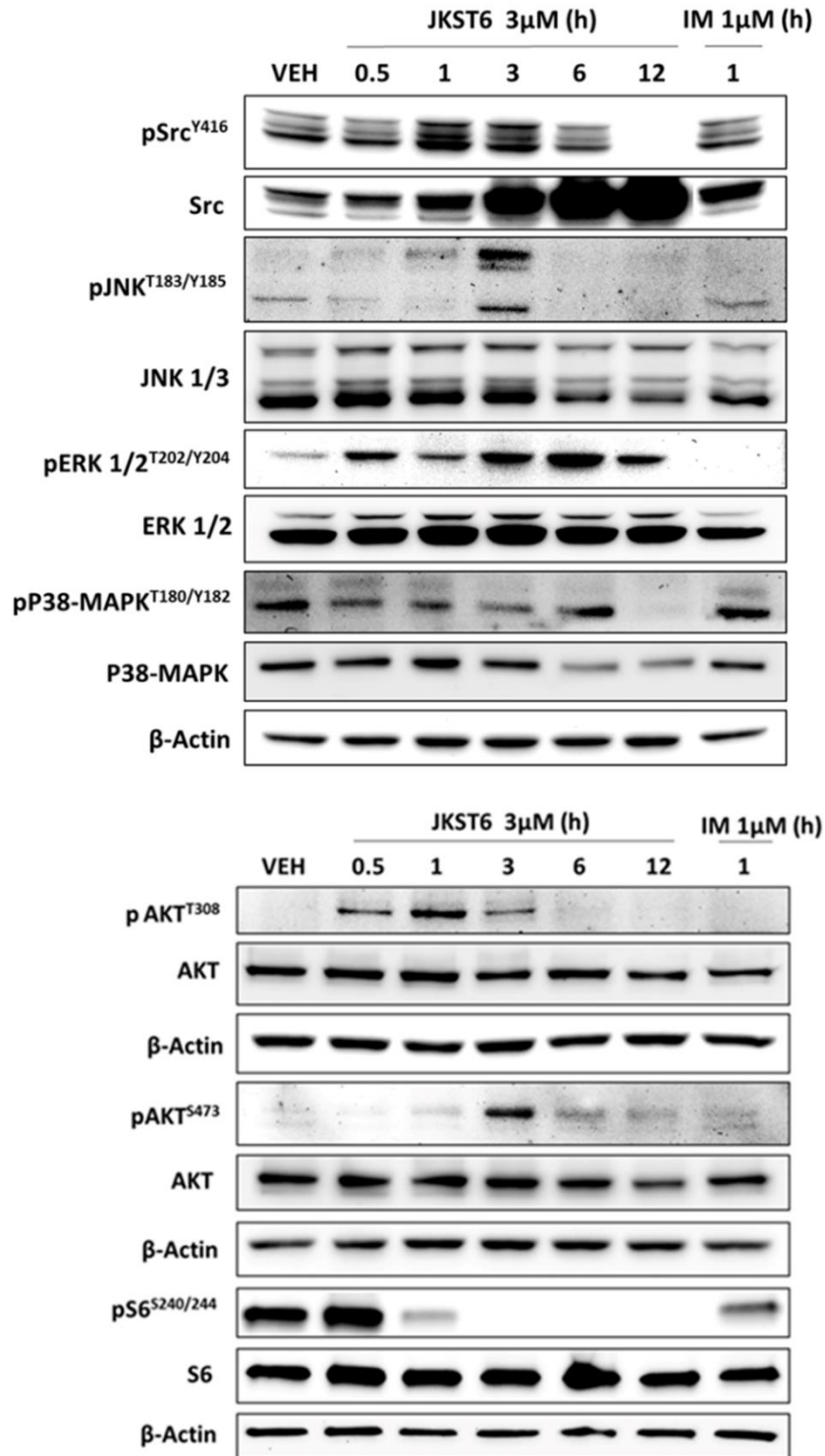
**Figura 61. Efecto del JKST6 sobre la expresión génica de oncogenes relevantes en la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5.** Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) de *BCR*, *b3a2*, *PIM1*, *c-MYC* realizado en células K562 tratadas con vehículo (VEH; 0,05% DMSO), JKST6 (3  $\mu$ M) o IM (1  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. Se utilizó el gen *GAPDH* como *housekeeping* para la normalización. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con el VEH.

Estos ensayos demostraron que el JKST6 altera la expresión génica de BCR-ABL1 con un patrón temporal de inhibición diferente del observado en los ensayos de inmunoblot, destacando la reducción anticipada de los niveles proteicos de BCR-ABL1 (3 horas post tratamiento) frente a la reducción de los niveles de ARNm de *BCR* y *b3a2* (12 horas post tratamiento). Por otro lado, el tratamiento con JKST6 reduce de forma sostenida los niveles de ARNm de *MYC*, mientras que los niveles de *PIMI* se vieron reducidos a tiempos cortos y potenciados tras 12 horas de tratamiento.

### **8. JKST6 modula distintas vías de señalización implicadas en la supervivencia de células de LMC.**

Las células de LMC poseen vías alternativas de supervivencia que, en muchos casos, son moduladas también por BCR-ABL1 (53,79). Estas vías de señalización alternativas representan dianas terapéuticas interesantes, pues contribuyen a la evasión de la muerte celular y tienen un papel importante en la recidiva de la enfermedad (79).

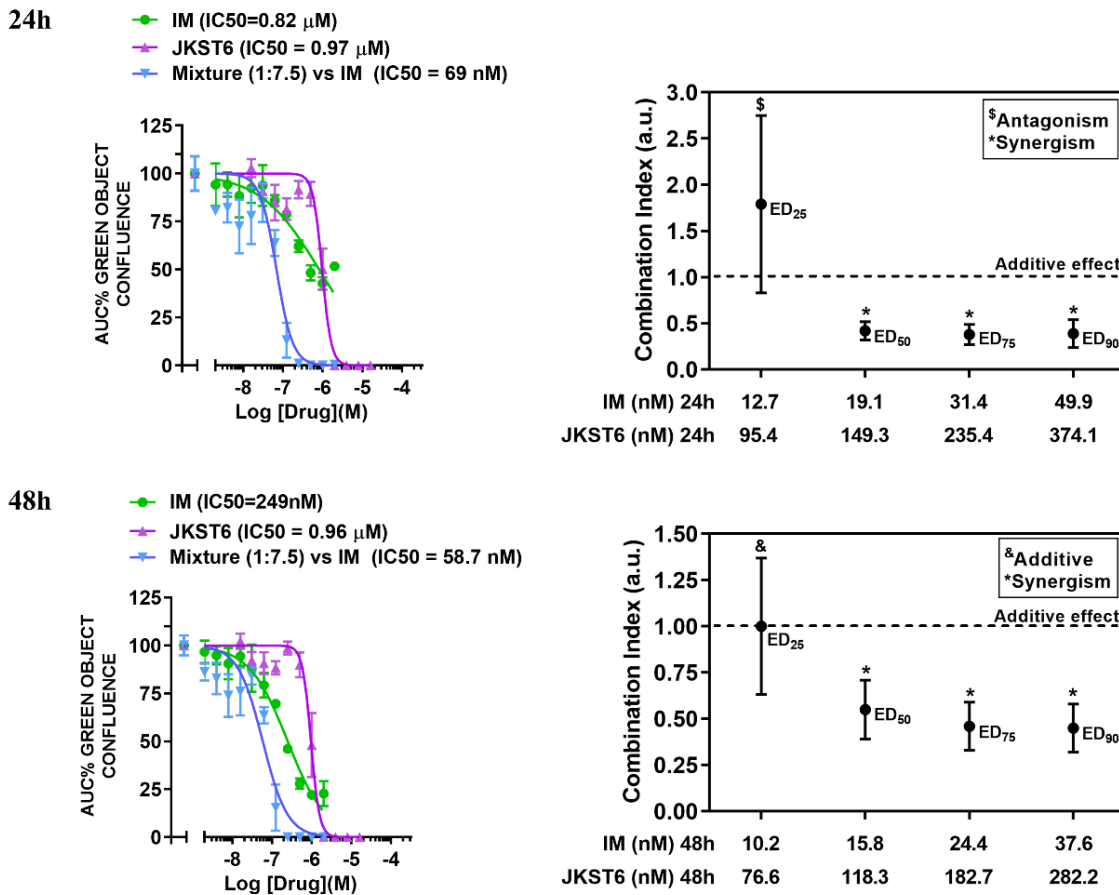
Teniendo esto en cuenta, se estudió el efecto modulador del JKST6 en los componentes de estas vías de señalización. Tal como se observa en la **Figura 62**, el producto JKST6 inhibe S6 tras 1 hora de tratamiento y la fosforilación de Src y P38-MAPK tras 12 horas de exposición en células K562. Además, el compuesto induce un aumento transitorio de la fosforilación de AKT y de JNK con respecto a células K562 no tratadas. En cambio, JKST6 produce una estimulación estable de la fosforilación de ERK1/2 desde 30 minutos hasta 12 horas postratamiento (**Figura 62**).



**Figura 62. Efecto del JKST6 sobre vías de supervivencia alternativas alteradas en LMC.** Análisis de la expresión proteica analizada mediante ensayos de inmunoblot realizados sobre extractos proteicos totales obtenidos a partir de células K562 tratadas con vehículo (VEH; 0,05% DMSO), JKST6 (3 μM) o IM (1 μM) durante los tiempos indicados. Panel superior: imágenes representativas de inmunoblot para p<sup>Y416</sup>-Src, Src, p<sup>T183/Y185</sup>-JNK, JNK1/3, p<sup>T202/Y204</sup>-ERK1/2, ERK1/2, p<sup>T180/Y182</sup>-p38-MAPK y p38-MAPK. Panel inferior: imágenes representativas de inmunoblot para p<sup>T308</sup>-AKT, AKT, p<sup>S473</sup>-AKT, AKT, p<sup>S240/244</sup>-S6 y S6. La proteína β-actina fue utilizada como control de carga.

## 9. JKST6 potencia los efectos anti-proliferativos y la actividad inhibitoria de STAT5 inducida por el IM

La combinación de fármacos permite el uso de concentraciones más bajas, lo cual dificulta el desarrollo de resistencias y promueve la inhibición de dianas terapéuticas de forma más efectiva (205). De esta forma, se investigó si el producto JKST6 es capaz de actuar sinérgicamente con el IM, potenciando los efectos antiproliferativos de este último, mediante la realización de ensayos de combinación de JKST6 e IM. Para estos estudios se utilizaron células sensibles a IM que expresan GFP (K562-GFP+), y que se trataron con distintas dosis de JKST6 y de IM siguiendo un ratio de combinación constante [7.5(JKST6):1(IM)] durante 24 o 48 horas (**Figura 63**).



**Figura 63.** Ensayos de sinergia entre JKST6 e IM sobre la proliferación de células de LMC. Imagen representativa de la proliferación celular medida en células K562-GFP+ expuestas a concentraciones combinadas de JKST6 e IM (Mixture). Los datos se presentan como porcentaje de confluencia verde por concentración de IM a 24 horas (panel superior izquierdo) y 48 horas (panel inferior izquierdo). La proliferación de las células K562-GFP+ tratadas con JKST6 (8 dosis; 0 a 5 μM), IM (8 dosis; 0 a 1 μM) o con la combinación de ambos siguiendo un ratio constante (7.5 (JKST6):1 (IM)) durante 24 o 48 horas se analizaron por medio del isoblograma (determinación del índice de combinación, CI: combination index). El efecto, que varió entre 0 (no existe inhibición de la proliferación) a 1 (100% de inhibición de la proliferación celular), se analizó usando el programa informático Calcsyn®.

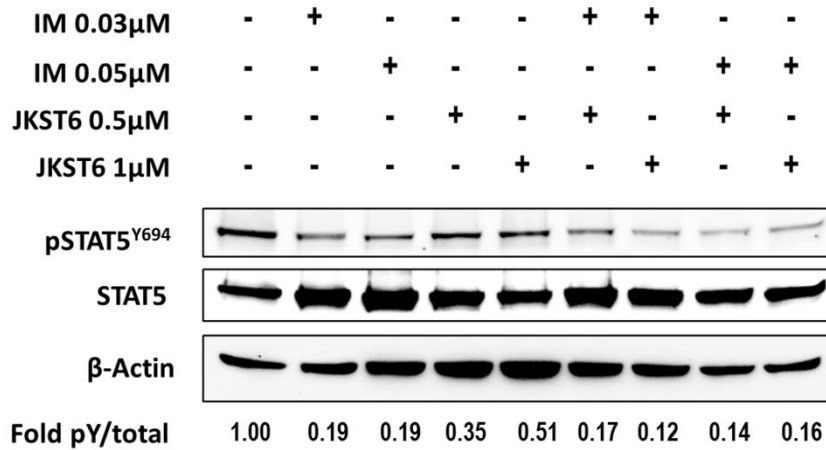
Tal como se muestra en la **Figura 63**, estos ensayos demostraron que el JKST6 potencia la inhibición de la viabilidad celular producida por el IM a los tiempos examinados. Además, los datos de los estudios de proliferación celular fueron analizados mediante el cálculo del índice de combinación o *combination Index* (CI), el cual permite saber si la combinación se comporta de manera sinérgica, aditiva o antagónica, utilizando para ello el estudio del isoblograma mediante el método de Chou-Talalay (205). De esta forma, se demostró que IM y JKST6 actúan sinérgicamente induciendo efectos antiproliferativos a las 24 y 48 horas de tratamiento tal como se muestra en la **Tabla 28**.

**Tabla 28. Representación de índices de combinación medios (CI)**

| Efecto a 24 horas | CI (media $\pm$ SEM) | Resultado  |
|-------------------|----------------------|------------|
| ED50              | 0,42 $\pm$ 0,10      | Sinergismo |
| ED75              | 0,38 $\pm$ 0,11      | Sinergismo |
| Efecto a 48 horas | CI (media $\pm$ SEM) | Resultado  |
| ED50              | 0,55 $\pm$ 0,16      | Sinergismo |
| ED75              | 0,46 $\pm$ 0,13      | Sinergismo |

Representación de la media de índices de combinación (CI)  $\pm$  error estándar de la media (SEM) obtenidos a partir de 4 experimentos independientes a 24h y 48 h en los que se investigó la proliferación a tiempo real de células K562 GFP+ expuestas a JKST6 (8 dosis; 0 a 5  $\mu$ M), IM (8 dosis; de 0 a 1  $\mu$ M) o a la combinación de ambos, siguiendo el ratio constante 7.5 (JKST6):1 (IM). Los valores de índices de combinación o combination index (CI) representan según su valor (menor que 1; igual que 1 o mayor que 1) sinergismo, adición o antagonismo, respectivamente. ED50: dosis eficaz 50. ED75: dosis eficaz 75.

Por otro lado, también se observó que la combinación JKST6-IM induce efectos sinérgicos en lo que se refiere a la inhibición de la fosforilación en tirosina de STAT5 (p<sup>Y694</sup>) (**Figura 64**).



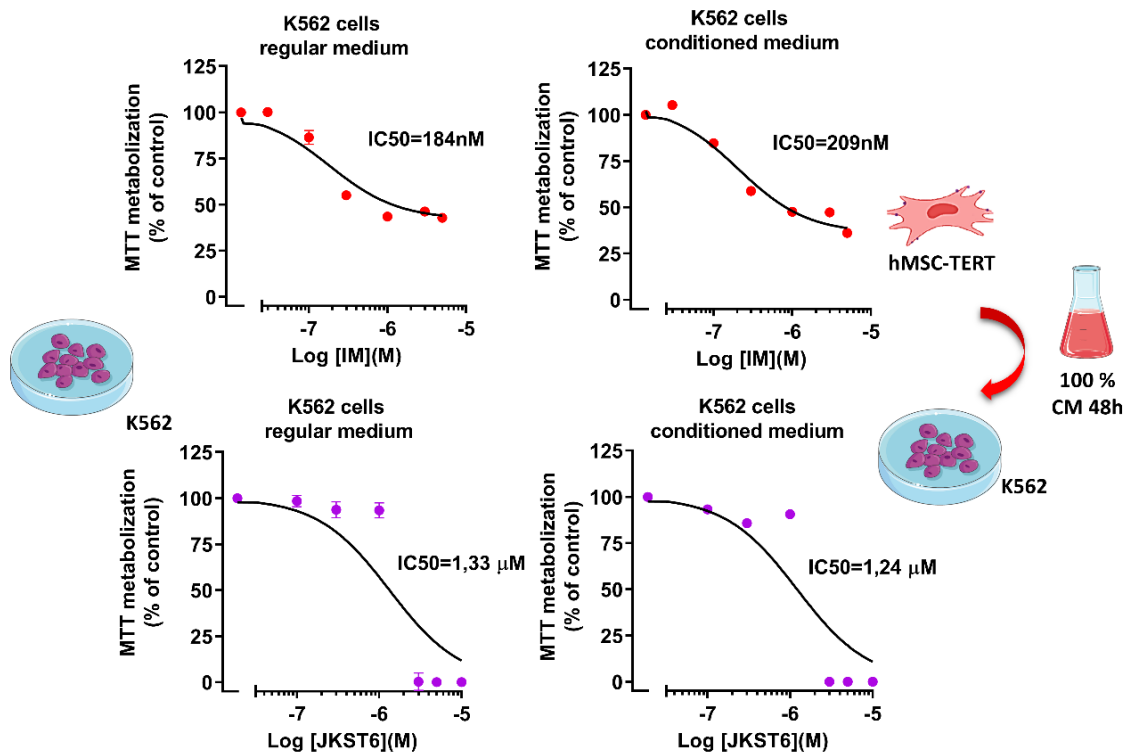
**Figura 64. Estudio de sinergia entre JKST6 e IM sobre la activación de STAT5 en células de LMC.** Determinación de la fosforilación en tirosina (pY694) y de la expresión proteica total de STAT5 mediante ensayos de inmunoblot realizado con extractos proteicos totales obtenidos de células K562 tratadas durante 3 horas con vehículo (0,05% DMSO), JKST6 (0,5 o 1  $\mu$ M), IM (0,03 o 0,05  $\mu$ M), o la combinación de ambos compuestos. La proteína  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga.

En estos ensayos las células K562 fueron tratadas con distintas combinaciones de dosis submáximas de IM (0,03 o 0,05  $\mu$ M) y JKST6 (0,5 o 1  $\mu$ M) para posteriormente determinar la p<sup>Y694</sup> de STAT5 mediante ensayos de inmunoblot con anticuerpos específicos. De esta forma tal como muestra la **Figura 64**, las combinaciones de ambos fármacos se comportan sinérgicamente a la hora de inhibir la fosforilación en tirosina de STAT5 con respecto a los fármacos por separado.

### 10. JKST6 mantiene su potencia antitumoral bajo la influencia del medio condicionado y del nicho tumoral

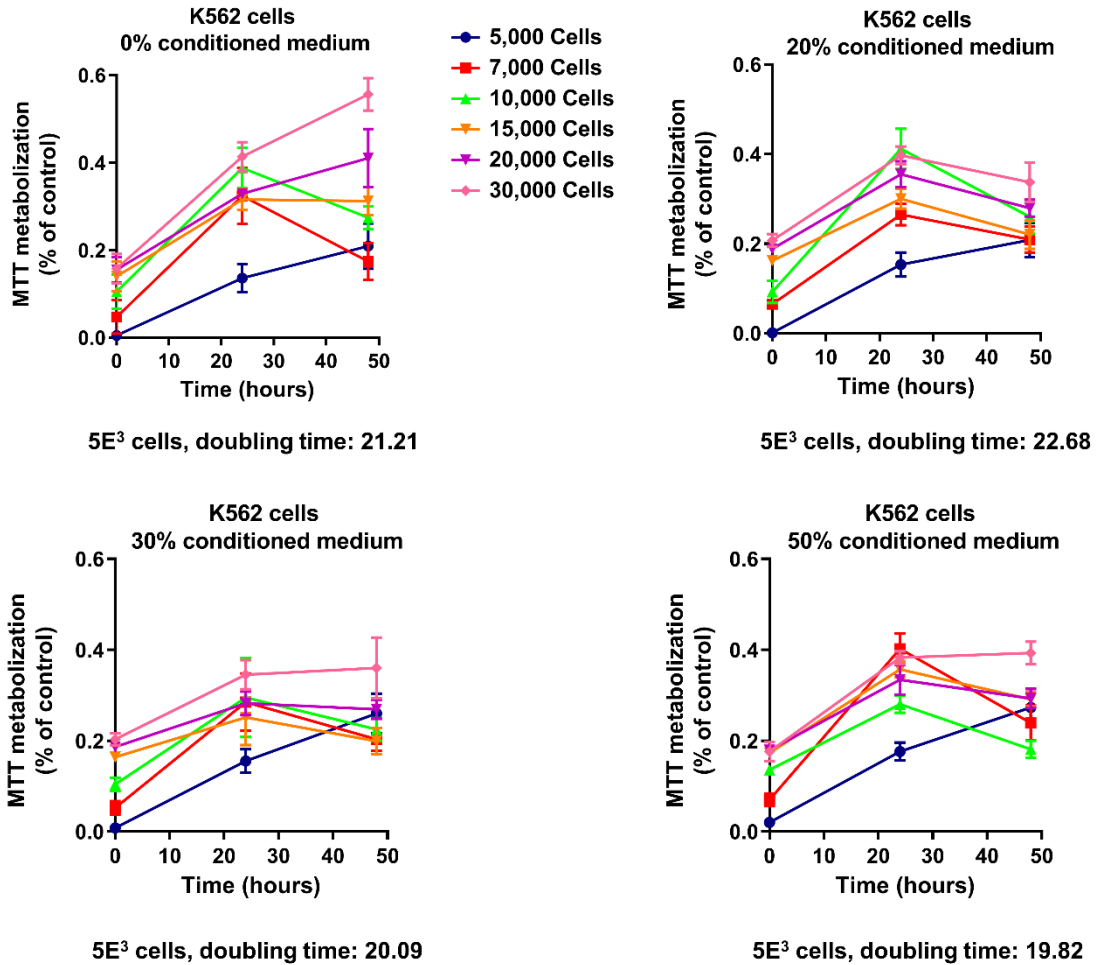
El microambiente de la médula ósea es imprescindible para el mantenimiento a largo plazo de la hematopoyesis y para la regulación de las células madre y su progenie. Por tanto, es una fuente rica en factores de crecimiento y citoquinas que actúan a nivel paracrino y autocrino. Numerosos estudios han encontrado un efecto de dicho microambiente en la generación de resistencia a fármacos antileucémicos y concretamente, a inhibidores de BCR-ABL1, clasificándose como factores extrínsecos de resistencia a TKIs (124). Por esta razón, se investigó si el JKST6 es capaz de mantener su efectividad antitumoral en células de LMC bajo la influencia de medio condicionado (CM) por células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (hMSC-TERT).

Inicialmente, se estudió la influencia del CM en los efectos del JKST6 sobre la viabilidad celular, utilizando el IM como control. Para ello, el medio en el que se crecieron exponencialmente las hMSC-TERT durante 48 horas fue recogido y utilizado sin diluir (100 %) para la detección de cambios en los valores de IC50 de JKST6 e IM en células K562. Como se observa en la **Figura 65**, las células expuestas a CM incubado durante 48 horas no sufrieron cambios relevantes en lo que se refiere a la sensibilidad a los tratamientos.



**Figura 65.** Efecto del medio condicionado por MSC (100%) en la viabilidad (IC50) de células de LMC tratadas con JKST6. Viabilidad celular determinada por MTT en células K562 crecidas en medio normal tratadas con diferentes concentraciones de IM (panel superior izquierdo) y de JKST6 (panel inferior izquierdo), o en células K562 crecidas en 100% medio condicionado (CM) tratadas con diferentes concentraciones de IM (panel superior derecho) o JKST6 (panel inferior derecho). El CM se generó por incubación durante 48 horas con hMSC-TERT.

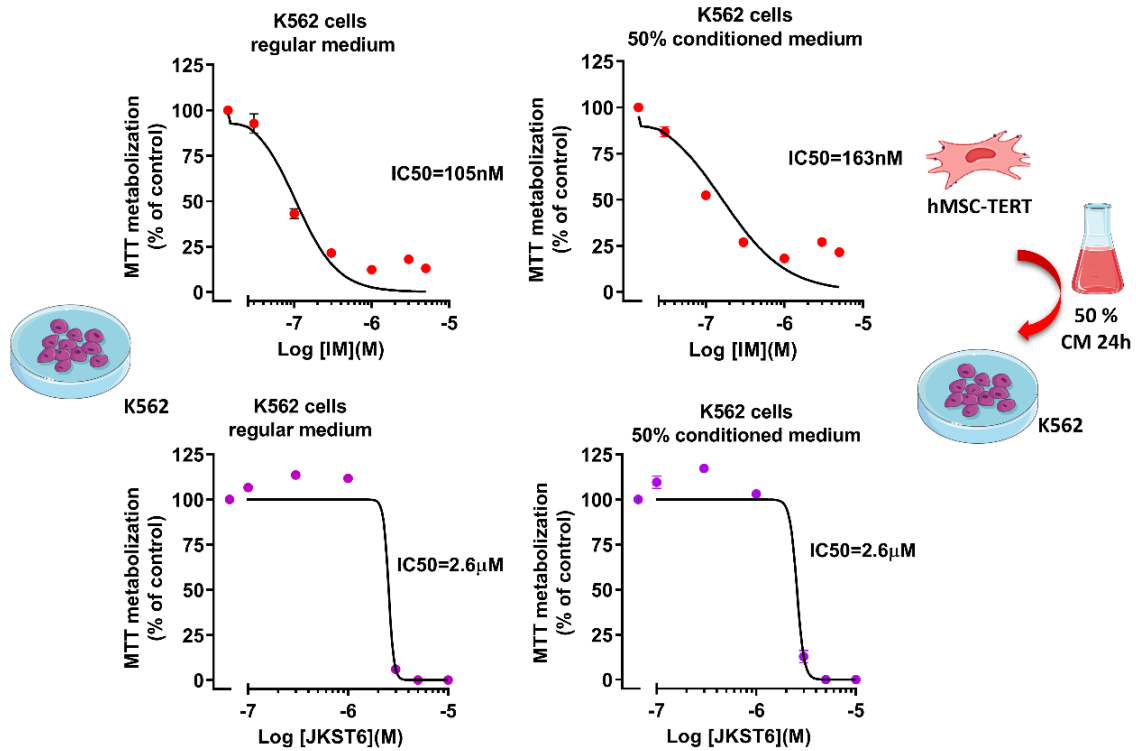
Uno de los efectos reconocidos de la exposición de las células de LMC a CM es el incremento de la supervivencia clonogénica y la proliferación celular (125, 214). En este sentido, se estudió si el CM produce alguna ventaja proliferativa en las células de LMC. Para ello, se realizó una curva de crecimiento en células K562 expuestas a distintos porcentajes de CM (0-50%) incubado durante 24 horas para evitar el estrés generado por la falta de suero y glucosa del medio (220) (**Figura 66**).



**Figura 66.** Curva de crecimiento en células K562 crecidas en medio condicionado (CM) derivado de células hMSC-TERT al 0, 20, 30 o 50%. Se analizó la viabilidad celular de las células K562 sembradas a las densidades celulares ( $5E^3$ ,  $7E^3$ ,  $10E^3$ ,  $15E^3$ ,  $20E^3$ ,  $30E^3$ ) mediante ensayo de MTT. Se calculó el tiempo de duplicación de cada condición experimental. Debajo de cada gráfica se añade el tiempo de duplicación (*doubling time*) de la densidad celular elegida por su rapidez en el crecimiento exponencial.

Según la curva de crecimiento, la tasa de replicación en células de LMC es menor cuando se utiliza una densidad de siembra de 5000 células por pocillo y se exponen a un 50% de CM (**Figura 66**). Teniendo esto en cuenta, se generó el CM que propicia un menor tiempo de duplicación en las células de LMC y se repitió el experimento para estudiar su influencia sobre la sensibilidad de las células K562 a los compuestos JKST6 e IM (**Figura 67**).

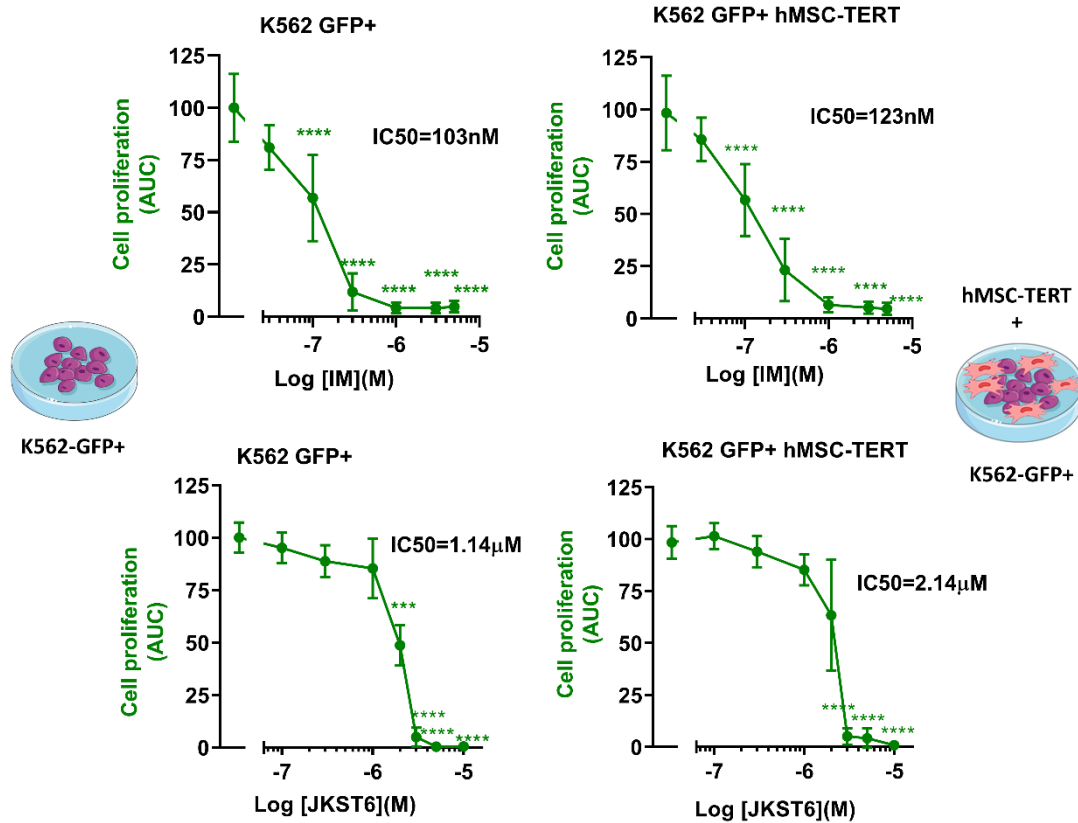




**Figura 67. Efecto del medio condicionado por MSC (50%) en la viabilidad (IC50) de células de LMC tratadas con JKST6.** Viabilidad celular estudiada en células K562 crecidas en medio normal tratadas con diferentes concentraciones de IM (panel superior izquierdo) y de JKST6 (panel inferior izquierdo), o en células K562 crecidas en 50% medio condicionado (CM) tratadas con diferentes concentraciones de IM (panel superior derecho) o JKST6 (panel inferior derecho). El CM se generó por incubación durante 24 horas con hMSC-TERT.

Los resultados revelan que no existen cambios notables en los valores de IC50 de los fármacos en células K562 expuestas al CM seleccionado cuando se compara con los valores de IC50 de las células K562 crecidas con medio normal (**Figura 67**).

Posteriormente, para investigar si el nicho tumoral puede generar resistencia parcial a los compuestos (JKST6 e IM) en células de LMC, se realizaron experimentos de co-cultivo. En estos ensayos, las hMSC-TERT actuaron como sustrato sobre el cual se sembraron las células de leucemia K562-GFP+, permitiendo hacer una estimación precisa (mediante medición de fluorescencia) de su crecimiento en experimentos dosis-respuesta de 5 días de duración (**Figura 68**).



**Figura 68.** Efecto del co-cultivo con MSC en la proliferación (IC<sub>50</sub>) de células de LMC tratadas con JKST6. Proliferación celular registrada durante 5 días en células K562-GFP+ expuestas a dosis crecientes de IM (panel superior izquierdo), o de JKST6 (panel inferior izquierdo), con respecto a la proliferación celular determinada en células K562 -GFP+ crecidas en co-cultivo con hMSCs-TERT tratadas con dosis crecientes de IM (panel superior derecho) o JKST6 (panel inferior derecho). La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del post hoc test de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con VEH.

Como se observa en la **Figura 68**, los valores de IC<sub>50</sub> calculados para el JKST6 y el IM aumentaron significativamente bajo la influencia del nicho (hMSC-TERT), siendo este aumento notablemente mayor en las células tratadas con JKST6 (**Tabla 29**).

**Tabla 29.** Pruebas t test que comparan la media de IC<sub>50</sub>s de K562-GFP+ con respecto a la media de IC<sub>50</sub>s del co-cultivo.

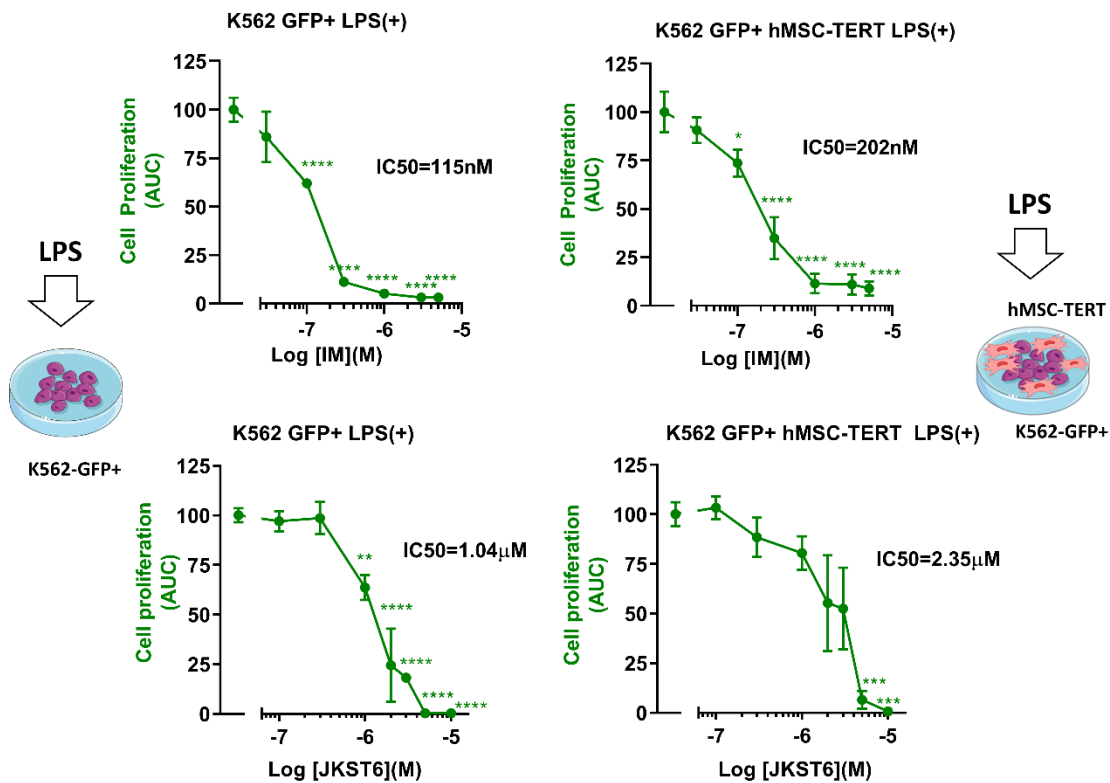
| T -test comparison | K562-GFP+ JKST6 IC <sub>50</sub><br>t test differences | K562-GFP+ IM IC <sub>50</sub><br>t test differences |
|--------------------|--|---|
| K562-hMSC-TERT     | $p=0,042$  | $p=0,045$   |

Tabla resumen de los valores p obtenidos para las pruebas t de student realizadas entre la IC<sub>50</sub> media del JKST6 y del IM en el grupo experimental K562-GFP+ con respecto al grupo experimental K562-GFP+hMSC-TERT.

Por otro lado, se ha demostrado que las células tumorales producen mediadores inflamatorios de forma continua, lo cual desencadena el reclutamiento de células

inflamatorias y el establecimiento de un microambiente proinflamatorio. Las MSC “naïve” pueden desempeñar funciones bidireccionales con fenotipos pro- o anti-inflamatorios y, por tanto, también pueden modificar la respuesta a los tratamientos antitumorales (221).

Teniendo esto en cuenta, se decidió investigar si en un contexto de nicho proinflamatorio, el JKST6 mantiene su efecto antitumoral en células de LMC. Mediante ensayos de co-cultivo con células K562-GFP+ y hMSC-TERT en condiciones inflamatorias (estimulación con el agonista del receptor TLR-4, lipopolisacárido o LPS), se estudiaron los efectos dependientes de la concentración de los compuestos JKST6 e IM sobre la proliferación celular durante 5 días (**Figura 69**).



**Figura 69. Efecto del estímulo proinflamatorio y el co-cultivo con MSC en la proliferación (IC50) de células de LMC tratadas con JKST6.** Proliferación celular registrada durante 5 días en células K562-GFP+ pre-estimuladas con LPS (10 ng/ml) durante 16 horas antes de ser expuestas a dosis crecientes de IM (panel superior izquierdo) o de JKST6 (panel inferior izquierdo), respecto a la proliferación celular determinada en células K562-GFP+ crecidas en co-cultivo con hMSCs-TERT pre-estimuladas con LPS (10 ng/ml, 16h) y tratadas con dosis crecientes de IM (panel superior derecho) o JKST6 (panel inferior derecho). La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del post hoc test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con VEH.

Los valores de IC50 calculados en las células K562-GFP+ estimuladas con LPS (10 ng/ml) y en las células K562-GFP+ sin estimular fueron prácticamente iguales para el JKST6 ( $p = 0,326$ ) y el IM ( $p = 0,561$ ). Pero al comparar la sensibilidad de las células K562-GFP+ sin nicho con la de las células K562-GFP+ en co-cultivo proinflamatorio, se encontró un aumento de los valores de IC50 de aproximadamente el doble para ambos compuestos, aunque no resultaron estadísticamente significativos ni para el JKST6 ( $p = 0,109$ ) ni para el IM ( $p = 0,402$ ) (**Tabla 30**).

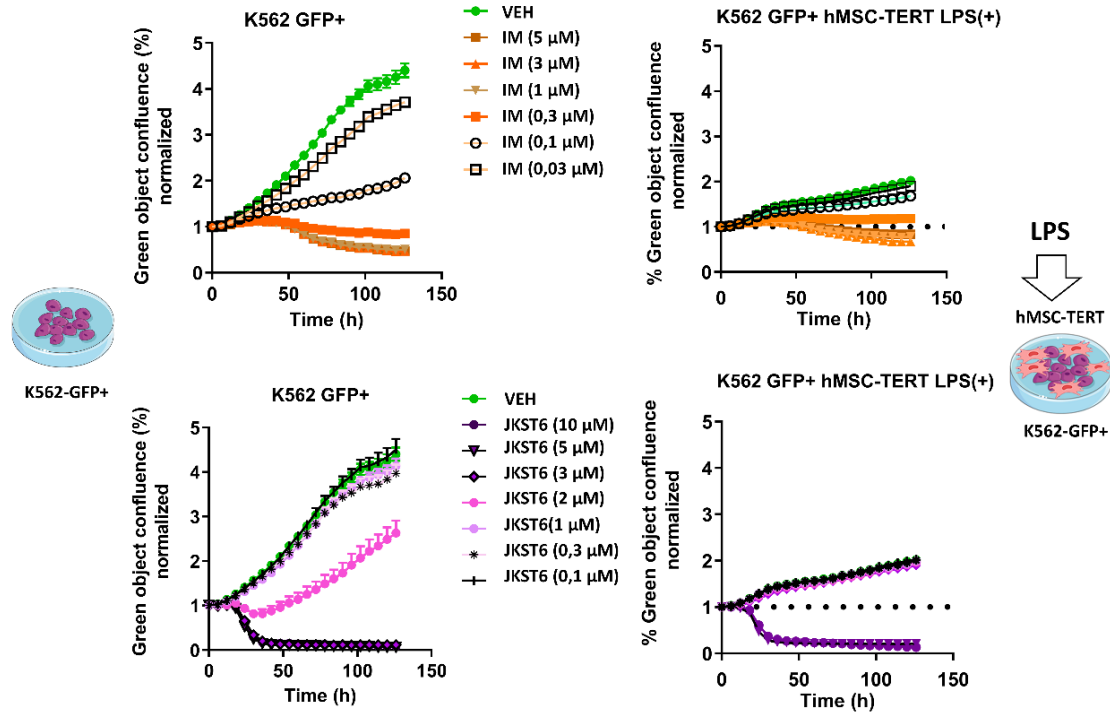
**Tabla 30.** Pruebas t-test que comparan la media de IC50s de K562-GFP+ respecto a la media de IC50s de K562-GFP+ LPS (+) o co-cultivo LPS (+).

| T -test comparison  | K562-GFP+ JKST6 IC50<br>t test differences | K562-GFP+ IM IC50<br>t test differences |
|---------------------|--|---|
| K562-GFP+ LPS (+)   | N.S ( $p = 0,326$ )                        | N.S ( $p = 0,561$ )                     |
| K562-hMSC-TERT +LPS | N.S ( $p = 0,109$ )                        | N.S ( $p = 0,402$ )                     |

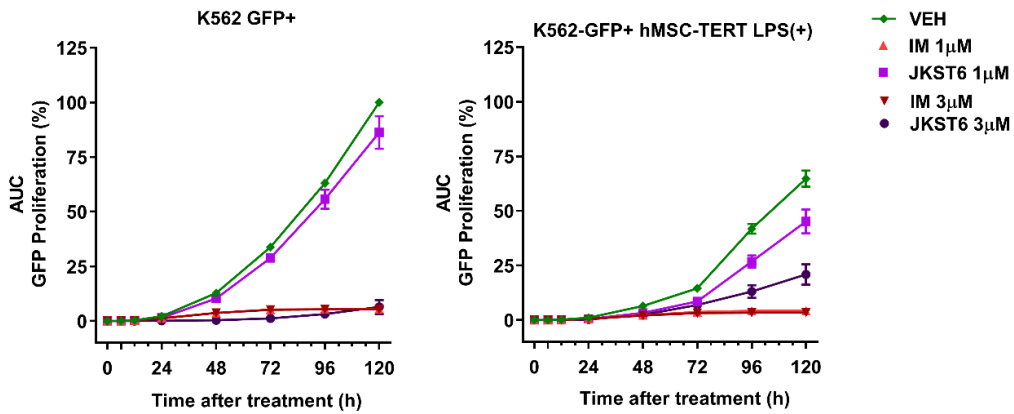
Tabla resumen de los valores p obtenidos para las pruebas t de student realizadas entre la IC50 media del JKST6 y el IM en el grupo experimental K562-GFP+ con respecto a K562-GFP+LPS (+) o K562-GFP+ hMSC-TERT LPS (+). NS: No significativo.

En resumen, los valores de IC50 de los compuestos JKST6 e IM experimentan cambios detectables con la influencia del nicho (co-cultivo) o del nicho proinflamatorio (co-cultivo + LPS), aunque ambos compuestos mantuvieron una potencia antitumoral considerable (**Figura 68-69, Tabla 29-30**).

Al representar el efecto de los compuestos sobre la proliferación de K562-GFP+ respecto al tiempo, se puede estudiar en detalle la cinética de acción del IM y JKST6. De esta forma, se detectaron cambios en la proliferación de K562-GFP+ en presencia de hMSCs-TERT con estímulo proinflamatorio (**Figura 70 y 71**) que no eran detectables con el estudio exclusivo de los valores de IC50.



**Figura 70. Efecto del estímulo proinflamatorio en el crecimiento de células de LMC en co-cultivo con MSC tratadas con JKST6.** Experimento representativo de determinación de la proliferación celular frente al tiempo, analizada como confluencia verde de células K562-GFP+ expuestas a dosis crecientes de IM (panel superior izquierdo) o de JKST6 (panel inferior izquierdo), respecto a la confluencia verde de células K562-GFP+ en co-cultivo con hMSC-TERT y pre-estimuladas con LPS (10 ng/ml, 16 h) antes del tratamiento con IM (panel superior derecho) o JKST6 (panel inferior derecho).

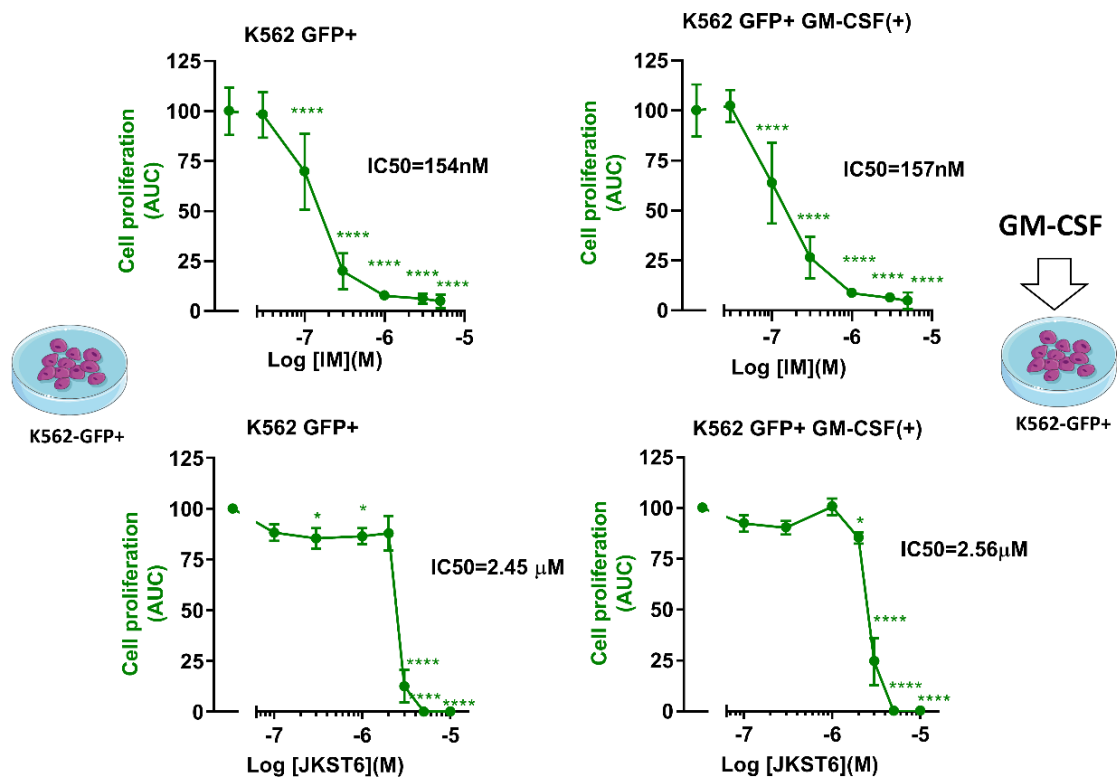


**Figura 71. Gráfica dosis-tiempo de la proliferación de células de LMC en co-cultivo tratadas con IM o JKST6 con estímulo proinflamatorio.** Estudio comparativo del efecto anti-proliferativo de las dosis (1 y 3μM) de IM y JKST6 en células K562-GFP+ (panel izquierdo) o del co-cultivo con estimulación de LPS (10 ng/ml) durante 16 horas previas al tratamiento con IM y JKST6 (1 y 3μM) (panel derecho), a lo largo del experimento (0-120 horas).

Como se observa en las **Figuras 70 y 71**, se produce una inhibición notable del crecimiento de las células de LMC en todos los tratamientos estudiados bajo condiciones

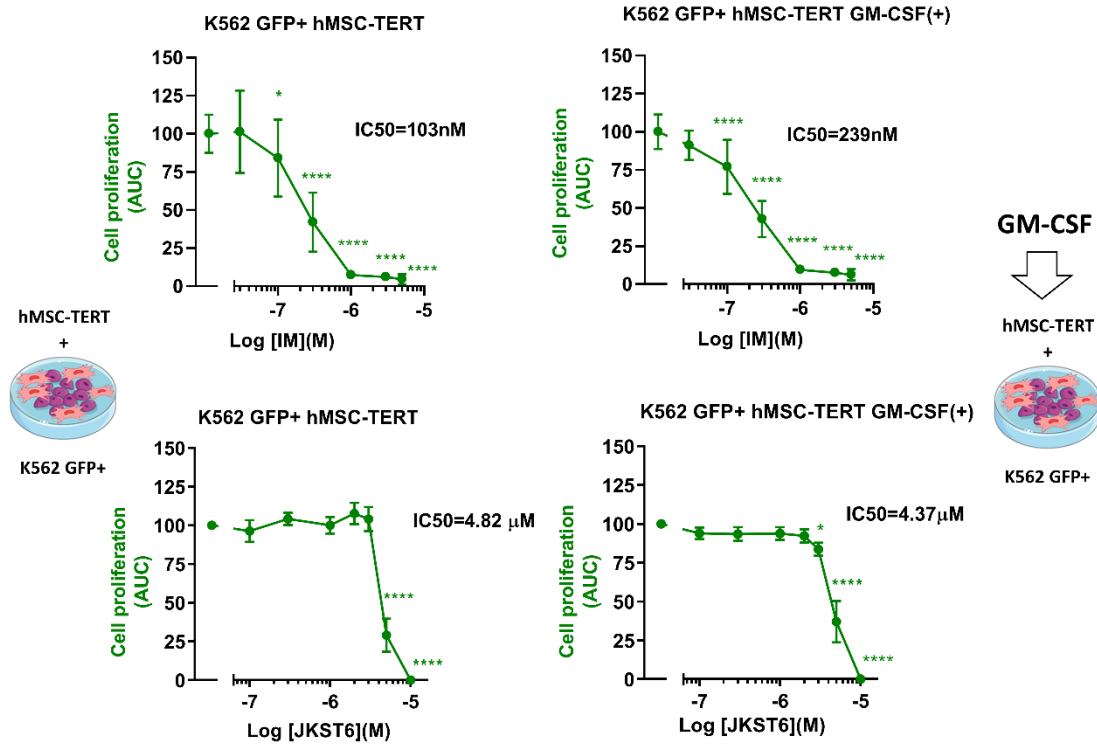
de co-cultivo proinflamatorio, destacando el hecho de que las células leucémicas tratadas con vehículo crecieron un 35% menos en estas condiciones (**Figura 71**).

Además, la secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) ha sido atribuida a células progenitoras BCR-ABL1+ y a MSCs activadas por LPS y se ha descrito como un elemento que contribuye a la resistencia a TKIs *in vitro* e *in vivo* (3, 4). Por tanto, se investigó si la estimulación con GM-CSF generaba cambios en la sensibilidad de las células K562-GFP+ a los compuestos cuando se crecían solas (**Figura 72**).



**Figura 72.** Efecto del estímulo con GM-CSF en la proliferación (IC50) de células de LMC tratadas con JKST6. Proliferación celular registrada durante 5 días en células K562-GFP+ no pre-estimuladas (VEH, 6h) antes de ser expuestas a dosis crecientes de IM (panel superior izquierdo) o de JKST6 (panel inferior izquierdo), respecto a la proliferación celular en células K562-GFP+ pre-estimuladas con GM-CSF (10 ng/ml, 6 h) y tratadas con dosis crecientes de IM (panel superior derecho) o JKST6 (panel inferior derecho). La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \*p < 0.05, \*\*\*\* p < 0.0001 con respecto a las células tratadas con VEH.

Como se observa en la **Figura 72**, la estimulación de células K562-GFP+ con GM-CSF no alteró significativamente la sensibilidad a los compuestos JKST6 o IM (**Tabla 31**). A continuación, se investigó si se producían cambios de sensibilidad a los fármacos en presencia de las células hMSC-TERT estimuladas con GM-CSF (+) (**Figura 73**).



**Figura 73. Efecto del estímulo con GM-CSF en la proliferación (IC50) de células de LMC crecidas en co-cultivo con MSC y tratadas con JKST6.** Proliferación celular registrada durante 5 días en células K562-GFP+ no pre-estimuladas (VEH, 6h) antes de ser expuestas a dosis crecientes de IM (panel superior izquierdo) o de JKST6 (panel inferior izquierdo), respecto a la proliferación celular en células K562-GFP+ crecidas en co-cultivo con hMSCs-TERT pre-estimuladas con GM-CSF (10 ng/ml, 6 h) y tratadas con dosis crecientes de IM (panel superior derecho) o JKST6 (panel inferior derecho). La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del post hoc test de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con VEH.

Si se comparan los valores de IC50 del co-cultivo estimulado con GM-CSF con respecto a los valores de IC50 de las células K562-GFP+ sin estimular, se observa un aumento de 1,8 veces para el JKST6 y 1,6 veces para el IM. Estos resultados sugieren que la estimulación con GM-CSF no afecta sustancialmente a la sensibilidad de las células leucémicas frente a los tratamientos en monocultivo, pero sí lo hace cuando estas se encuentran en co-cultivo con las hMSC-TERT, aunque como se aprecia en la **Tabla 31**, los resultados no fueron significativos.

Tabla 31. Pruebas t test que comparan la media de IC50s de K562-GFP+ vs. media de IC50s de K562-GFP+ GM-CSF (+) o co-cultivo GM-CSF (+).

| T -test comparison          | K562-GFP+ JKST6 IC50 t test differences | K562-GFP+ IM IC50 t test differences |
|-----------------------------|---|--------------------------------------|
| K562-GFP+ GM-CSF (+)        | N.S (p = 0,347)                         | N.S (p = 0,844)                      |
| K562-hMSC-TERT + GM-CSF (+) | N.S (p= 0,268)                          | N.S (p= 0,302)                       |

Tabla resumen de los valores p obtenidos para las pruebas t de student realizadas entre la IC50 media del JKST6 y el IM en el grupo experimental K562-GFP+ versus K562-GFP+LPS (+); o K562-GFP+ hMSC-TERT LPS (+). NS: No significativo.

Además, los estudios de cinética de proliferación de las K562-GFP+ en estas condiciones demuestran que no se produce inhibición global del crecimiento de las células cuando estas crecen en co-cultivo con hMSC-TERT estimulado con GM-CSF (**Figura 74**), a diferencia de lo observado en el co-cultivo estimulado con LPS (**Figura 70**).

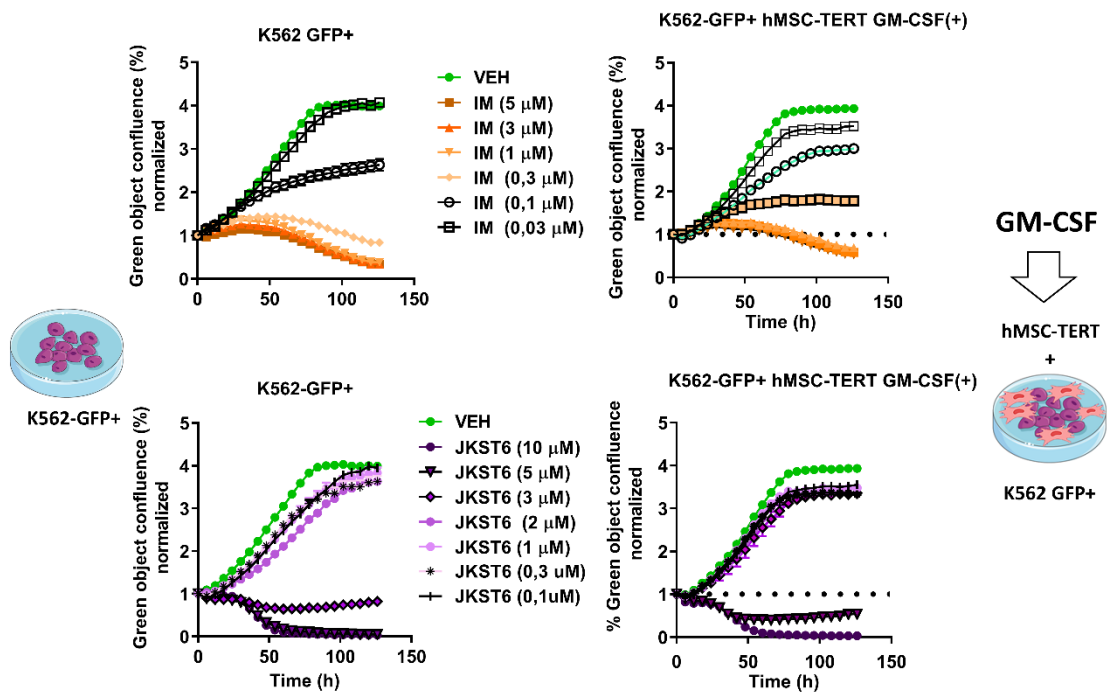


Figura 74. Efecto del estímulo GM-CSF en el crecimiento de células de LMC en co-cultivo con MSC tratadas con JKST6. Experimento representativo de determinación de la proliferación celular frente al tiempo, analizada como confluencia verde de células K562-GFP+ expuestas a dosis crecientes de IM (panel superior izquierdo) o JKST6 (panel inferior izquierdo), respecto a la confluencia verde de células K562-GFP+ en co-cultivo con hMSC-TERT y pre-estimuladas con GM-CSF (10 ng/ml, 6 h) antes del tratamiento con IM (panel superior derecho) o JKST6 (panel inferior derecho).



## 11. JKST6 reduce la viabilidad y el crecimiento de células de LMC resistentes a IM

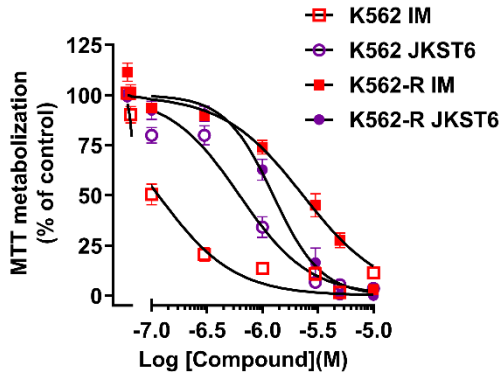
Un objetivo prioritario de esta investigación consistió en estudiar si el JKST6 mantiene su capacidad antitumoral en células resistentes a IM. La resistencia a IM detectada en LMC se ha asociado, entre otros mecanismos, a la aparición de mutaciones como BCR-ABL1<sup>T315I</sup>, la sobreexpresión de BCR-ABL1 o a la presencia de proteínas transportadoras de fármacos (57). Por ello, en primer lugar, se estudió el efecto del compuesto sobre la viabilidad de un conjunto de células con resistencia demostrada a IM generada por distintas causas (**Tabla 32**) (117).

**Tabla 32. Efecto del JKST6 y el IM sobre las células de leucemia mieloide crónica (LMC) sensibles y resistentes a IM.**

| Línea Celular | valores IC50<br>JKST6<br>( $\mu\text{M}$ ; media $\pm$ SEM) | valores IC50<br>IM<br>( $\mu\text{M}$ ; media $\pm$ SEM) |
|---------------|---|--|
| K562          | 0,66 $\pm$ 0,29   | 0,14 $\pm$ 0,05  |
| K562-R        | 1,03 $\pm$ 0,13   | 3,86 $\pm$ 0,37  |
| AR230         | 1,52 $\pm$ 0,31   | 0,15 $\pm$ 0,02  |
| AR230-R       | 1,57 $\pm$ 0,49   | 1,89 $\pm$ 0,55  |
| KmycBT315I    | 1,79 $\pm$ 0,25   | 15,13 $\pm$ 1,72   |

Los datos representan viabilidad celular medida por ensayo de MTT, tal como se describe en material y métodos, en células tratadas con vehículo (0,05 % DMSO), JKST6 (0,01 a 10  $\mu\text{M}$ ) o IM (0,03-20  $\mu\text{M}$ ) durante 48 horas.

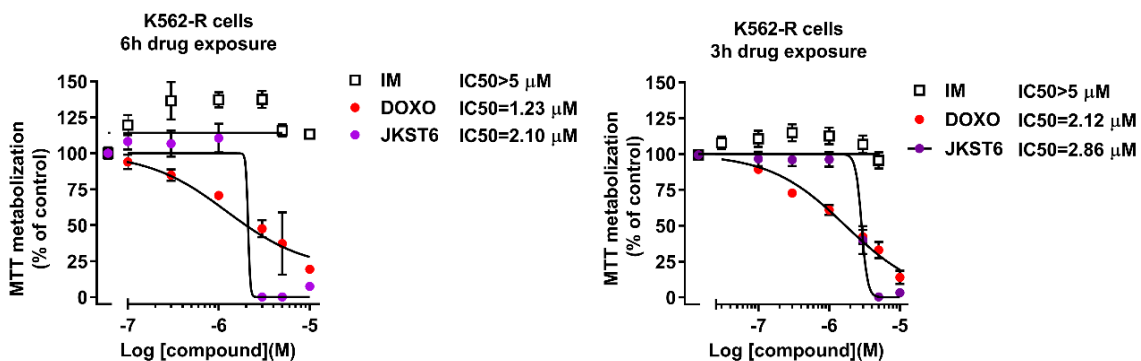
Las células K562 resistentes y sensibles a IM fueron tratadas con concentraciones crecientes de IM o de JKST6 durante 48 horas. Como ya habíamos descrito previamente (74), la IC50 del IM fue aproximadamente 20 veces más alta en las células K562-R (3,86  $\pm$  0,37  $\mu\text{M}$ ) que en las células K562 (0,14  $\pm$  0,05  $\mu\text{M}$ ), mientras que el JKST6 mostró una eficacia antitumoral similar en ambos modelos celulares (IC50 = 1,03  $\pm$  0,11  $\mu\text{M}$  e IC50 = 0,66  $\pm$  0,09  $\mu\text{M}$  en K562-R y K562, respectivamente) (**Figura 75**).



**Figura 75. Efecto del JKST6 en la viabilidad de células de LMC resistentes a IM.** Viabilidad determinada en células de leucemia mieloide crónica (LMC) sensibles (K562) y resistentes (K562-R) a IM incubadas con vehículo (0,05% DMSO) o con concentraciones crecientes de JKST6 o IM durante 48 horas. Los ensayos de MTT se realizaron tal como se describe en material y métodos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el JKST6 mantiene su eficacia antitumoral en el clon K562 transfectado para expresar la mutación BCR-ABL1<sup>T315I</sup> (117), un mecanismo de resistencia a IM ampliamente descrito en clínica (**Tabla 32**). Además, se investigó la eficacia del compuesto sobre clones sensibles (AR230) y resistentes (AR230-R) a IM, portadores de una variante de BCR-ABL1 de 230 KDa, cuya sobreexpresión genera resistencia (103). Los resultados demostraron que AR230-R es 12 veces menos susceptible a la acción inhibitoria del IM que su respectivo clon sensible AR230 ( $1,89 \pm 0,55 \mu\text{M}$  y  $0,15 \pm 0,02 \mu\text{M}$ , respectivamente); en cambio el JKST6 mantuvo una potencia inhibitoria similar en ambos clones ( $1,52 \pm 0,31$  y  $1,57 \pm 0,49$ ) (**Tabla 32**).

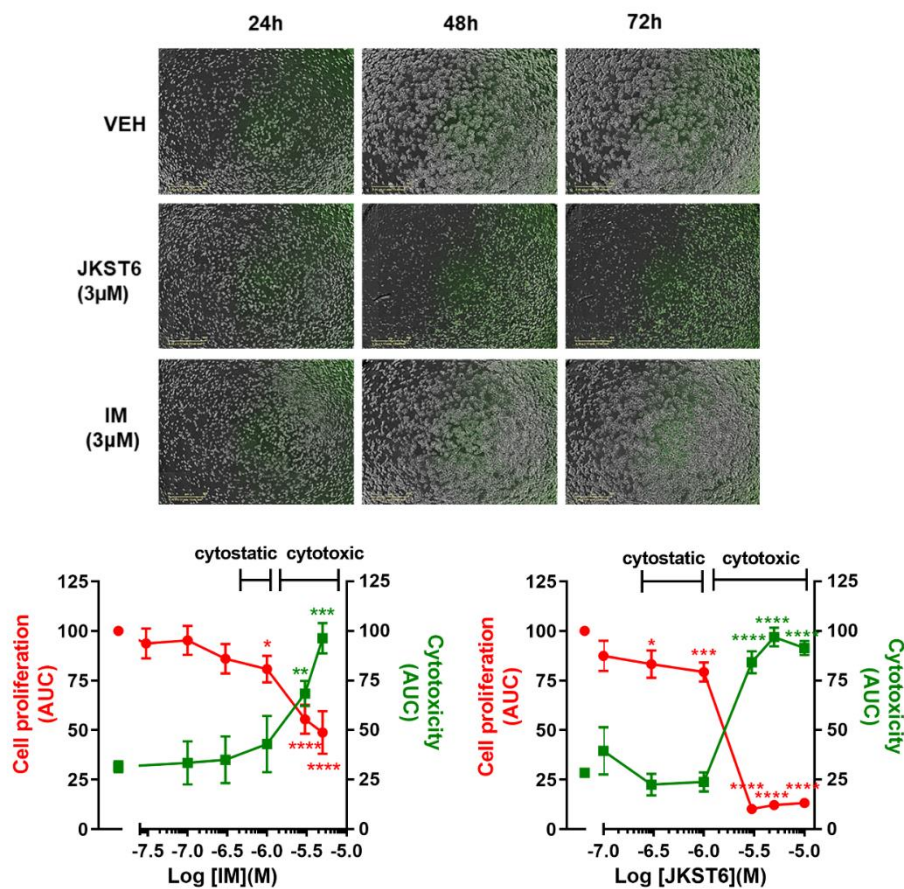
A continuación, se investigó si los efectos inhibitorios del JKST6 sobre la viabilidad de células de LMC resistentes a IM son irreversibles. Con este objetivo, se realizaron experimentos de *wash-out* que consisten en la exposición a tiempos cortos (3 y 6 horas) de las células K562-R a los fármacos (JKST6, IM, y DOXO), seguido de la retirada de los compuestos del medio durante 48 horas (**Figura 76**).



**Figura 76. Estudio de los efectos irreversibles del JKST6 sobre la viabilidad de células de LMC resistentes a IM.** Viabilidad celular determinada mediante MTT en cultivos de K562-R expuestos a vehículo (0,05% DMSO) o concentraciones crecientes (0,01–10 μM) de JKST6, DOXO o IM durante 6 horas (panel izquierdo) y 3 horas (panel derecho), seguido de pasos de *wash-out* según se describe en material y métodos.

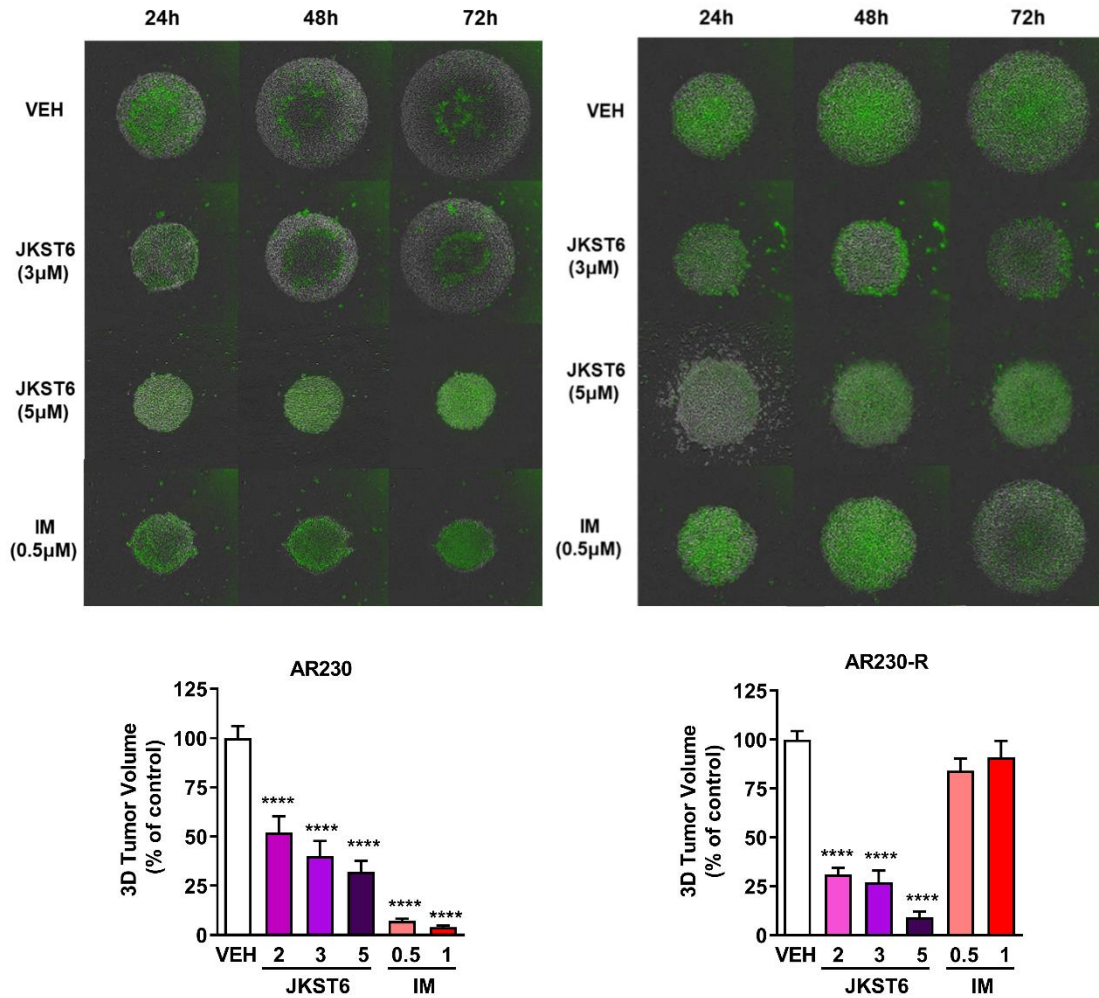
Tal como se preveía, el IM no resultó efectivo ( $IC_{50} > 5 \mu M$ ) a ninguno de los dos tiempos estudiados, mientras que el JKST6 y la DOXO mantuvieron la capacidad de reducir significativamente la viabilidad de las células K562-R tras tiempos cortos de exposición (**Figura 76**).

El estudio de la proliferación a tiempo real de las células K562-R durante tiempos largos (5 días) demostró que el IM es menos potente en células K562-R ( $IC_{50} = 4,55 \pm 1,31 \mu M$ ) que en las sensibles K562 ( $IC_{50} = 0,24 \pm 0,2 \mu M$ ); mientras que el JKST6 siguió siendo efectivo en ambos casos (K562-R  $IC_{50} = 1,07 \pm 0,19 \mu M$  versus K562  $IC_{50} = 0,75 \pm 0,10 \mu M$ ) (**Figura 77**).



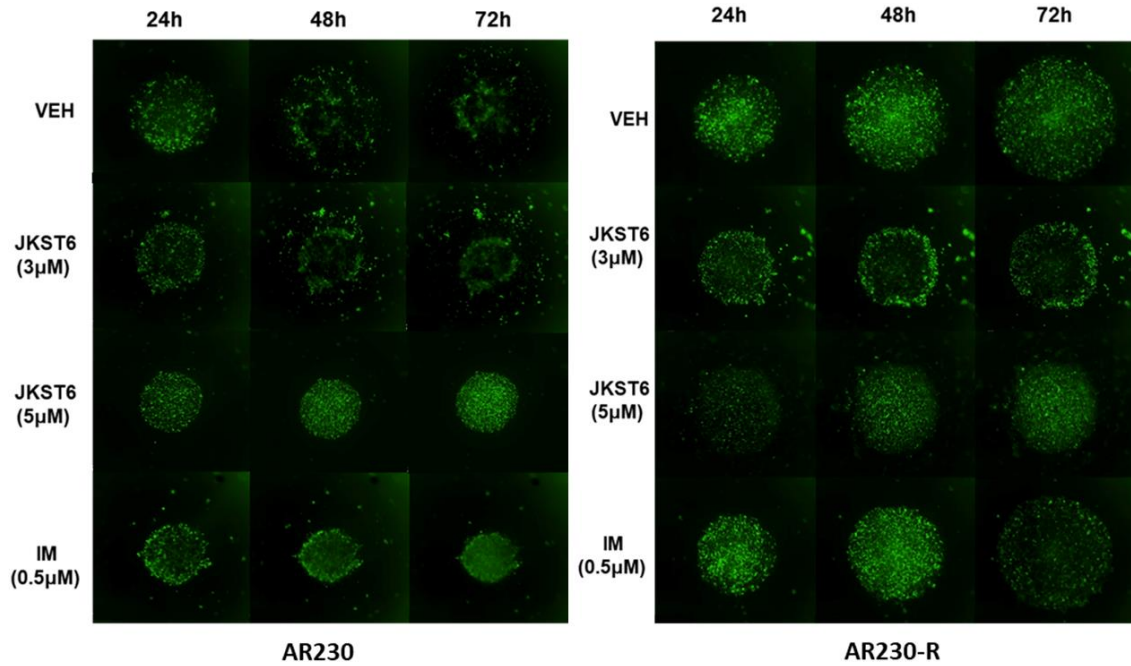
**Figura 77. Proliferación y citotoxicidad celular registradas en células K562-R tratadas con vehículo (0,05% DMSO), JKST6 (0,01–10  $\mu M$ ) o IM (0,01–5  $\mu M$ ) durante 5 días.** Panel superior: microfotografías representativas de células K562-R proliferando en ausencia (vehículo (0,05% DMSO): VEH) o presencia de JKST6 (3  $\mu M$ ) o IM (3  $\mu M$ ) durante 24, 48 y 72 horas. Panel inferior: Los datos representan valores de área bajo la curva (AUC) por concentración de IM (panel izquierdo) o de JKST6 (panel derecho). La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con VEH.

Para conocer el efecto del compuesto en un modelo similar al fisiopatológico, se examinó el crecimiento en 3D de células AR230-R expuestas a JKST6 o IM durante 5 días. Es conveniente destacar que el tratamiento con JKST6 provoca una reducción del volumen del esferoide dependiente de la dosis y del tiempo, mientras que el IM no altera el volumen del agregado celular. Estos ensayos se realizaron también en el clon sensible (AR230) para apreciar las diferencias entre ambas líneas (**Figura 78**).



**Figura 78.** Volumen de cultivos 3D de células de LMC sensibles (AR230) y resistentes (AR230-R) a IM tratadas con vehículo (VEH; 0,05% DMSO), JKST6 (2, 3 y 5 µM) o IM (0,5 y 1 µM) durante 5 días. Se muestran microfotografías representativas de los esferoides de AR230 (panel superior izquierda) y AR230-R (panel superior derecha) en ausencia (VEH) o presencia de compuestos JKST6 (3 y 5 µM) o IM (0.5 µM) durante 24, 48 o 72 horas. El volumen del esferoide fue calculado como porcentaje con respecto al control tanto en AR230 (panel inferior izquierda) como en AR230-R (panel inferior derecha). La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc* test de Bonferroni. \*\*\*\* $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con VEH.

Además, se analizó el marcaje con el colorante YOYO-1, que marca células con la membrana plasmática comprometida, en los esferoides de AR230 (**Figura 79**).

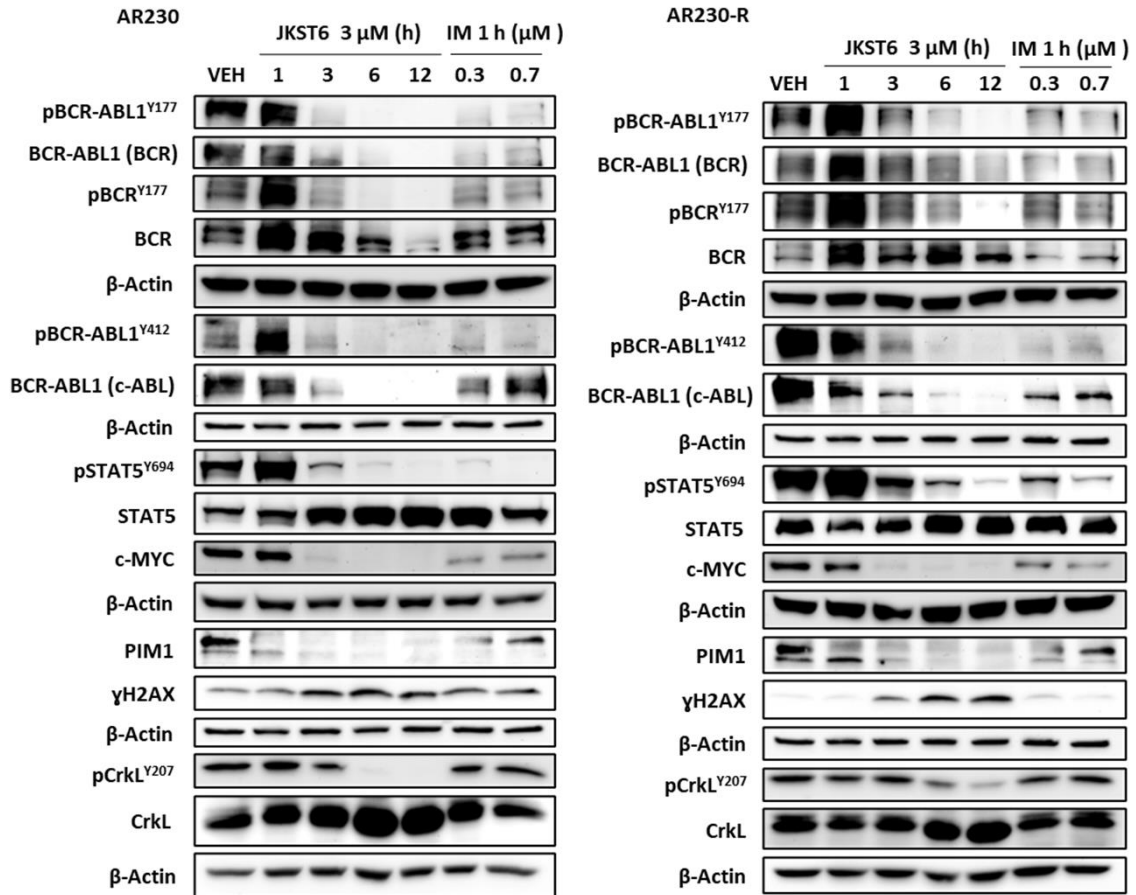


**Figura 79.** Citotoxicidad de cultivos 3D de células de LMC sensibles (AR230) y resistentes (AR230-R) a IM tratadas con vehículo (VEH; 0,05% DMSO), JKST6 (2, 3 y 5  $\mu\text{M}$ ) o IM (0,5 y 1  $\mu\text{M}$ ) durante 5 días. La citotoxicidad del esferoide fue monitorizada usando el marcaje YOYO-1. Se muestran microfotografías de fluorescencia verde representativas de los esferoides de AR230 (panel izquierdo) y AR230-R (panel derecho) en ausencia (VEH) o presencia de compuestos JKST6 (3 y 5  $\mu\text{M}$ ) o IM (0.5  $\mu\text{M}$ ) durante 24, 48 o 72 horas.

De esta forma, se observó que el JKST6 provoca citotoxicidad de forma rápida en células periféricas, mientras que el IM causa citotoxicidad visible a 24 y 48 horas, pero es ineficaz a 72 horas en células AR230-R (**Figura 79**).

## 12. JKST6 inhibe la vía BCR-ABL1/STAT5 en células de LMC resistentes a IM

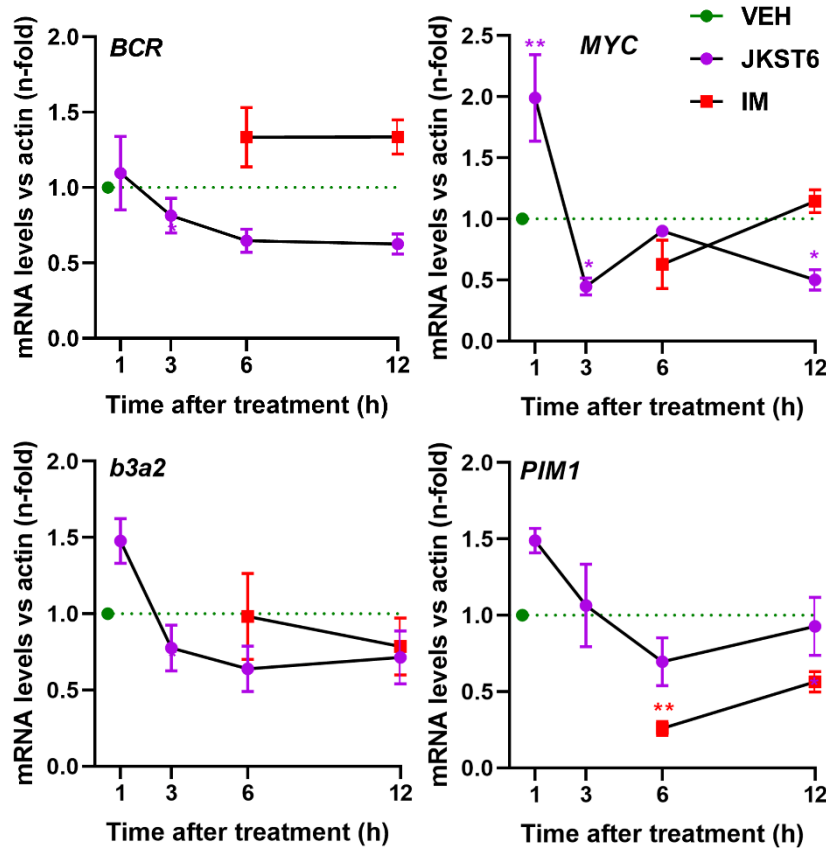
Con el fin de averiguar si el JKST6 mantiene su mecanismo de acción molecular en células resistentes a IM, se utilizó el modelo celular AR230-R y su respectivo clon sensible (AR230) como control. Los resultados confirmaron que la concentración 3  $\mu\text{M}$  del JKST6 reduce los niveles totales de BCR-ABL1, de manera simultánea a la inhibición de la fosforilación (pY<sup>177</sup>, pY<sup>412</sup>) de la oncoquinasa, tras 3 horas de tratamiento en ambos clones (**Figura 80**).



**Figura 80.** Efecto del JKST6 sobre proteínas de la vía BCR-ABL1/STAT5 en células de LMC resistentes a IM (AR230-R). Detección de niveles de proteína fosforilada y total de BCR-ABL1, BCR, STAT5, CrkL y de la presencia de c-MYC, PIM1 y  $\gamma$ H2AX en extractos proteicos totales obtenidos de células AR230 (panel izquierdo) y AR230-R (panel derecho) tratadas con vehículo (VEH, 0,05% DMSO), JKST6 (3  $\mu$ M) o IM (0,3 o 0,7  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. La proteína  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga.

Además, se observó que el compuesto JKST6 inhibe la hiperfosforilación de STAT5 (superior en AR230-R) y reduce los niveles totales de c-MYC y PIM1 en ambos clones (**Figura 80**). Sin embargo, el tratamiento con IM resulta considerablemente menos eficaz a la hora de inhibir la activación constitutiva de BCR-ABL1 y STAT5 en células resistentes (**Figura 80, panel derecho**) que en el clon sensible (**Figura 80, panel izquierdo**). El tratamiento con JKST6 induce además el aumento de los niveles de  $\gamma$ H2AX, con picos a 3, 6 y 12 horas tras el tratamiento en ambas líneas, en cambio, el IM no produce estos efectos en células resistentes (**Figura 80**).

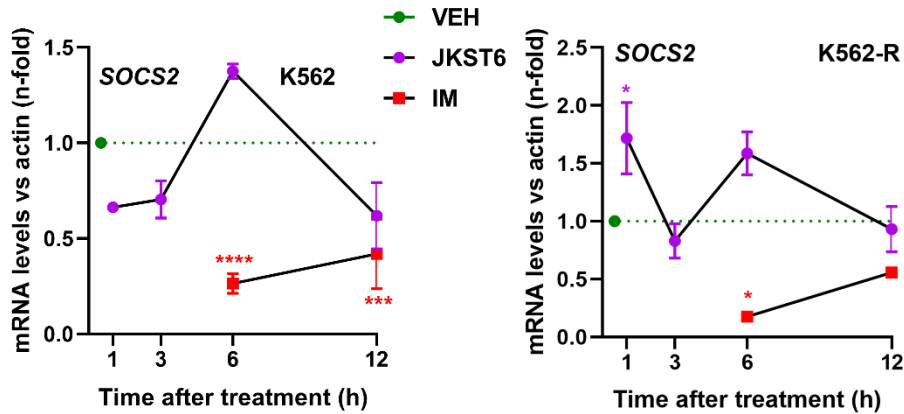
De estos resultados se deduce que el JKST6 modula la vía BCR-ABL1/STAT5 de una manera muy similar en células sensibles y resistentes a IM. Para corroborar este efecto a nivel génico, se investigó el efecto del tratamiento con JKST6 en la expresión de genes de interés para esta vía de señalización en el clon resistente K562-R (**Figura 81**).



**Figura 81.** Efecto del JKST6 sobre genes de la vía BCR-ABL1/STAT5 en células resistentes a IM (AR230-R). Análisis de la expresión génica realizado por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) de oncogenes de interés en la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 (*BCR*, *b3a2*; *PIM1*, *c-MYC*) en células resistentes a IM (K562-R) tratadas con vehículo (VEH; 0,05% DMSO), JKST6 (3  $\mu$ M) o IM (1  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. Se utilizó el gen *GAPDH* como *housekeeping* para la normalización. Los datos se presentan en forma de media  $\pm$  SEM. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  con respecto a las células tratadas con VEH.

Los resultados de expresión génica desvelan que el tratamiento con JKST6 reduce los niveles de ARNm de BCR-ABL1 en células K562-R a tiempos más largos, por lo que no parece explicar la rápida desaparición de la oncoproteína. Del mismo modo, el JKST6 redujo los niveles de ARNm de los genes diana de STAT5, *c-MYC* y *PIM1*, pero de nuevo, de forma más tardía que la disminución de sus niveles proteicos tras la exposición al producto (**Figura 81**).

Para completar los estudios de la expresión génica, se investigó si el compuesto JKST6 provoca alguna alteración en la expresión de *SOCS2*, relevante por su papel como regulador negativo de la vía JAK/STAT, que además se ha asociado con la progresión de la enfermedad a fase blástica agresiva (222). Para ello se analizaron los niveles de ARNm del gen en células de LMC sensibles y resistentes a IM (Figura 82).



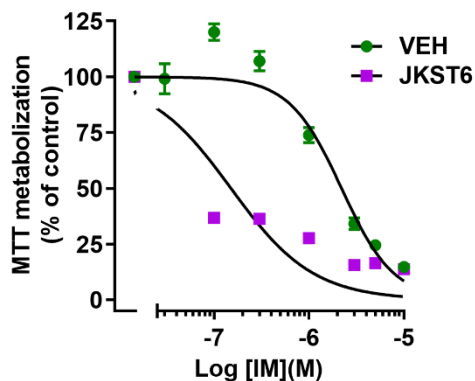
**Figura 82. Efecto del JKST6 sobre el gen regulador negativo *SOCS2* en células de LMC sensibles y resistentes a IM.** Análisis de la expresión génica realizado por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) de *SOCS2* en células sensibles (K562, panel izquierdo) o resistentes (K562-R, panel derecho) a IM tratadas con vehículo (VEH; 0,05% DMSO), JKST6 (3  $\mu$ M) o IM (1  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. Se utilizó el gen *GAPDH* como *housekeeping* para la normalización. Los datos se presentan en forma de media  $\pm$  SEM. La significación estadística fue calculada mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  con respecto células tratadas con VEH.

Tal como se ha descrito previamente (223), los niveles basales de *SOCS2* son más altos en las células resistentes a IM que en las sensibles y el tratamiento con IM reduce la expresión génica de *SOCS2* a 6 y 12 horas en ambos clones. Sin embargo, el tratamiento con JKST6 produce un pico de inducción de la expresión génica de *SOCS2* a las 6 horas de tratamiento en ambas líneas celulares, recuperando sus niveles iniciales en las células sensibles, y quedando por debajo del nivel del vehículo en las células resistentes tras 12 horas de tratamiento.

En conjunto, todos estos hallazgos confirman que el producto JKST6 es capaz de modular la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 de una manera muy similar en células de LMC sensibles y resistentes a IM. Como se ha descrito anteriormente, la línea AR230-R sobreexpresa BCR-ABL1 como mecanismo de resistencia a IM, y dado que se ha comprobado la capacidad del JKST6 de reducir los niveles de la oncoquinasa en esta línea, se planteó la hipótesis de que el tratamiento secuencial con JKST6 seguido de IM podría inducir la recuperación de la sensibilidad celular al TKI. Para comprobarlo, se pre-



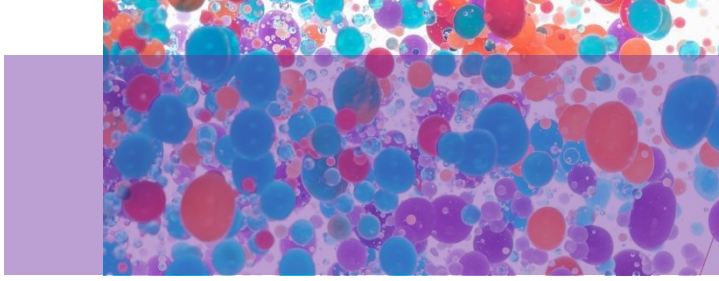
trataron las células AR230-R con la dosis  $3\mu\text{M}$  de JKST6 durante 3 horas. Seguidamente, se retiró el compuesto del medio por *wash-out* y las células se expusieron a concentraciones crecientes de IM durante 48 horas. Los resultados de la viabilidad celular tras este tiempo se muestran en la **Figura 83**.



**Figura 83. Efecto del tratamiento secuencial con JKST6 e IM en la viabilidad de células de LMC resistentes a IM.** Viabilidad celular determinada por MTT en células AR230-R pretratadas con vehículo (VEH, DMSO 0,05%, verde) o con JKST6 ( $3\mu\text{M}$ , morado) durante 3 horas, seguido de pasos de *wash-out* y tratamiento con concentraciones crecientes de IM ( $0,01\text{--}10\mu\text{M}$ ) durante 48 horas.

De manera relevante, los resultados demostraron que en las células pre-tratadas con JKST6, el efecto del IM se potencia hasta unas 14 veces ( $\text{IC}_{50} = 0.175 \pm 0.003\mu\text{M}$ ) con respecto a las no pretratadas ( $\text{IC}_{50} = 2.17 \pm 0.17\mu\text{M}$ ), recuperando los niveles detectados en células de LMC sensibles a IM (**Figura 83**).





## **VI. DISCUSIÓN**



Las opciones terapéuticas en el contexto de las NH son diversas y han evolucionado de forma rápida gracias a la aplicación de avances científicos en el área, que han mejorado considerablemente el pronóstico de los pacientes en la actualidad (14). Sin embargo, la falta de tratamientos curativos y la generación de resistencia (p. ej. en la LMC) o la agresividad y el mal pronóstico de la enfermedad (p. ej. LMA)(26) indican la necesidad de encontrar nuevas moléculas con propiedades farmacológicas que ofrezcan dianas o mecanismos de acción alternativos en las NH (59). Con este propósito, y dado que los productos naturales han supuesto y suponen la inspiración principal para la síntesis de nuevos fármacos (166,167), en la presente tesis doctoral se llevó a cabo la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antitumoral sobre células humanas de NH a partir del cribado basado en PDD de diversas quimiotecas de compuestos bio-inspirados a partir de estructuras privilegiadas.

En primer lugar, se abordó el cribado de la quimioteca de compuestos metálicos con chalconas y lapachol donde las moléculas bioactivas se fusionan con ligandos metálicos para alterar las propiedades químicas y biológicas de los compuestos (209). El primer subgrupo, cuenta con escasos compuestos citotóxicos, así como limitados casos de selectividad antileucémica. En el segundo subgrupo, sí se encuentran compuestos con IC50 potentes en el rango  $\mu\text{M}$  bajo en las células de NH, y de hecho, estos valores son 4–18 veces más potentes que los publicados para otros compuestos organometálicos fusionados a lapachol estudiados en células leucémicas (208). Además, en ese mismo estudio, los complejos metálicos fusionados al lapachol son más eficaces contra células de carcinoma ovárico o carcinoma de colon que contra células leucémicas. No obstante, los valores de IC50 obtenidos para esas líneas tumorales son menos potentes que las IC50 obtenidas para los complejos metálicos fusionados con chalconas y lapachol investigados en la línea celular HEL en el presente trabajo (209). Precisamente, se ha descrito que los compuestos metálicos de rodio tienen afinidad por JAK2, inhibiendo su actividad quinasa, su autofosforilación y generando citotoxicidad en las células HEL (210). También se sabe que los complejos metálicos fusionados a lapachol pueden inducir citotoxicidad mediante generación de estrés oxidativo (209). La línea celular de eritroleucemia (HEL) portadora de la mutación JAK2<sup>V617F</sup> representa un objetivo terapéutico válido para este tipo de compuestos híbridos novedosos. Este es un resultado interesante porque la génesis de NH BCR-ABL1 negativas (p. ej. policitemia vera) se asocia con la presencia de la mutación JAK2<sup>V617F</sup>, y estas son enfermedades con escasas

opciones terapéuticas selectivas, aplicándose quimioterapia convencional en la mayoría de los casos (6).

En segundo lugar, la quimioteca compuesta por compuestos espirodímeros incluye compuestos con actividad antileucémica poco eficaz, encontrándose las IC<sub>50</sub> más potentes de nuevo en la línea HEL JAK2<sup>V617F</sup>. Los compuestos con esqueletos tipo espiro han sido utilizados con frecuencia en la química médica para variar la tendencia predominante basada en el uso de estructuras planas, y así mejorar la traslación a la clínica. Aunque supone un mayor esfuerzo sintético, la presencia de estructuras espiro se relaciona con predicciones de potencia, selectividad, propiedades físico-químicas y perfiles fármaco-cinéticos mejorados (224). Sin embargo, los compuestos espiro pueden presentar limitaciones en la solubilidad o en la metabolización (224). En este sentido, es posible que estas cuestiones hayan influido en la baja actividad antitumoral detectada en el cribado de espirodímeros en células de NH. Además, los fármacos aprobados por la FDA con estructura espiro actúan sobre dianas con actividad biológica tipo antagonista del receptor de mineralocorticoides (spironolactona), antagonista del receptor de andrógenos (drospirenona) o agonista del receptor de glucocorticoides (amcinonide), entre otras. Estas actividades biológicas son necesarias en situaciones fisiológicas diversas como hiperaldosteronismo, síndrome asociado a menopausia, o dermatosis que responde a corticosteroides, que conllevan una importante desregulación hormonal, algo inusual en las NH (224). A pesar de ello, ciertos compuestos espiro conjugados con cetonas o lactonas muestran actividades antitumorales (en el rango  $\mu\text{M}$  alto) sobre células de LMC humanas, a la vez que inhiben la vía de señalización del factor nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) (225). Esto sugiere que la asociación con cetonas y lactonas podría mejorar la selectividad antileucémica de los compuestos espiro.

El cribado de la serie de derivados de la embelina, y en concreto del primer subgrupo cuyos compuestos están fusionados a núcleos tipo pirazol, contiene gran cantidad de productos activos frente a las células leucémicas analizadas, aunque con baja selectividad. Las estructuras tipo heterociclo nitrogenado tienen alta representación entre los fármacos disponibles, representando un 59% de los fármacos aprobados por la FDA (226). Por otro lado, los pirazoles también poseen actividades biológicas muy interesantes. Así, estos complejos estructurales tienen eficacia antitumoral frente a células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 (227) y se consideran inhibidores potentes del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) implicado en el adenocarcinoma de pulmón (228). Los resultados obtenidos del cribado de esta serie

química sobre las células humanas de NH se publicaron en un estudio más amplio donde también se investigó el efecto de los derivados de embelina con núcleo pirazólico en células de cáncer de mama (MCF7, SKBR o BT549) y su efecto citotóxico en células sanas (Vero), distinguiendo los compuestos que presentan selectividad antitumoral (211). En cambio, el cribado del segundo subgrupo de la serie química, que incluye derivados de embelina fusionados a núcleos de acridina, describe un grupo de compuestos con limitados efectos citotóxicos en las células de leucemia, con excepción de algunos compuestos eficaces en la línea de LMC (K562). Otros estudios realizados con compuestos tipo heterociclos fusionados a acridina muestran efectos citotóxicos limitados frente a células de leucemia como K562 o HL60, pero en cambio son eficaces en líneas de carcinoma de colon humano (HCT-116) (229). No obstante, también se han descrito derivados de acridina que producen inhibición de la viabilidad de células de leucemia promielocítica aguda (HL60) y alteración del ciclo celular de las mismas, mediante, presumiblemente, la inhibición de las topoisomerasas I y II (230).

El cribado de la última serie, formada por análogos del híbrido naftoquinona-cumarina generó una diversidad de resultados que incluyen compuestos con mayor eficacia antitumoral en ciertas líneas leucémicas que en otras (selectividad antileucémica), así como diferencias importantes en la relación estructura-actividad de los compuestos. Esto permitió realizar un estudio interdisciplinar para distinguir qué alteraciones estructurales del compuesto líder conducían a actividades biológicas anticancerígenas mejoradas. Además, los estudios computacionales de *docking score* o modelado molecular permitieron comparar la predicción de los valores de afinidad de unión del compuesto preseleccionado (JKST6) y del compuesto líder (NPQ-C6) hacia dianas relevantes en la patogenia de NH como son JAK2 o BCR-ABL1 (2, 17). Los valores de *docking score* y la predicción de los enlaces establecidos entre el JKST6 y JAK2 son semejantes a los del compuesto líder de la serie (NPQ-C6). En cambio, la predicción del modo de unión del JKST6 y BCR-ABL1 sugieren que la sustitución estructural del grupo cumarina del compuesto líder por el grupo pirona del JKST6 permite una introducción más profunda del compuesto en el sitio catalítico de ABL1 y, de este modo, se establecen mayor número de uniones enzima-ligando. Este fue un aspecto relevante que reforzó la selección del híbrido naftoquinona-pirona JKST6 para la continuación de los siguientes estudios.

En las últimas décadas, la modelización *in silico* de la absorción, distribución, metabolización y eliminación de los fármacos (ADME) como herramienta para el diseño

racional de fármacos ha captado la atención de la industria y de la academia en el ámbito de la farmacología. En concreto, suelen utilizarse en el cribado HTS reduciendo los costes y permitiendo estudiar en paralelo la actividad de los compuestos, así como su biodisponibilidad (198). De esta forma, se realizaron estudios ADME *in silico* del compuesto JKST6 para conocer los valores predictivos de sus propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas. Los resultados de este ensayo describen al compuesto JKST6 como un compuesto con potenciales propiedades farmacocinéticas interesantes que incluyen alta absorción oral, alta permeabilidad intestinal, alta superficie disponible para solvatación y relativa solubilidad acuosa. El ensayo predice que el JKST6 sufriría 3 reacciones metabólicas en el hígado una vez administrado, en un rango de 1 a 8. En cuanto a la unión del JKST6 a la albúmina sérica humana se encuentra un valor predictivo intermedio-bajo, que sugiere una baja afinidad por dianas *off-target* y una alta cantidad de fármaco libre en sangre, que históricamente se ha definido como la fracción del compuesto que desarrolla las propiedades farmacológicas. No obstante, este es un tema controvertido ya que otros estudios consideran que la unión de los fármacos a la albúmina podría facilitar su distribución sistémica (231). De manera adicional, se investigaron los parámetros de solubilidad y permeabilidad recogidos en las conocidas reglas de Lipinski, que definen moléculas con alta probabilidad de ser absorbidas por vía oral (masa molecular  $\leq 500$ ; Coeficiente de partición octanol/agua (CLogP)  $\leq 5$ ; número de donadores por puente de hidrógeno  $\leq 5$ ; número de aceptores por puente de hidrógeno  $\leq 10$ ). De nuevo, el compuesto JKST6 cumple todos los valores de referencia que definen a una molécula con características prometedoras para la absorción oral humana. En resumen, los resultados obtenidos de la investigación del JKST6 sobre la citotoxicidad en células humanas de NH, los valores de modelado molecular y ADME *in silico*, impulsaron la selección del híbrido naftoquinona-pirona JKST6 para el análisis en profundidad de sus dianas y mecanismos de acción moleculares.

Los derivados e híbridos de naftoquinonas han generado un gran interés como agentes terapéuticos prometedores contra el cáncer en los últimos años (170,176). En concreto, nuestro grupo de investigación ha descrito nuevos compuestos químicos tipo naftoquinona con alta eficacia antitumoral contra la LMC *in vitro* e *in vivo* (17, 22). Como se ha comentado, la forma de obtener compuestos químicos con actividades biológicas mejoradas supone la reiteración de estudios biológicos y computaciones (137), y en ese sentido, el compuesto JKST6 surge como un potencial candidato mejorado del compuesto líder naftoquinona-cumarina NPQ-C6 empleando esta estrategia.



Para comenzar el análisis de las propiedades antitumorales del compuesto JKST6 se consideraron dos aspectos cruciales presentes en los fármacos anticancerígenos eficaces: su capacidad antiproliferativa y su baja toxicidad. Por tanto, se investigaron los efectos antiproliferativos del JKST6 en células de NH humanas y en células sanas. Los resultados demostraron que el compuesto inhibe de manera eficaz el crecimiento de las células de leucemia (con valores de IC50 en el rango sub  $\mu\text{M}$  en el caso de K562 o de MOLM-13) mientras que los valores de IC50 en células humanas de tumores sólidos como BT-549, MDA-MB-231 o MCF7, son considerablemente más altos, confirmándose una mayor actividad antitumoral contra NH en comparación con otros tipos de tumores. Entre las leucemias investigadas, las células de LMC (K562) son las células de NH más sensibles al tratamiento con JKST6.

Además, el tratamiento con JKST6 no genera altos niveles de toxicidad en las células no-tumorales investigadas *in vitro*, encontrándose valores de IC50 en PBMC aproximadamente 8 veces más altos que en células de LMC (K562). Este resultado fue corroborado por la baja toxicidad detectada en los ensayos de toxicidad aguda y toxicidad sub-crónica del tratamiento con JKST6 *in vivo*. En el primer ensayo (toxicidad aguda) se eligieron las vías de administración oral e intraperitoneal, teniendo en cuenta los resultados ADME, y, ante la ausencia de diferencias significativas entre ambas, en el ensayo de toxicidad sub-crónica se utilizó la vía intraperitoneal para garantizar el acceso rápido a la circulación sistémica de manera directa (232).

Los resultados de los estudios de la viabilidad en células tumorales hematológicas y no hematológicas, así como de la toxicidad asociada al tratamiento con JKST6 sugieren que el producto podría unirse a dianas moleculares presentes en células cancerígenas derivadas del linaje mieloide, haciéndolas más sensibles al compuesto que células de otras leucemias o de cáncer no hematológico.

En base a los experimentos de análisis de imágenes a tiempo real y los ensayos de *wash-out* en células de LMC se deduce que el JKST6 desencadena una rápida actividad antiproliferativa y efectos antitumorales de larga duración tras una exposición corta, en contraste con el IM, que necesita tiempos más largos para desencadenar su actividad antiproliferativa. Estos hallazgos indican que el JKST6 posee un mecanismo de acción que provoca cambios duraderos en las células, que normalmente se asocian con uniones covalentes entre el ligando y la diana, largo tiempo de residencia del fármaco en la diana o efectos postraduccionales que ocurren tras la unión fármaco-diana (233,234).

Además, los estudios de fotomicroscopía a tiempo real revelaron que el JKST6 muestra un rango amplio entre las dosis que producen efectos citostáticos y las que producen efectos citotóxicos, lo que coincide con estudios publicados sobre la actividad antitumoral de las pironas, que poseen una actividad antiproliferativa superior a la citotóxica (235). Asimismo, la eficacia antitumoral del JKST6 se validó en esferoides de LMC. Este es un sistema de cultivo celular que trata de simular con mayor fidelidad la biología tumoral *in vivo*. De hecho, las diferencias entre los cultivos clásicos en monocapa 2D y los cultivos en 3D se han estudiado en profundidad, destacando las alteraciones en la transducción de señales, en la expresión de genes y proteínas, la diferenciación celular o la sensibilidad a los fármacos (146). También se ha observado que las células leucémicas son metabólicamente más estables en cultivos 3D que en los cultivos estándar 2D, donde tienden a sufrir cambios fenotípicos con los pases (236). Por lo tanto, el hecho de que el compuesto JKST6 inhiba el crecimiento de los esferoides de LMC *in vitro* puede considerarse una aproximación efectiva para explorar su potencial acción antitumoral *in vivo* (146).

Los derivados e híbridos de naftoquinonas inducen efectos antiproliferativos en células de LMC a través de distintos mecanismos que incluyen estrés oxidativo, parada del ciclo celular, inducción de apoptosis, inhibición de señalización BCR-ABL1/STAT5 y modulación de otras vías de señalización implicadas en supervivencia (70,71,170). De acuerdo con esto, nuestro grupo ha demostrado en trabajos previos que compuestos enriquecidos en quinonas suprimen el crecimiento de células de LMC produciendo parada del ciclo celular (73,74). Algunos ejemplos incluyen al derivado de naftoquinona CM363, que produce parada del ciclo celular con un aumento de células en la fase S (73) y el híbrido de naftoquinona-cumarina NPQ-C6, que produce un aumento de células en subG1 y una reducción importante en las fases G0/G1 (74). En el presente trabajo, demostramos que el compuesto JKST6 altera el ciclo celular de células de LMC aumentando la fase subG1 y reduciendo las fases G0/G1 de una forma dependiente de la dosis y del tiempo, con una mayor potencia que su precursor (NPQ-C6) (74). Es más, estos efectos se vieron asociados a cambios en la fosforilación o en la expresión de varias proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular. Así, el JKST6 inhibe la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (RB), impidiendo el avance del ciclo celular. Esta inhibición también suele relacionarse con la supresión del complejo ciclina D/Cdk4 (212). La reducción de la fosforilación de RB también se ha relacionado con la inhibición de la quinasa ABL1, que a su vez juega un papel en la progresión de la fase S del ciclo celular (213). Los

complejos formados por ciclina E-CDK2, ciclina A-CDK2 y ciclina B-CDK1 regulan la transición de la fase G1/S, el avance de la fase S y la transición de la fase G2/M, respectivamente (213). En esta línea, el tratamiento con JKST6 modifica estas ciclinas aumentando su expresión progresivamente y produce un incremento marcado de pCDK1<sup>Y15</sup> a 48 horas postratamiento. Esta fosforilación lleva a una inactivación de CDK1, que es controlada por el equilibrio entre Wee1 y Cdc25 (213). Precisamente, numerosos compuestos derivados de quinonas han sido descritos como inhibidores potentes de Cdc25 (70, 231). La inhibición de Cdc25 impide su actividad fosfatasa, responsable de activar a CDK1 eliminando la fosforilación bloqueante en Y<sup>15</sup>. Además, se ha demostrado que la fosforilación de Wee1 en S<sup>642</sup> puede ser dependiente de AKT, que en ese caso, conduce a un cambio en la localización de Wee1 hacia el citoplasma impidiendo la inactivación de CDK1 en el núcleo, e induciendo la progresión de G2/M (237). No obstante, también se ha descrito que la proteína Chk1 controla los niveles de Cdc25 y Wee1 en núcleo y citosol. En concreto, Chk1 fosforila a Wee1 en S<sup>642</sup>, produciendo su traslocación al núcleo y la consecuente retención del ciclo en la fase G2 (238). En esta línea, el tratamiento con JKST6 induce la fosforilación transitoria de Wee1 en S<sup>642</sup> lo que sugiere una asociación con los estados de CDK1 activos e inactivos detectados en los estudios de inmunoblot. El tratamiento con JKST6 también produce la inhibición de la fosforilación de la histona 3 en Serina 10 (pH 3<sup>S10</sup>), que se considera necesaria para una ejecución correcta de la mitosis (215). En este grupo de experimentos, se detectó la inducción de un regulador negativo del avance de la fase G1 a G2, p21, tras el tratamiento con JKST6. Este efecto ya ha sido descrito en experimentos realizados con otras naftoquinonas como la shikonina o la plumbagina en células leucémicas (173,174).

Por otro lado, el compuesto estimuló marcadamente la fosforilación de las quinasas (pChk1<sup>S296</sup> y pChk2<sup>T68</sup>) que actúan *downstream* de la vía *ATM/ATR-dependent DNA damage checkpoint* poco tiempo después del tratamiento, lo que sugiere que el tratamiento con JKST6 puede inducir daño genómico de forma temprana y potente (239). Esta propiedad ha sido descrita con anterioridad en investigaciones con naftoquinonas y con pironas como agentes antitumorales (170,240). Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que el compuesto JKST6 evita la progresión del ciclo celular produciendo una parada en la fase subG1 y activando alteraciones en la mitosis, efectos que podrían ser causados, al menos en parte, por daño en el ADN celular.

Las células cancerígenas poseen la habilidad de evadir la inducción de la apoptosis para aumentar su supervivencia, por tanto, la regulación de la apoptosis es un objetivo

primordial en la búsqueda de un fármaco antitumoral. En este sentido, el compuesto JKST6 induce apoptosis en células K562 según los resultados de medición de Anexina V, de núcleos apoptóticos y de activación de caspasas-8, 9 y 3, así como el corte de PARP. También otros estudios describen la capacidad de los derivados e híbridos de naftoquinona de inducir apoptosis en células de LMC a través de la activación de la vía intrínseca dependiente de la mitocondria (73,74,173), que implica la activación de las caspasas 9 y 3. Sin embargo, la activación de la caspasa 8 o apoptosis extrínseca, también se ha relacionado con la inducción de apoptosis por parte de naftoquinonas en células leucémicas humanas (241). Un resultado *a priori* contradictorio fue el aumento de los niveles de la proteína antiapoptótica Mcl-1 tras el tratamiento con JKST6, sin embargo, este es un efecto que se ha observado anteriormente en células de leucemia mieloide como respuesta a ciertos quimioterápicos (242). La sobreexpresión de Mcl-1 también se ha relacionado con la generación de resistencia a fármacos antitumorales, considerándose una diana de interés, pero conviene tener en cuenta que también posee funciones no apoptóticas que participan en la homeostasis y en la función bioenergética mitocondrial, en la autofagia o en el ciclo celular (243). Por otro lado, también se detectó un rápido incremento de los niveles de  $\gamma$ H2AX tras la exposición a JKST6, lo que refuerza la hipótesis de que el compuesto causa daño al ADN que, al no ser reparado por las células de LMC, lleva a la inducción de la apoptosis.

Debido a la importancia central que tiene la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 en la supervivencia de células de LMC, tiene sentido que los compuestos derivados e híbridos de naftoquinonas capaces de alterar el ciclo celular y activar la apoptosis en estas células, actúen modulando esta ruta celular (73,74). Normalmente, esta modulación se trata de una inhibición significativa de la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5. De igual modo, el compuesto JKST6 provoca una reducción rápida de la fosforilación de BCR-ABL1 ( $p^{Y412}$  y  $p^{Y177}$ ) en células de LMC, que puede explicarse por una reducción paralela de sus niveles proteicos totales. Estas respuestas rápidas suelen asociarse con eventos postraduccionales, normalmente regulados por unión con ubiquitina y la activación del proteasoma (244). De hecho, un efecto común frente a fármacos que alteran el ciclo de la ubiquitina en la LMC es la reducción rápida de los niveles proteicos de BCR-ABL1 (245,246). En este sentido, la reducción de los niveles de proteína de BCR-ABL1 por el JKST6 es precedida de un aumento en los niveles de proteínas poliubiquitinadas. Además, la inhibición previa del proteasoma por MG132 (217) seguida del tratamiento con JKST6, evita de parcialmente la reducción de los

niveles de BCR-ABL1 inducida por el híbrido naftoquinona-pirona y provoca un aumento de proteínas poliubiquitinadas tras una hora de tratamiento. Estos hallazgos sugieren que la activación del proteasoma podría contribuir, al menos en parte, a los efectos inhibitorios del JKST6 sobre BCR-ABL1 en células de LMC.

La reducción de los niveles proteicos de BCR-ABL1 tras la exposición a JKST6 es anterior en el tiempo a la disminución de los niveles de ARNm de *BCR-ABL1*, lo cual sugiere que la degradación proteica precede a la inhibición de la transcripción génica de la oncoquinasa. Aunque serían necesarios más experimentos para aclarar qué mecanismos transcripcionales y postraduccionales están implicados en los efectos observados, los compuestos que causan alteraciones en el ciclo de la ubiquitina se consideran una aproximación eficaz para reducir los niveles de BCR-ABL1 y activar la muerte celular incluso en células de LMC resistentes a IM (245).

La determinación de los efectos funcionales del tratamiento con JKST6 en células de LMC es de gran importancia porque revela si la inhibición se limita a la oncoquinasa o si es efectiva también en sus dianas *downstream* pro-tumorales. En concreto, la potente inhibición de pSTAT5<sup>Y694</sup> es probablemente corresponsable de los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos que ejerce este compuesto, debido al papel vital del factor de transcripción en la transformación celular, la supervivencia y el crecimiento de este tipo de cáncer (59). El compuesto JKST6 también muestra efectos funcionales importantes que se infieren de la inhibición de pCrkL<sup>Y207</sup> y de los genes diana de STAT5, como *PIM1* y *MYC*. Este resultado es determinante ya que se ha descrito que c-MYC y BCR-ABL1 pueden activarse mutuamente; MYC participa en la transformación celular, la inestabilidad genómica y el bloqueo de la diferenciación celular, por lo tanto, favorece una mala respuesta al tratamiento con IM y una mayor agresividad de la enfermedad (71,115). Es más, la inhibición de c-MYC causada por derivados e híbridos de naftoquinona se ha relacionado directamente con la activación de la apoptosis en LMC (73,74,247). Por su parte, PIM1 también es sobreactivada por la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 y tiene funciones cruciales en supervivencia, transformación y protección frente a la apoptosis causada por daño en el ADN (248). De igual modo, la inhibición de PIM1 se ha descrito como un evento común y determinante en las actividades anti-LMC de los compuestos derivados e híbridos de naftoquinonas (70,71). Adicionalmente, se investigó si el producto JKST6 podía modular la actividad transcripcional dependiente de STAT utilizando células transfectadas con el *reporter gene* de luciferasa bajo promotores dependientes de STAT5 y STAT3. Efectivamente, el tratamiento con JKST6 inhibe

eficazmente la transcripción dependiente de IL3/JAK2/STAT5, y con menor potencia de IL6/JAK/STAT3. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el JKST6 inhibe la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 como parte de sus propiedades anti-LMC tanto a nivel transcripcional como proteico.

BCR-ABL1 ejerce actividad pro-leucémica mediante la modulación de otras vías de señalización de supervivencia como son PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK (51,56) y también Hck (de la familia de quinasas Src) que fosforila a STAT5 en Y<sup>694</sup> en este contexto tumoral (68). En nuestros experimentos, el tratamiento con JKST6 causa una activación transitoria de pSrc<sup>Y416</sup> a tiempos cortos para finalmente inhibir completamente su fosforilación tras 12 horas de tratamiento. Esta supresión es interesante por la implicación que tiene la señalización desregulada de Src en la progresión de la LMC y en la resistencia a TKIs. De hecho, la quinasa Lyn muestra funciones reguladoras de la sensibilidad a IM, y se ha encontrado constitutivamente activa en pacientes que no poseen mutaciones en BCR-ABL1 (57). No obstante, también se ha descrito que las proteínas Hck y v-Src retienen a STAT5A en el citoplasma de células BCR-ABL1+, evitando su función activadora de la transcripción oncogénica. Por esta razón, y por los escasos resultados generados en clínica de otros inhibidores de las quinasas de la familia Src (bosutinib y dasatinib), la inhibición de las quinasas de la familia de Src sigue siendo objeto de debate (60).

La modulación farmacológica de la vía RAS/MAPK en la LMC ha sido extensamente estudiada. La activación de la vía ERK1/2 por BCR-ABL1 se asocia a un incremento de proliferación y supervivencia celular, además de su participación en la autofagia y en la traducción del ARNm (78). Además, se ha descrito la sobreexpresión de ERK1/2 en células madre transformadas por BCR-ABL1+ (249). De hecho, la inhibición de ERK1/2 se ha asociado con una potenciación de la inducción de apoptosis en células K562 (250). En cambio, la inducción de JNK y de p38-MAPK se relaciona con efectos pro-apoptóticos en células de LMC. En la mayoría de los casos BCR-ABL1 ejerce una acción supresora de la actividad de p38-MAPK (78). No obstante, la relación entre la acción pro- y antiapoptótica de p38-MAPK depende del tipo celular y de los estímulos. Además, p38-MAPK también participa en otras funciones como la diferenciación y la inflamación celular (78). La relación entre BCR-ABL1 y JNK no ha sido investigada en tanta profundidad, pero se sabe que tal como ocurre con p38-MAPK, la activación constitutiva de BCR-ABL1 inhibe la señalización de JNK. También se ha descrito que JNK media en la señalización pro-apoptótica de fármacos como la shikonina, la ceramida

o el trióxido de arsénico en células BCR-ABL1+ (78). Los resultados del análisis de RAS/MAPK en células de LMC expuestas a JKST6 revelan que el producto induce la activación transitoria de JNK, la inhibición de la fosforilación de p38-MAPK a tiempos largos y la activación estable de la fosforilación de ERK1/2. La activación de ERK1/2 por el compuesto híbrido naftoquinona-pirona fue un hallazgo inesperado, pues otros derivados de naftoquinona inhiben la activación de ERK1/2 de forma paralela a sus acciones antiproliferativas en células de LMC (73,74,173). Sin embargo, también hay estudios que relacionan la inducción de pERK1/2<sup>T202/Y204</sup> con la activación de apoptosis en células de leucemia humanas, y además dicha activación tiene un papel fundamental en la respuesta pro-apoptótica (251). En este sentido, la activación de ERK1/2 coincide con nuestros resultados, aunque no podemos determinar si tiene una participación directa en la muerte celular provocada por JKST6. Por el contrario, la estimulación transitoria de JNK y la inhibición de pP38MAPK<sup>T180/Y182</sup> son efectos anteriormente descritos en asociación a los efectos antiproliferativos de los derivados e híbridos de naftoquinonas en LMC (73,74).

En células de LMC, el complejo BCR-ABL1/GRB-2 recluta y estimula a PI3K, que a continuación activa a AKT y a mTOR, promoviendo el crecimiento y la supervivencia celular (53). La señalización de mTOR controla la traducción del ARNm a través de sus efectores *downstream*, como la proteína ribosomal S6 (53). La activación constitutiva de mTOR, que es frecuente en diversos tumores, puede reducir la señalización *upstream* de receptores con actividad tirosina quinasa como por ejemplo *Insulin-like growth factor I receptor* (IGF-IR), generando una reducción de la actividad de AKT como parte de este *feedback* negativo (252). En este contexto, el tratamiento de las células de LMC con JKST6 inhibe de forma rápida y potente la fosforilación de S6 y aumenta los niveles de pAKT<sup>T308/S473</sup> de forma transitoria. Estos efectos podrían deberse a que el compuesto bloquea la actividad de mTOR, por lo que se pierde dicho *feedback* o mecanismo de control negativo, resultando en una activación transitoria de AKT. La inhibición conjunta de mTOR y BCR-ABL1 es una opción de tratamiento que ha generado un creciente interés. Se ha descrito que la rapamicina, un antibiótico tipo macrólido que inhibe el complejo I de mTOR (mTORC1), produce sinergia con el IM *in vitro* e *in vivo* potenciando la inhibición de la traducción proteica (53). No obstante, para saber si el compuesto JKST6 ejerce efectos similares a la rapamicina en la LMC, y si es importante en su mecanismo de acción molecular, se necesitan más experimentos.

Entre los principales obstáculos que afronta la terapia frente a la LMC basada en TKI está la imposibilidad de curación, y por consiguiente, la necesidad de tomar el tratamiento de forma crónica, lo que lleva a altos costes económicos, intolerancia a los TKI y resistencia (81). Por tanto, un objetivo principal de esta investigación fue descubrir si el JKST6 posee la capacidad de potenciar los efectos del IM y superar la resistencia al tratamiento. En primer lugar, los estudios de combinación de fármacos en células de LMC (K562) revelaron que el compuesto JKST6 actúa sinérgicamente con el IM en la inhibición de la proliferación celular y de la activación de STAT5. Este resultado es prometedor porque supone una oportunidad para reducir las dosis efectivas del IM y, por tanto, la posibilidad de desarrollar resistencia o toxicidad a largo plazo (205).

En segundo lugar, se analizó el efecto de factores extrínsecos que influyen en la resistencia al IM para determinar si producían resistencia al JKST6 en células de LMC. En concreto, se utilizaron células estromales componentes del nicho tumoral (MSC), procedentes de médula ósea e inmortalizadas con la subunidad catalítica de la telomerasa (hMSC-TERT) (53,102,123). Las células de LMC no experimentaron cambios apreciables cuando fueron expuestas al MC generado por hMSC-TERT, más allá de una moderada ventaja en el tiempo de duplicación celular (*doubling time*). Esta exposición, tampoco generó cambios apreciables en la sensibilidad de las células de LMC al tratamiento con JKST6 o IM. El hecho de que las células mesenquimales utilizadas (hMSC-TERT) sean células de origen no-maligno (206), que no han estado previamente en contacto con células leucémicas podría ser una explicación a la falta de respuesta protectora por parte del MC. En este sentido, varios estudios que describen el efecto protector del MC frente al tratamiento con TKI utilizan MSC de pacientes de LMC (125). Otros estudios han demostrado que la interacción de las células leucémicas y las células del estroma es necesaria para generar una señalización pro-oncogénica mediada por factores (219,253). No obstante, también se han detectado líneas de MSC de la médula ósea que, sin previa interacción con las células leucémicas, son capaces de generar MC protector (HS-5) frente al tratamiento de los TKI, y otras líneas de MSC (HS-23 o HS-27a) cuyo MC no es protector (131). La diferencia observada entre las líneas MSC reside en el tipo de factores secretados al medio, considerándose con propiedades protectoras al tratamiento con TKI: IL-6, IL-8, IL-7, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (125,131). Por las razones comentadas anteriormente, se comprobó en primer lugar si la interacción entre las células hMSC-TERT y las células de LMC ofrecía protección frente



a los tratamientos con JKST6 e IM. En este caso, se produce un aumento de la IC50 del JKST6 de aproximadamente el doble, mientras que el IM aumenta su IC50 de manera limitada. No obstante, ambos compuestos mantienen un efecto antitumoral efectivo sobre las células de LMC. Esta diferencia podría ser consecuencia de una limitación por parte del JKST6 para acceder a las células leucémicas. Se ha descrito que el propio soporte físico que proporcionan las células MSC dificulta el acceso de los fármacos a sus dianas (254). En este sentido, aún no se han realizado experimentos de bio-disponibilidad y farmacocinética del JKST6, por lo que su solubilidad y permeabilidad podría ser mejorada en futuros estudios. Por otro lado, la estimulación del co-cultivo entre hMSC-TERT y las células de LMC con un factor protector como GM-CSF produce un aumento en las IC50 del JKST6 y del IM de casi el doble, por tanto, se puede decir que genera una protección moderada de las células de LMC ante ambos tratamientos, sin embargo, las IC50 mantienen sus valores en un rango de concentración eficaz. Investigaciones previas han descrito que la citoquina GM-CSF evita la inducción de apoptosis en células de leucemia mieloide tratadas con quimioterápicos convencionales (p. ej. vincristina, ciclohexamida o adriamicina) (255). En otro estudio interesante identifican altos niveles de GM-CSF en el medio de células de LMC resistentes a TKI, y la adición de este medio condicionado a células de LMC sensibles a IM genera protección frente a la muerte celular activada por el tratamiento. En este caso, el incremento de GM-CSF conduce a la señalización exacerbada de JAK2/STAT5, y la inhibición de JAK2 en combinación con TKI revierte el efecto protector de GM-CSF (126). El papel de las MSC sobre la progresión del tumor sigue generando resultados controvertidos, ya que se ha identificado su influencia promotora, pero también inhibitoria del crecimiento tumoral (221,256). En parte se debe a que, en el microambiente tumoral, se generan mediadores proinflamatorios que interfieren en la progresión del cáncer, en ocasiones hacia un fenotipo pro-tumoral (incremento de angiogénesis, evasión de la respuesta inmune, etc.) y en otras hacia un fenotipo anti-tumoral (activación de linfocitos T, reclutamiento de granulocitos, etc.) (221). El estudio del efecto de la estimulación proinflamatoria (LPS) sobre el co-cultivo de células de LMC y hMSC-TERT generó resultados interesantes. En estas condiciones, se produce un aumento de aproximadamente el doble en el valor de IC50 de los tratamientos con IM y JKST6. Adicionalmente, a diferencia de los experimentos anteriores, el crecimiento total de las células de LMC (confluencia) tratadas con vehículo se ve reducido en torno a un 35-40% en relación con los experimentos de co-cultivo no estimulado, lo que indica que existe algún mecanismo que altera el crecimiento de las

células leucémicas en estas condiciones. En línea con esto, en un estudio que investiga el efecto de MSC de pacientes de LMC en BP sobre el crecimiento y la sensibilidad de las células K562 se describe una inhibición del crecimiento leucémico, inducción de resistencia parcial al tratamiento con daunorrubicina, que se relaciona con una parada del ciclo celular en fase G0/G1 y reducción de la fase S (256). Por tanto, los efectos generadores de quiescencia y resistencia parcial en células de LMC deben de ser considerados para evitar la generación de la enfermedad mínima residual, y según lo comentado, una posible solución es la combinación de fármacos con múltiples dianas que repriman la señalización pro-supervivencia activada de manera compensatoria en el nicho tumoral.

Por último, se investigó la capacidad antitumoral del compuesto JKST6 frente a células de LMC que presentan resistencia a IM mediante diversos mecanismos moleculares descritos en la clínica. Los resultados mostraron que el JKST6 es muy efectivo en células resistentes a IM como AR230-R y K562-R, donde la resistencia a IM está asociada a una mayor expresión de BCR-ABL1 (103) o a la sobreexpresión de la familia de quinasas Src (115), respectivamente. Igualmente, el compuesto JKST6 es eficiente en células K562mycT315I, cuya resistencia se debe a la conocida mutación puntual del residuo *gatekeeper* de BCR-ABL1 (101). Es importante destacar que esta mutación confiere resistencia también a otros inhibidores de BCR-ABL1 de segunda generación como dasatinib o nilotinib (257), lo cual sugiere que el JKST6 podría ser también eficaz contra la resistencia frente a otros TKI.

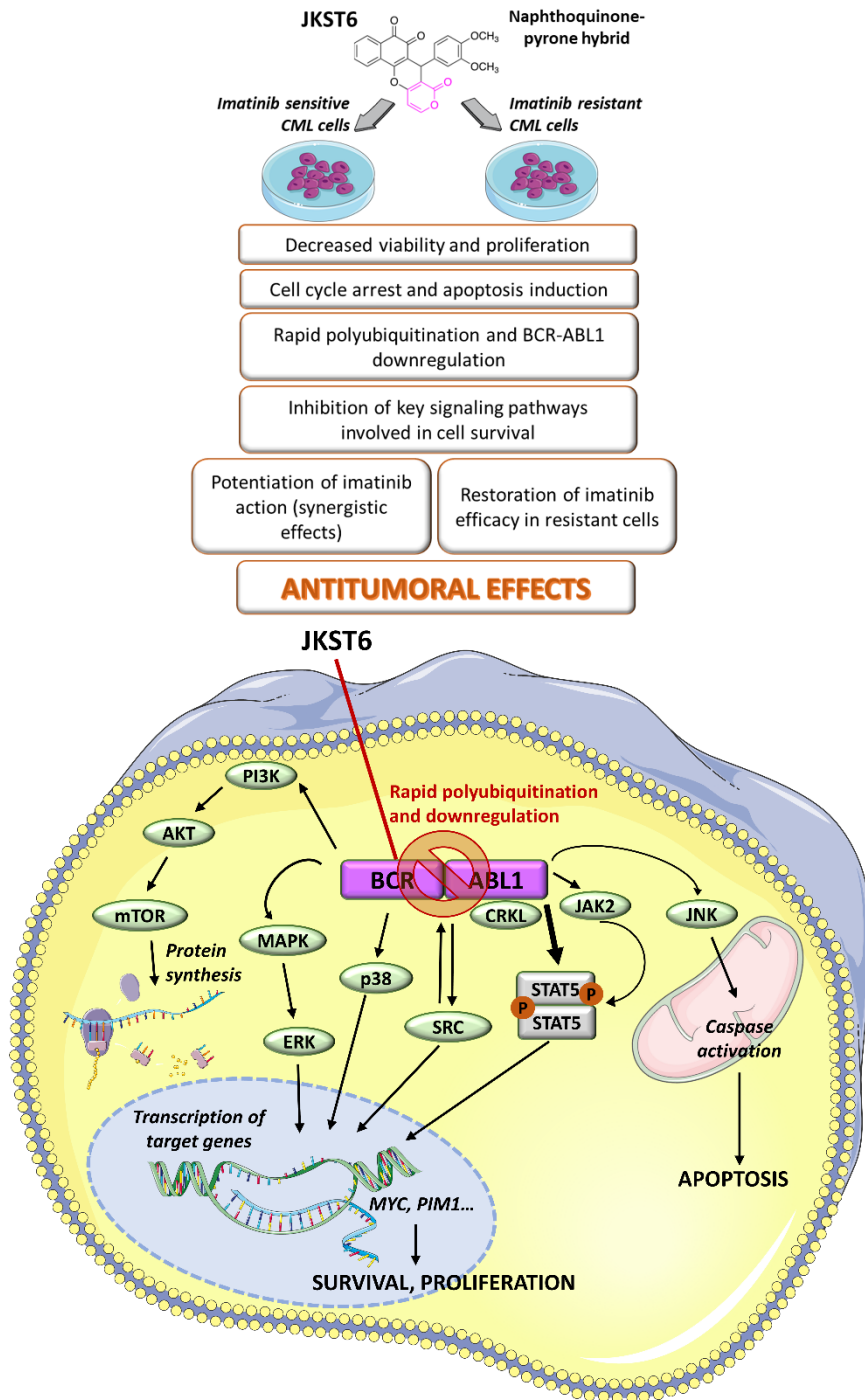
Asimismo, se demostró que el compuesto JKST6 mantiene su mecanismo modulador de la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 cuya hiperactivación es incluso más marcada en casos de resistencia y progresión de la enfermedad (18,36,128). Este resultado sugiere que el tratamiento con JKST6 puede ser aplicado de manera eficiente en contextos de resistencia a IM previamente establecidos. El tratamiento con JKST6 en células de LMC resistentes a IM también produce efectos supresores en los niveles de expresión de los oncogenes *MYC* y *PIMI* (59). Este es un efecto destacable, ya que se ha descrito que la sobreexpresión de *MYC* en pacientes de LMC se asocia con una mala respuesta a IM y además, se sabe que *MYC* induce la replicación aberrante de ADN contribuyendo a la inestabilidad genética detectada en la progresión de la LMC (117). Es más, la trisomía del cromosoma 8 que conlleva sobreexpresión de *MYC* es una de las aberraciones cromosómicas considerada un factor de alto riesgo por su asociación con mala respuesta al tratamiento con TKI por la ELN (35).

Por otro lado, SOCS2 es un conocido regulador negativo de la vía JAK/STAT con actividad ubiquitina ligasa (258). Según experimentos *in vitro*, las líneas celulares que expresan BCR-ABL1 se asocian con niveles más altos de expresión de SOCS2 que las líneas celulares equivalentes BCR-ABL1(-). Esto ha sido confirmado también por la detección de mayores niveles de SOCS2 en leucocitos y células CD34+ de pacientes de LMC en comparación con los niveles hallados en personas sanas, siendo incluso más altos en pacientes de LMC en BP (222,223). Con respecto a esto, se realizaron experimentos para determinar el efecto del JKST6 sobre la expresión génica de SOCS2 en células de LMC sensibles y resistentes a IM. Los resultados muestran mayores niveles basales de SOCS2 en células de LMC resistentes que en células de LMC sensibles a IM. Esto coincide con otros estudios que han encontrado niveles incrementados de SOCS2 en pacientes con mala respuesta o recidiva al IM (259). Adicionalmente, encontramos que el IM producía una reducción de los niveles de expresión de SOCS2 en ambos clones, sensible y resistente. Esto concuerda con los otros estudios que detectan una inhibición de la expresión de SOCS2 por parte del IM en presencia de BCR-ABL1, aunque la reducción en las células resistentes es menos evidente (223). En cambio, el JKST6 estimula la expresión de SOCS2 tras 6 horas de tratamiento en células K562-R y K562, aunque sus niveles de ARNm vuelven al valor inicial tras 12 horas de tratamiento. Dicho pico de expresión podría contribuir a regular negativamente la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 en estas células. De hecho, se ha demostrado que la expresión ectópica de SOCS2 en células BCR-ABL1 + reduce la velocidad de crecimiento, la capacidad clonal y mejora la sensibilidad al IM de las células leucémicas (223). El papel de SOCS2 en la resistencia y progresión de la LMC sigue siendo objeto de investigación por las incógnitas que siguen existiendo al respecto, pero se cree que los altos niveles de SOCS2 encontrados en células y pacientes con resistencia o mala respuesta al IM podrían deberse a un mal funcionamiento de un *feedback* negativo activado para compensar las acciones pro-oncogénicas promovidas por BCR-ABL1. Por lo que, más que un causante de un fenotipo agresivo de la LMC, sería una consecuencia de un intento fallido de controlar negativamente a BCR-ABL1 (222,223). Además, nosotros proponemos que SOCS2 podría tener relación con la ubiquitinación de BCR-ABL1 detectada tras el tratamiento con JKST6. De hecho, la familia SOCS participa activamente en la degradación vía proteasoma de dianas proteicas como JAK2 y TEL-JAK2 (SOCS1) y los receptores de eritropoyetina o de la hormona de crecimiento (SOCS2) (260). Esta es una posibilidad que tendría que ser estudiada en mayor profundidad para ser comprobada.

Por último, una breve exposición de las células resistentes a IM (AR230-R) al JKST6 fue suficiente para restaurar la sensibilidad al tratamiento con IM. Este es un hallazgo importante, ya que el mecanismo de resistencia de estas células se relaciona con la sobreexpresión de BCR-ABL1, mecanismo observado en pacientes que muestran resistencia y progresión de la LMC (18). Es probable que el efecto reductor de los niveles de BCR-ABL1 dependiente de JKST6 contribuya a la efectividad del tratamiento posterior con IM.

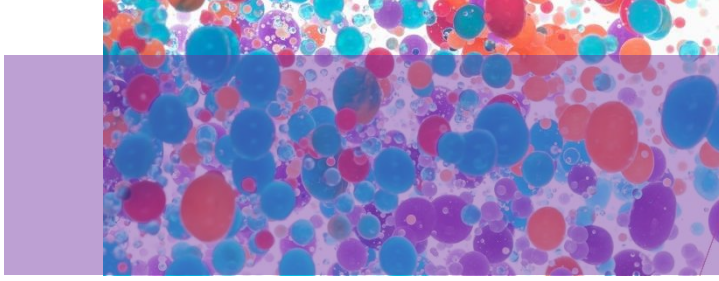
En resumen, el compuesto JKST6 reúne una serie de propiedades que lo convierten en un candidato interesante para superar las limitaciones actuales en la terapia contra la LMC. En primer lugar, el JKST6 reduce BCR-ABL1, evitando no sólo su activación constitutiva sino su función como proteína de andamiaje, de la que depende la activación de numerosas vías de supervivencia alternativas. En segundo lugar, la eficacia del JKST6 se mantiene en células resistentes al IM debido a mecanismos dependientes e independientes de BCR-ABL1. En tercer lugar, el compuesto potencia los efectos antitumorales del IM, lo que sugiere que podría ser utilizado en terapias combinadas con TKIs en el tratamiento de la LMC (261) (**Figura 84**).

## JKST6, a novel multikinase modulator of the BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway in CML



**Figura 84. Mecanismo molecular del modulador multiquinasa JKST6 en la LMC.** El híbrido naftoquinona-pirona JKST6 reduce la viabilidad y proliferación de células de LMC sensibles y resistentes a IM, produce parada del ciclo celular e inducción de apoptosis, inhibe la vía de señalización BCR-ABL1/STAT5 mediante reducción de la oncoproteína, modula vías de supervivencia alternativas, potencia los efectos del Imatinib (IM) y restaura la sensibilidad al IM en células resistentes. Adaptada de Aranda Tavío *et al.* 2021 (261).





## **VII. CONCLUSIONES**





## VII. CONCLUSIONES

- 1) El cribado fenotípico de aproximadamente 200 nuevos compuestos de pequeño tamaño molecular permitió la selección de híbridos de naftoquinonas con una relación estructura-actividad antitumoral favorable.
- 2) La sustitución de la cumarina por una pirona en la serie de análogos del híbrido naftoquinona-cumarina generó el JKST6, un compuesto con elevada potencia antitumoral en células de origen hematológico.
- 3) El estudio *in silico* ADME, indica que el JKST6 ofrece unas propiedades fisicoquímicas y de biodisponibilidad, incluyendo la “regla de 5” de Lipinski, óptimas para su evaluación preclínica.
- 4) Los ensayos *in silico* de modelado molecular, indican que el JKST6 interacciona, con unos valores de *docking* óptimos, con las proteínas BCR-ABL1 y JAK2, dos tirosina quinasas muy relevantes en la carcinogénesis de las neoplasias hematológicas, siendo la primera esencial en la aparición de la leucemia mieloide crónica (LMC).
- 5) Los estudios de citotoxicidad *in vitro* y de toxicidad aguda/sub-crónica *in vivo*, indican que el JKST6 es un compuesto inocuo en PBMC humanos y de ratones, respectivamente. Además, no altera de forma apreciable el comportamiento y el sistema nervioso de los ratones.
- 6) A diferencia del imatinib (IM), la exposición corta al JKST6 provoca efectos antiproliferativos rápidos y de larga duración en células de LMC en crecimiento 2D.
- 7) El JKST6 inhibe el crecimiento de células de LMC en esferoides (3D). Esto demuestra que la eficacia antitumoral del producto se mantiene en un contexto biológico más complejo, asimilable al de un tumor *in vivo*.
- 8) El mecanismo por el cual el JKST6 causa una inhibición de la proliferación/crecimiento de células LMC conlleva una parada del ciclo celular en fase G0/G1, un incremento del nivel de células en fase sub-G1, unido a la

## VII. CONCLUSIONES

activación de supresores tumorales que actúan en G1 (RB y p21) y a cambios en proteínas relevantes para la mitosis (H3 S<sup>10</sup>, Wee1 S<sup>642</sup>, pCDK1 Y<sup>15</sup>).

- 9) La potente activación de las quinasas encargadas de parar el ciclo celular para facilitar la reparación del ADN (Chk1 y Chk2), y la fosforilación del marcador de rotura del ADN (histona H2AX) en células de LMC tratadas con JKST6, sugieren que el daño genómico es parte relevante del mecanismo antitumoral del producto.
- 10) La apoptosis contribuye al mecanismo antitumoral del JKST6 en células de LMC. Esto se evidenció por el aumento de la proteólisis de PARP, de la actividad de la Anexina V y de los cuerpos apoptóticos. El incremento de la fragmentación y de las actividades de las caspasas demuestra que el JKST6 desencadena la muerte de la célula tumoral tanto por vía intrínseca (caspasas 9 y 3), como extrínseca (caspasas 8 y 3).
- 11) El JKST6 induce una poliubiquitinación rápida y transitoria, junto a la reducción del nivel de BCR-ABL1, seguido de una inhibición de sus niveles de ARNm. Además, en contraste con el IM, el JKST6 induce un aumento de los niveles de expresión del gen *SOCS2*, regulador negativo de BCR-ABL1/STAT5 con actividad ubiquitina ligasa. Estas observaciones sugieren que, desde tiempos cortos, la actividad proteolítica del proteasoma podría estar implicada en el mecanismo de acción antitumoral del JKST6.
- 12) El JKST6 provoca una inhibición de la actividad constitutiva de BCR-ABL1/STAT5, y del nivel de expresión de proteínas diana de esta vía de señalización (CrkL, c-MYC, PIM1), esenciales para la supervivencia y progresión maligna de las células tumorales.
- 13) El JKST6 inhibe la transcripción dependiente de STAT5 y STAT3 inducida por las citoquinas IL-3 e IL-6, respectivamente. Esto indica que la inhibición de la expresión de genes regulados por STAT5 y STAT3 es un elemento importante del mecanismo de acción antitumoral del JKST6, potencialmente eficaz para prevenir la resistencia y el fenotipo agresivo en la LMC.

## VII. CONCLUSIONES

- 14) El microambiente celular enriquecido en células mesenquimales de médula ósea (MSC) y citoquinas tipo GM-CSF reduce moderadamente la potencia antiproliferativa del IM y del JKST6. Esto sugiere que un aumento de la activación de STAT5 podría contribuir a la resistencia celular al tratamiento. Por el contrario, la activación de receptores TLR4 inhibe el crecimiento de las células de LMC en presencia de MSC, lo cual sugiere la activación de un fenotipo “quiescente” o diferenciado que retarda la proliferación de las células leucémicas.
- 15) El JKST6 es un modulador multiquinasa como se refleja en su capacidad para afectar a otras vías de señalización que, como BCR-ABL1/STAT5, influyen en la supervivencia (ERK1/2, AKT, JNK, p38-MAPK) o la síntesis de proteínas (S6) en las células de LMC.
- 16) La actividad multiquinasa del JKST6 permite desarrollar estrategias terapéuticas combinatorias como demuestra su capacidad para potenciar la actividad antitumoral del IM.
- 17) El JKST6 mantiene su eficacia antitumoral en células de LMC resistentes al IM. Concretamente, en resistencias asociadas a la sobreexpresión de las proteínas tirosina quinasa Lyn (K562-R) o BCR-ABL1 (AR230-R), o la mutación BCR-ABL1 (KmycBT315I) que impide la unión del IM.
- 18) El JKST6 recupera la potencia antitumoral del IM en células con resistencia asociada a la sobreexpresión de BCR-ABL1 (AR230-R), probablemente por una reducción de los niveles de la oncoproteína. Esa propiedad permitiría recuperar el tratamiento convencional en aquellos pacientes que hayan desarrollado resistencia al IM u otros inhibidores directos de BCR-ABL1.

En resumen, esta tesis proporciona múltiples evidencias preclínicas para el desarrollo racional de compuestos de pequeño tamaño molecular, alternativas o complementarias a la terapia convencional en LMC. Además, pone de manifiesto que la reducción de la oncoquinasa BCR-ABL1, que modula diversas vías pro-oncogénicas, puede ser una estrategia altamente eficaz como variante a la inhibición específica de su

## VII. CONCLUSIONES

dominio catalítico. Especialmente en aquellos pacientes que hayan desarrollado intolerancia o resistencia al IM, situación que imposibilita la remisión de la enfermedad.

## VII. CONCLUSIONS

- 1) The phenotypic screening of approximately 200 new compounds of small molecular size allowed the selection of naphthoquinone-hybrids with advantageous structure-activity relationship.
- 2) The substitution of the coumarin group by a pyrone in the chemical library of naphthoquinone-coumarin hybrid analogues produced the JKST6, a compound with high antitumor potency in hematological cells.
- 3) The *in silico* ADME study indicates that JKST6 offers optimal physicochemical and bioavailability properties, including the Lipinski's rule of five, to be preclinically evaluated.
- 4) The *in silico* molecular docking assays indicate that JKST6 interacts with appropriate docking score values with BCR-ABL1 and JAK2 proteins, two relevant tyrosine kinases in the carcinogenesis of hematological neoplasms, the former being essential in the generation of chronic myeloid leukemia (CML).
- 5) The *in vitro* (cytotoxicity) and the *in vivo* (acute/sub-chronic toxicity) assays indicate that JKST6 is a harmless compound in human and mice PBMCs, respectively. Furthermore, it does not appreciably alter the behavior and nervous system of the mice.
- 6) In contrast to IM, the short exposition to JKST6 provokes rapid and long-lasting antiproliferative effects in CML cells grown in 2D cultures.
- 7) JKST6 inhibits the growth of CML cells in spheroids (3D). This demonstrates the antitumoral efficacy of the product is maintained in a more complex biological context, resembling a tumor *in vivo*.
- 8) The mechanism by which JKST6 causes inhibition of CML cell proliferation/growth involves cell cycle arrest in G0/G1 phase, an increase in the level of cells in sub-G1 phase, together with activation of G1-acting tumor suppressors such as RB and p21, and changes in mitosis-relevant proteins (e.g., H3 S<sup>10</sup>, Wee1 S<sup>642</sup>, pCDK1 Y<sup>15</sup>).

## VII. CONCLUSIONS

- 9) The potent activation of kinases engaged in cell cycle control to facilitate DNA repair (Chk1 and Chk2), and the phosphorylation of the DNA breakage marker (histone H2AX) observed in CML treated cells, suggest that genomic damage is a relevant part of the anti-tumor mechanism of JKST6.
- 10) Apoptosis contributes to the anti-tumor mechanism of JKST6 in CML cells. This was evidenced by increased PARP proteolysis, annexin V activity, and apoptotic nuclei. Increased fragmentation and activities of caspases prove that JKST6 triggers tumor cell death by both intrinsic (caspases 9 and 3) and extrinsic (caspases 8 and 3) pathways.
- 11) JKST6 induces a rapid and transient polyubiquitination, together with BCR-ABL1 downregulation, followed by an inhibition of its mRNA levels. Furthermore, in contrast to IM, JKST6 increases expression levels of the *SOCS2* gene, a negative regulator of BCR-ABL1/STAT5 with ubiquitin ligase activity. These observations suggest that, from short timepoints, the proteolytic activity of the proteasome may be involved in the antitumor mechanism of action of JKST6.
- 12) JKST6 inhibits constitutive BCR-ABL1/STAT5 activity and reduces the expression levels of this signaling pathway target proteins (CrkL, c-MYC, PIM1), essential for the survival and malignant progression of tumor cells.
- 13) JKST6 inhibits STAT5- and STAT3-dependent transcription induced by IL-3 and IL-6 cytokines, respectively. This indicates that inhibition of STAT5- and STAT3-regulated gene expression is an important element in the antitumor mechanism of action of JKST6, potentially effective in preventing resistance and aggressive phenotype in CML.
- 14) The cellular microenvironment enriched in bone marrow mesenchymal cells (MSCs) and GM-CSF-like cytokines moderately reduces the antiproliferative potency of IM and JKST6. This suggests that increased STAT5 activation may contribute to cellular resistance to treatment. In contrast, TLR4 receptor activation inhibits CML cell growth in the presence of MSC, suggesting activation of a "quiescent" or differentiated phenotype that retards leukemic cell proliferation.

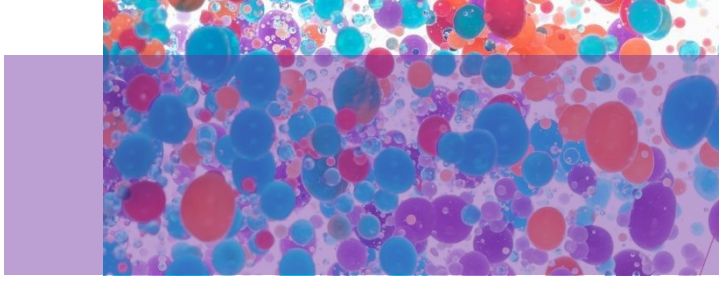
## VII. CONCLUSIONS

- 15) JKST6 is a multikinase modulator as evidenced by its ability to affect other signaling pathways that, as BCR-ABL1/STAT5, influence survival (ERK1/2, AKT, JNK, p38-MAPK) or protein synthesis (S6) in CML cells.
- 16) The multikinase activity of JKST6 allows developing combinatory therapeutic strategies, as demonstrated by its ability to potentiate the antitumoral activity of IM.
- 17) JKST6 keeps its antitumor efficacy in IM-resistant CML cells. Specifically, in the resistance associated with the overexpression of the tyrosine kinase proteins Lyn (K562-R) or BCR-ABL1 (AR230-R), or the BCR-ABL1 mutation (KmycBT315I) that prevents IM binding.
- 18) JKST6 restores the anti-tumor potency of IM in cells whose resistance is associated with overexpression of BCR-ABL1 (AR230-R), probably by reducing the oncoprotein levels. This property might allow the recovery of conventional treatment in patients who have developed resistance to IM or other direct BCR-ABL1 inhibitors.

In summary, this thesis provides multiple preclinical evidence for the rational development of small-molecule compounds as alternative or complementary treatment to conventional CML therapies. Furthermore, it shows that the reduction of the oncokinase BCR-ABL1, which modulates several pro-oncogenic pathways, may be a highly effective strategy as a variant to the specific inhibition of its catalytic domain. Especially in patients who have developed intolerance or resistance to IM, a situation that makes disease remission impossible.







## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Snowden JA, O'Connell S, Hawkins J, Dalley C, Jack A, Mannari D, *et al.* Haematological cancers: improving outcomes. A summary of updated NICE service guidance in relation to Specialist Integrated Haematological Malignancy Diagnostic Services (SIHMDS). *J Clin Pathol.* 2017 Jun 1;70(6):461 LP – 468.
2. Bahakeem E, Qadah T. Pages: 63-68 To Cite This Article: Eman Bahakeem. *Pharmacophore.* 2020;11(3):63–8.
3. Blood Cancers - Hematology.org [Internet]. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://www.hematology.org/education/patients/blood-cancers>
4. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009 Jul 30;114(5):937–51.
5. Veenstra C, Bruce D, Timbs A, Hamblin A. Application of Genomics to Clinical Practice in Haematological Malignancy. *Curr Genet Med Reports* 2019 74. 2019 Dec 2;7(4):236–52.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May 19;127(20):2391–405.
7. Hungria VT de M, Chiatton C, Pavlovsky M, Abenoza LM, Agreda GP, Armenta J, *et al.* Epidemiology of Hematologic Malignancies in Real-World Settings: Findings From the Hemato-Oncology Latin America Observational Registry Study. <https://doi.org/10.1200/JGO1900025>. 2019 Nov 27;5:1–19.
8. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
9. Leukaemia [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
10. Kirtane K, Lee SJ. Racial and ethnic disparities in hematologic malignancies. *Blood.* 2017 Oct 12;130(15):1699–705.
11. Patel MI, Ma Y, Mitchell BS, Rhoads KF. Age and genetics: how do prognostic

- factors at diagnosis explain disparities in acute myeloid leukemia? *Am J Clin Oncol*. 2015 Apr 7;38(2):159–64.
12. Waxman AJ, Mink PJ, Devesa SS, Anderson WF, Weiss BM, Kristinsson SY, *et al*. Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study. *Blood*. 2010 Dec 16;116(25):5501–6.
  13. Hussaini M. Biomarkers in hematological malignancies: A review of molecular testing in hematopathology. *Cancer Control*. 2015 Apr 1;22(2):158–66.
  14. Haloupek N. The Landscape of Blood Cancer Research Today—and Where the Field Is Headed. *Blood Cancer Discov*. 2020 Jul;1(1):1–4.
  15. Shimada A. Hematological malignancies and molecular targeting therapy. Vol. 862, *European Journal of Pharmacology*. *Eur J Pharmacol*; 2019.
  16. Berry DH, Pullen J, George S, Vietti TJ, Sullivan MP, Fernbach D. Comparison of prednisolone, vincristine, methotrexate, and 6-mercaptopurine vs. vincristine and prednisone induction therapy in childhood acute leukemia. *Cancer*. 1975;36(1):98–102.
  17. Zagozdzon R, Golab J. Cancer stem cells in haematological malignancies. Vol. 1A, *Wspolczesna Onkologia*. *Contemp Oncol (Pozn)*; 2015. p. A1–6.
  18. Soverini S, Mancini M, Bavaro L, Cavo M, Martinelli G. Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. *Mol Cancer* 2018 171. 2018 Feb 19;17(1):1–15.
  19. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: From highly fatal to highly curable. Vol. 111, *Blood*. *Blood*; 2008. p. 2505–15.
  20. Alanazi F, Kwa FAA, Burchall G, Jackson DE. New generation drugs for treatment of multiple myeloma. *Drug Discov Today*. 2020 Feb 1;25(2):367–79.
  21. Tan S, Li D, Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomed Pharmacother*. 2020 Apr 1;124:109821.
  22. Zhao Z, Chen Y, Francisco NM, Zhang Y, Wu M. The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. Vol. 8, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. *Acta Pharm Sin B*; 2018. p. 539–51.

23. Tanaka J, Miller JS. Recent progress in and challenges in cellular therapy using NK cells for hematological malignancies. *Blood Rev.* 2020 Nov 1;44:100678.
24. Ma J, Mo Y, Tang M, Shen J, Qi Y, Zhao W, *et al.* Bispecific Antibodies: From Research to Clinical Application. *Front Immunol.* 2021 May 5;0:1555.
25. Harrison C, Vannucchi AM. Ruxolitinib: a potent and selective Janus kinase 1 and 2 inhibitor in patients with myelofibrosis. An update for clinicians. *Ther Adv Hematol.* 2012;3(6):341.
26. Vetrie D, Helgason GV, Copland M. The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(3):158–73.
27. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016 Jun 9;374(23):2209–21.
28. Antar AI, Otrrock ZK, Jabbour E, Mohty M, Bazarbachi A. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: ten frequently asked questions. *Leuk* 2020 343. 2020 Jan 9;34(3):682–96.
29. Iacobucci I, Storlazzi CT, Cilloni D, Lonetti A, Ottaviani E, Soverini S, *et al.* Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1–positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell’Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood.* 2009 Sep 3;114(10):2159–67.
30. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: Mechanisms underlying disease progression. Vol. 16, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2002. p. 1402–11.
31. Piedimonte M, Ottone T, Alfonso V, Ferrari A, Conte E, Divona M, *et al.* A rare BCR-ABL1 transcript in Philadelphia-positive acute myeloid leukemia: Case report and literature review. Vol. 19, *BMC Cancer*. BMC Cancer; 2019.
32. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(3):172–83.
33. Sanz GF, Mora E, Sanz MA. Síndromes mielodisplásicos. In: G. F. Sanz, E. Mora,

- M. A. Sanz. Manual Práctico de Hematología Clínica. 6ª Edición. Barcelona. Antares; 2019. p. 167–90.
34. Höglund M, Sandin F, Simonsson B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann Hematol.* 2015 Apr;94 Suppl 2:S241-7.
  35. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, *et al.* European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020;34(4):966–84.
  36. Quintás-Cardama A, Cortes JE. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006 Jul 1;81(7):973–88.
  37. Vuelta E, García-Tuñón I, Hernández-Carabias P, Méndez L, Sánchez-Martín M. Future approaches for treating chronic myeloid leukemia: Crispr therapy. *Biology (Basel).* 2021;10(2):1–16.
  38. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut.* 1962 Apr;8:65–6.
  39. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson A-M, Witte ON, Baltimore D. The Chronic Myelogenous Leukemia-Specific P210 Protein Is the Product of the bcr/abl Hybrid Gene. *Science.* 1986 Jul 11;233(4760):212-4.
  40. Melo J V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Vol. 88, *Blood.* United States; 1996. p. 2375–84.
  41. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999 Jul 21;341(3):164–72.
  42. Wang JYJ. The Capable ABL: What Is Its Biological Function? *Mol Cell Biol.* 2014 Apr;34(7):1188.
  43. Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell.* 1991 Jul;66(1):161–71.
  44. Mayer BJ, Baltimore D. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 1994 May;14(5):2883–94.
  45. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of

- Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec;13(12):7587–95.
46. Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, Casado LF, García-Gutiérrez V, Hochhaus A, *et al.* European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2016;30(8):1648–71.
  47. Bonifacio M, Stagno F, Scaffidi L, Krampera M, Di Raimondo F. Management of chronic myeloid leukemia in advanced phase. *Front Oncol.* 2019;9:1132.
  48. Jennings BA, Mills KI. c-myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukaemia. *Leuk Res.* 1998 Oct;22(10):899–903.
  49. Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. *Blood.* 2004 Jun;103(11):4010–22.
  50. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, *et al.* European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013 Aug;122(6):872–84.
  51. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. Vol. 5, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Nature Publishing Group; 2004. p. 33–44.
  52. Vigneri P, Wang JYJ. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR–ABL tyrosine kinase. *Nat Med.* 2001;7(2):228–34.
  53. Juan WC, Ong ST. The role of protein phosphorylation in therapy resistance and disease progression in chronic myelogenous leukemia. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Elsevier B.V.; 2012. p. 107–42.
  54. Braun BS, Tuveson DA, Kong N, Le DT, Kogan SC, Rozmus J, *et al.* Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 13;101(2):597–602.
  55. Thomas EK, Cancelas JA, Zheng Y, Williams DA. Rac GTPases as key regulators of p210-BCR-ABL-dependent leukemogenesis. *Leuk* 2008 225. 2008 Mar

- 20;22(5):898–904.
56. Thomas EK, Cancelas JA, Chae H-D, Cox AD, Keller PJ, Perrotti D, *et al.* Rac Guanosine Triphosphatases Represent Integrating Molecular Therapeutic Targets for BCR-ABL-Induced Myeloproliferative Disease. *Cancer Cell*. 2007 Nov 13;12(5):467–78.
  57. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. Vol. 16, *Cancer Control*. H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute; 2009. p. 122–31.
  58. Dang C V., O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*. 2006 Aug 1;16(4):253–64.
  59. Recio C, Guerra B, Guerra-Rodríguez M, Aranda-Tavío H, Martín-Rodríguez P, de Mirecki-Garrido M, *et al.* Signal transducer and activator of transcription (STAT)-5: an opportunity for drug development in oncohematology. *Oncogene*. 2019 Jun 13;38(24):4657–68.
  60. Berger A, Sexl V, Valent P, Moriggl R. Inhibition of STAT5: A therapeutic option in BCR-ABL1-driven leukemia. *Oncotarget*. 2014;5(20):9564-9576.
  61. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):900–11.
  62. Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol*. 2006 Mar 14;71(6):713–21.
  63. Sonkin D, Palmer M, Rong X, Horrigan K, Regnier CH, Fanton C, *et al.* The identification and characterization of a STAT5 gene signature in hematologic malignancies. *Cancer Biomark*. 2015;15(1):79–87.
  64. Fabbro D. BCR-ABL signaling: A new STATus in CML. Vol. 8, *Nature chemical biology*. United States; 2012. p. 228–9.
  65. Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):2118–25.
  66. Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, Zhu B, Wickre M, Hoelzl MA, *et al.* Stat5 is indispensable for the maintenance of Bcr/Abl-positive leukaemia. *EMBO Mol*



- Med. 2010 Mar;2(3):98–110.
67. Hantschel O, Warsch W, Eckelhart E, Kaupe I, Grebien F, Wagner K-U, *et al.* BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. *Nat Chem Biol.* 2012 Jan;8(3):285–93.
  68. Klejman A, Schreiner SJ, Nieborowska-Skorska M, Slupianek A, Wilson M, Smithgall TE, *et al.* The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J.* 2002 Nov 1;21(21):5766–74.
  69. Schaller-Schönitz M, Barzan D, Williamson AJK, Griffiths JR, Dallmann I, Battmer K, *et al.* BCR-ABL Affects STAT5A and STAT5B Differentially. *PLoS One.* 2014 May 16;9(5):97243.
  70. Moriggl R, Sexl V, Kenner L, Dunsch C, Stangl K, Gingras S, *et al.* Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis. *Cancer Cell.* 2005 Jan 1;7(1):87–99.
  71. Kaymaz BT, Selvi N, Gokbulut AA, Aktan Ç, Gündüz C, Saydam G, *et al.* Suppression of STAT5A and STAT5B chronic myeloid leukemia cells via siRNA and antisense-oligonucleotide applications with the induction of apoptosis. *Am J Blood Res.* 2013;3(1):58.
  72. Szelag M, Wesoly J, A.R. Bluysen H. Advances in peptidic and peptidomimetic-based approaches to inhibit STAT signaling in human diseases. *Curr Protein Pept Sci.* 2016 Mar 9;17(2):135–46.
  73. Guerra B, Martín-Rodríguez P, Carlos Díaz-Chico J, Mcnaughton-Smith G, Jiménez-Alonso S, Hueso-Falcón I, *et al.* CM363, a novel naphthoquinone derivative which acts as multikinase modulator and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia. *Oncotarget.* 2017 May 2;8(18):29679-29698.
  74. Martín-Rodríguez P, Guerra B, Hueso-Falcón I, Aranda-Tavío H, Díaz-Chico J, Quintana J, *et al.* A novel naphthoquinone-coumarin hybrid that inhibits BCR-ABL1-STAT5 oncogenic pathway and reduces survival in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Front Pharmacol.* 2019 Jan 9;9:1546.
  75. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(7):489–501.
  76. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, *et al.* Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation

- of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 1997;16(20):6151–61.
77. Ihle NT, Powis G. Take your PIK: phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors race through the clinic and toward cancer therapy. *Mol Cancer Ther.* 2009 Jan;8(1):1–9.
78. Redig AJ, Vakana E, Plataniias LC. Regulation of mammalian target of rapamycin and mitogen activated protein kinase pathways by BCR-ABL. Vol. 52, *Leukemia and Lymphoma*. Taylor & Francis; 2011. p. 45–53.
79. Sinclair A, Latif AL, Holyoake TL. Targeting survival pathways in chronic myeloid leukaemia stem cells. *Br J Pharmacol.* 2013;169(8):1693–707.
80. Carayol N, Vakana E, Sassano A, Kaur S, Goussetis DJ, Glaser H, *et al.* Critical roles for mTORC2- and rapamycin-insensitive mTORC1-complexes in growth and survival of BCR-ABL-expressing leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010/06/28. 2010 Jul 13;107(28):12469–74.
81. Hehlmann R. Chronic Myeloid Leukemia in 2020. *HemaSphere.* 2020 Oct;4(5):e468.
82. Forkner CE, Scott TFM. Arsenic as a therapeutic agent in chronic myelogenous leukemia: Preliminary report. *J Am Med Assoc.* 1931 Jul 4;97(1):3–5.
83. Santos FPS, Kantarjian H, Quintás-Cardama A, Cortes J. Evolution of therapies for chronic myelogenous leukemia. Vol. 17, *Cancer Journal*. 2011. p. 465–76.
84. Minot GR, Buckman TE, Isaacs R. Chronic myelogenous leukemia: age incidence, duration, and benefit derived from irradiation. *J Am Med Assoc.* 1924 May 10;82(19):1489–94.
85. Rushing D, Goldman A, Gibbs G, Howe R, Kennedy BJ. Hydroxyurea *versus* busulfan in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Am J Clin Oncol.* 1982;5(3).
86. Goldman JM, Apperley JF, Jones L, Marcus R, Goolden AWG, Batchelor R, *et al.* Bone Marrow Transplantation for Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 1986 Jan 23;314(4):202–7.
87. Van Rhee F, Szydlo RM, Hermans J, Devergie A, Frassoni F, Arcese W, *et al.* Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic

- myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1997 Oct 1;20(7):553–60.
88. Tura S, Baccarani M. Alpha-interferon in the treatment of chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia [letter; comment]. *Blood*. 1995 May 15;85(10):2999–3002.
89. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, *et al.* Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo* by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996 Jan;56(1):100–4.
90. Jabbour E, Kantarjian H, Cortes J. Use of Second- and Third-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia: An Evolving Treatment Paradigm. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015 Jun 1;15(6):323.
91. Waller CF. Imatinib Mesylate. *Recent Results Cancer Res*. 2018;212:1–27.
92. Treiber DK, Shah NP. Ins and Outs of Kinase DFG Motifs. *Chem Biol*. 2013 Jun 20;20(6):745–6.
93. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2000 Sep 15;289(5486):1938–42.
94. Hantschel O, Grebien F, Superti-Furga G. The growing arsenal of ATP-competitive and allosteric inhibitors of BCR-ABL. *Cancer Res*. 2012 Oct 1;72(19):4890–5.
95. Eide CA, Zabriskie MS, Savage Stevens SL, Antelope O, Vellore NA, Than H, *et al.* Combining the Allosteric Inhibitor Asciminib with Ponatinib Suppresses Emergence of and Restores Efficacy against Highly Resistant BCR-ABL1 Mutants. *Cancer Cell*. 2019 Oct 14;36(4):431-443.e5.
96. Hughes TP, Mauro MJ, Cortes JE, Minami H, Rea D, DeAngelo DJ, *et al.* Asciminib in Chronic Myeloid Leukemia after ABL Kinase Inhibitor Failure. *N Engl J Med*. 2019 Dec 12;381(24):2315–26.
97. Mahon F-X, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, *et al.* Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective,

- multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1029–35.
98. Dusetzina SB, Winn AN, Abel GA, Huskamp HA, Keating NL. Cost sharing and adherence to tyrosine kinase inhibitors for patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2014;32(4):306–11.
99. Annunziata M, Bonifacio M, Breccia M, Castagnetti F, Gozzini A, Iurlo A, *et al.* Current Strategies and Future Directions to Achieve Deep Molecular Response and Treatment-Free Remission in Chronic Myeloid Leukemia. Vol. 10, *Frontiers in Oncology.* 2020. p. 883.
100. Sharf G, Marin C, Bradley JA, Pemberton-Whiteley Z, Bombaci F, Christensen RIO, *et al.* Treatment-free remission in chronic myeloid leukemia: the patient perspective and areas of unmet needs. *Leuk* 2020 348. 2020 May 26;34(8):2102–12.
101. Cortes J, Lang F. Third-line therapy for chronic myeloid leukemia: current status and future directions. *J Hematol Oncol.* 2021;14(1):1–18.
102. Loscocco F, Visani G, Galimberti S, Curti A, Isidori A. BCR-ABL independent mechanisms of resistance in chronic myeloid leukemia. *Front Oncol.* 2019 Sep 1;9(sep):1–11.
103. Mahon FX, Deininger MWN, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, *et al.* Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: Diverse mechanisms of resistance. *Blood.* 2000;96(3):1070–9.
104. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Nagesh Rao P, *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001 Aug 3;293(5531):876–80.
105. Luzzatto L, Melo J V. Acquired resistance to imatinib mesylate: selection for pre-existing mutant cells. *Blood.* 2002 Aug 1;100(3):1105–6.
106. Zabriskie MS, Eide CA, Tantravahi SK, Vellore NA, Estrada J, Nicolini FE, *et al.* BCR-ABL1 Compound Mutations Combining Key Kinase Domain Positions Confer Clinical Resistance to Ponatinib in Ph Chromosome-Positive Leukemia. *Cancer Cell.* 2014 Sep 8;26(3):428–42.
107. Khorashad JS, Anand M, Marin D, Saunders S, Al-Jabary T, Iqbal A, *et al.* The

- presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia*. 2006;20(4):658–63.
108. Soverini S, Rosti G, Iacobucci I, Baccarani M, Martinelli G. Choosing the best second-line tyrosine kinase inhibitor in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients harboring Bcr-Abl kinase domain mutations: how reliable is the IC<sub>50</sub>? *Oncologist*. 2011 Jun;16(6):868–76.
  109. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, *et al.* BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*. 2011 Aug 4;118(5):1208–15.
  110. Eechoute K, Sparreboom A, Burger H, Franke RM, Schiavon G, Verweij J, *et al.* Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice. *Clin Cancer Res*. 2011 Feb 1;17(3):406–15.
  111. Mahon F-X, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, *et al.* MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 2003 Mar;101(6):2368–73.
  112. Ferrao PT, Frost MJ, Siah S-P, Ashman LK. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) *in vitro*. *Blood*. 2003 Dec;102(13):4499–503.
  113. Zheng Q, Wu H, Yu Q, Kim DH, Lipton JH, Angelini S, *et al.* ABCB1 polymorphisms predict imatinib response in chronic myeloid leukemia patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 2015 152. 2014 Sep 23;15(2):127–34.
  114. Abram CL, Courtneidge SA. Src Family Tyrosine Kinases and Growth Factor Signaling. *Exp Cell Res*. 2000 Jan 10;254(1):1–13.
  115. Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, *et al.* BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*. 2003 Jan 15;101(2):690–8.
  116. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and Molecular Genetic Evolution of Chronic Myeloid Leukemia. *Acta Haematol*. 2002;107(2):76–94.
  117. Albajar M, Gómez-Casares MT, Llorca J, Mauleon I, Vaqué JP, Acosta JC, *et al.*

- MYC in chronic myeloid leukemia: Induction of aberrant DNA synthesis and association with poor response to imatinib. *Mol Cancer Res.* 2011;9(5):564–76.
118. Wendel H-G, de Stanchina E, Cepero E, Ray S, Emig M, Fridman JS, *et al.* Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 May 9;103(19):7444 LP – 7449.
119. Roeder I, Horn M, Glauche I, Hochhaus A, Mueller MC, Loeffler M. Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications. *Nat Med* 2006 1210. 2006 Oct 1;12(10):1181–4.
120. Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest.* 2011 Jan;121(1):396–409.
121. Morotti A, Panuzzo C, Fava C, Saglio G. Kinase-inhibitor-insensitive cancer stem cells in chronic myeloid leukemia. *Expert Opin Biol Ther.* 2014 Mar;14(3):287–99.
122. Aggoune D, Sorel N, Bonnet ML, Goujon JM, Tarte K, Héroult O, *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cell (MSC) gene profiling in chronic myeloid leukemia (CML) patients at diagnosis and in deep molecular response induced by tyrosine kinase inhibitors (TKIs). *Leuk Res.* 2017 Sep 1;60:94–102.
123. Kumar A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Adhesion to stromal cells mediates imatinib resistance in chronic myeloid leukemia through ERK and BMP signaling pathways. *Sci Rep.* 2017 Dec 25;7(1):9535.
124. Bewry NN, Nair RR, Emmons MF, Boulware D, Pinilla-Ibarz J, Hazlehurst LA. Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. *Mol Cancer Ther.* 2008 Oct 1;7(10):3169–75.
125. Zhang X, Tu H, Yang Y, Jiang X, Hu X, Luo Q, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia via the IL-7/JAK1/STAT5 pathway. *J Biol Chem.* 2019 Aug 9;294(32):12167–79.
126. Wang Y, Cai D, Brendel C, Barrett C, Erben P, Manley PW, *et al.* Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)

- mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):2147–55.
127. Antoszewska-Smith J, Pawlowska E, Blasiak J. Reactive oxygen species in BCR-ABL1-expressing cells - relevance to chronic myeloid leukemia. *Acta Biochim Pol*. 2017;64(1):1–10.
  128. Warsch W, Grundschober E, Sexl V. Adding a new facet to STAT5 in CML Multitasking for leukemic cells. *Cell Cycle*. 2013;12(12):1813–4.
  129. Koptyra M, Falinski R, Nowicki MO, Stoklosa T, Majsterek I, Nieborowska-Skorska M, *et al*. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):319–27.
  130. Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, Fajmann S, Cerny-Reiterer S, Hölbl A, *et al*. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3409–20.
  131. Traer E, MacKenzie R, Snead J, Agarwal A, Eiring AM, O'Hare T, *et al*. Blockade of JAK2-mediated extrinsic survival signals restores sensitivity of CML cells to ABL inhibitors. *Leukemia*. 2012;26(5):1140.
  132. Eiring AM, Page BDG, Kraft IL, Mason CC, Vellore NA, Resettec D, *et al*. Combined STAT3 and BCR-ABL1 inhibition induces synthetic lethality in therapy-resistant chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015 Mar 9;29(3):586–97.
  133. Guerra B, Recio C, Aranda-Tavío H, Guerra-Rodríguez M, García-Castellano JM, Fernández-Pérez L. The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2021 Feb 25;11:626971.
  134. Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NBV, Zhang Q, Koeck T, *et al*. Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. *Science*. 2009 Feb 6;323(5915):793.
  135. Isgut M, Rao M, Yang C, Subrahmanyam V, Rida PCG, Aneja R. Application of Combination High-Throughput Phenotypic Screening and Target Identification Methods for the Discovery of Natural Product-Based Combination Drugs. Vol. 38, *Medicinal Research Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 2018. p. 504–24.
  136. Eder J, Herrling PL. Trends in Modern Drug Discovery. *Handb Exp Pharmacol*. 2015 Apr 1;232:3–22.

137. Terstappen GC, Schlüpen C, Raggiaschi R, Gaviraghi G. Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2007 611. 2007 Nov;6(11):891–903.
138. Swinney DC. Phenotypic vs. Target-Based Drug Discovery for First-in-Class Medicines. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Apr 1;93(4):299–301.
139. Croston GE. The utility of target-based discovery. Vol. 12, *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2017. p. 427–9.
140. Aulner N, Danckaert A, Ihm JE, Shum D, Shorte SL. Next-Generation Phenotypic Screening in Early Drug Discovery for Infectious Diseases. *Trends Parasitol.* 2019 Jul 1;35(7):559–70.
141. Fernández Alonso M del C, Campillo Martín NE. *Cómo se fabrica un medicamento*. 1 edición. Los Libros de La Catarata. Madrid; 2018. 112 p.
142. Schneider G, Fechner U. Computer-based *de novo* design of drug-like molecules. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(8):649–63.
143. Medina-Franco JL, Fernán-Dezde Gortari E, Jesús Naveja J. Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora. *Educ Química.* 2015 Jul 31;26(3):180–6.
144. Haasen D, Schopfer U, Antczak C, Guy C, Fuchs F, Selzer P. How Phenotypic Screening Influenced Drug Discovery: Lessons from Five Years of Practice. *Assay Drug Dev Technol.* 2017 Aug/Sep;15(6):239-246.
145. Warchal SJ, Unciti-Broceta A, Carragher NO. Next-generation phenotypic screening. *Future Med Chem.* 2016 Jul;8(11):1331-47.
146. Sant S, Johnston PA. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. Vol. 23, *Drug Discovery Today: Technologies*. Elsevier Ltd; 2017. p. 27–36.
147. An Open Label Phase II Study of Indisulam in Combination With Irinotecan in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Who Have Been Previously Treated With 5-Fluorouracil/Leucovorin and Oxaliplatin - *ClinicalTrials.gov* [Internet]. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00165867>
148. Assi R, Kantarjian HM, Kadia TM, Pemmaraju N, Jabbour E, Jain N, *et al.* Final



- Results of a Phase 2, Open-Label Study of Indisulam, Idarubicin and Cytarabine in Patients with Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndrome. *Cancer*. 2018 Jul 1;124(13):2758.
149. Oda Y, Owa T, Sato T, Boucher B, Daniels S, Yamanaka H, *et al*. Quantitative Chemical Proteomics for Identifying Candidate Drug Targets. *Anal Chem*. 2003 May 1;75(9):2159–65.
  150. Salisbury BG, Davis HR, Burrier RE, Burnett DA, Boykow G, Caplen MA, *et al*. Hypocholesterolemic activity of a novel inhibitor of cholesterol absorption, SCH 48461. *Atherosclerosis*. 1995;115(1):45–63.
  151. Staatz CE, Tett SE. Clinical Pharmacokinetics of Once-Daily Tacrolimus in Solid-Organ Transplant Patients. *Clin Pharmacokinet*. 2015 Oct 29;54(10):993–1025.
  152. McPherson M, Yang Y, Hammond PW, Kreider BL. Drug Receptor Identification from Multiple Tissues Using Cellular-Derived mRNA Display Libraries. *Chem Biol*. 2002 Jun 1;9(6):691–8.
  153. Robuck PR, Wurzelmann JI. Understanding the Drug Development Process. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Nov;11 Suppl 1:S13-6.
  154. Ritter JM, Rang HP, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale's Pharmacology E-Book: with student consult Online Access. Elsevier Health Sciences; 2014. 776p.
  155. Keseru GM, Makara GM. Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discov Today*. 2006 Aug 1;11(15–16):741–8.
  156. Entzeroth M, Flotow H, Condrón P. Overview of High-Throughput Screening. *Curr Protoc Pharmacol*. 2009 Mar 1;44(1):9.4.1-9.4.27.
  157. Drews J. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science*. 2000 Mar 17;287(5460):1960–4.
  158. Li JWH, Vederas JC. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*. 2009 Jul 10;325(5937):161–5.
  159. Koch MA, Schuffenhauer A, Scheck M, Wetzelschlag S, Casaulta M, Odermatt A, *et al*. Charting biologically relevant chemical space: A structural classification of natural products (SCONP). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 29;102(48):17272 LP – 17277.

160. Martín-Acosta P. Síntesis Dominó de Compuestos Quinónicos con Potencial Actividad frente a Dianas de Interés Farmacológico. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna; 2019.
161. Spring DR. Diversity-oriented synthesis; a challenge for synthetic chemists. *Org Biomol Chem*. 2003 Nov;1(22):3867–70.
162. Wetzel S, Bon RS, Kumar K, Waldmann H. Biology-Oriented Synthesis. *Angew Chemie Int Ed*. 2011 Nov 11;50(46):10800–26.
163. Barreiro EJ. Chapter 1 Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: An Introduction. In: *Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation*. The Royal Society of Chemistry; 2016. p. 1–15.
164. Mironov MA. Design of Multi-Component Reactions: From Libraries of Compounds to Libraries of Reactions. *QSAR Comb Sci*. 2006 Jun 1;25(5–6):423–31.
165. Tietze LF. Domino Reactions in Organic Synthesis. *Chem Rev*. 1996;96(1):115–36.
166. Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(2):143–8.
167. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020 Mar 27;83(3):770–803.
168. Yao L. Aplidin PharmaMar. *IDrugs*. 2003 Mar;6(3):246–50.
169. Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012 Jan 11;52:221–47.
170. Wellington KW. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. *RSC Adv*. 2015 Feb 17;5(26):20309–38.
171. Pereyra CE, Dantas RF, Ferreira SB, Gomes LP, Silva FP. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. Vol. 19, *Cancer Cell International*. BioMed Central Ltd.; 2019. p. 1–20.
172. Anaissi-Afonso L, Oramas-Royo S, Ayra-Plasencia J, Martín-Rodríguez P,

- García-Luis J, Lorenzo-Castrillejo I, *et al.* Lawsone, Juglone, and  $\beta$ -Lapachone Derivatives with Enhanced Mitochondrial-Based Toxicity. *ACS Chem Biol.* 2018 Aug 17;13(8):1950–7.
173. Guo C, He J, Song X, Tan L, Wang M, Jiang P, *et al.* Pharmacological properties and derivatives of shikonin—A review in recent years. Vol. 149, *Pharmacological Research.* Academic Press; 2019.
174. Xu KH, Lu DP. Plumbagin induces ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia cells *in vivo*. *Leuk Res.* 2010 May;34(5):658–65.
175. Hueso-Falcón I, Amesty Á, Anaissi-Afonso L, Lorenzo-Castrillejo I, Machín F, Estévez-Braun A. Synthesis and biological evaluation of naphthoquinone-coumarin conjugates as topoisomerase II inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(3):484–9.
176. Qiu H-Y, Wang P-F, Lin H-Y, Tang C-Y, Zhu H-L, Yang Y-H. Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. *Chem Biol Drug Des.* 2018 Mar;91(3):681–90.
177. Bisht R, Bhattacharyya A, Shrivastava A, Saxena P. An Overview of the Medicinally Important Plant Type III PKS Derived Polyketides. *Front Plant Sci.* 2021 Oct 14;12.
178. Fujimoto Y, Zhang X, Kirisawa M, Uzawa J, Sumatra M. New flavones from *Artocarpus communis* Forst. *Chem Pharm Bull.* 1990;38(6):1787–9.
179. Liou SS, Shieh WL, Cheng TH, Won SJ, Lin CN. Gamma-pyrone compounds as potential anti-cancer drugs. *J Pharm Pharmacol.* 1993 Sep;45(9):791–4.
180. Wang Y, Zhong Z, Zhao F, Zheng J, Zheng X, Zhang K, *et al.* Two new pyrone derivatives from the mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus sydowii* #2B. *Nat Prod Res.* 2021;0(0):1–7.
181. Yang RM, Zhang XL, Wang L, Huang JP, Yang J, Yan YJ, *et al.*  $\alpha$ -Pyrone Derivatives from a *Streptomyces* Strain Resensitize Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Cells. *Nat Products Bioprospect.* 2017;7(4):329–34.
182. Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 1975 Mar;45(3):321–34.

183. Miklossy G, Hilliard TS, Turkson J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. Vol. 12, Nature Reviews Drug Discovery. 2013. p. 611–29.
184. Martin P, Papayannopoulou T. HEL cells: A new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. Science. 1982 Jun 11;216(4551):1233-5.
185. Liang JC, Ning Y, Wang R, Padilla-Nash HM, Schröck E, Soenksen D, *et al.* Spectral karyotypic study of the HL-60 cell line: Detection of complex rearrangements involving chromosomes 5, 7, and 16 and delineation of critical region of deletion on 5q31.1. Cancer Genet Cytogenet. 1999 Sep;113(2):105–9.
186. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature. 1977;270(5635):347–9.
187. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968;97:77–89.
188. Bharadwaj M, Mifsud NA, McCluskey J. Detection and characterisation of alloreactive t cells. Methods Mol Biol. 2012;882:309–37.
189. Turek M, Szczęsna D, Koprowski M, Bałczewski P. Synthesis of 1-indanones with a broad range of biological activity. Beilstein J Org Chem 1348. 2017 Mar 9;13(1):451–94.
190. Zappavigna S, Cossu AM, Grimaldi A, Bocchetti M, Ferraro GA, Nicoletti GF, *et al.* Anti-Inflammatory Drugs as Anticancer Agents. Int J Mol Sci 2020, Vol 21, Page 2605. 2020 Apr 9;21(7):2605.
191. Faria JV, Vegi PF, Miguita AGC, dos Santos MS, Boechat N, Bernardino AMR. Recently reported biological activities of pyrazole compounds. Bioorg Med Chem. 2017 Nov 1;25(21):5891–903.
192. Marshall KM, Barrows LR. Biological activities of pyridoacridines. Nat Prod Rep. 2004 Nov 24;21(6):731–51.
193. Schrodinger LLC. Maestro, V. (2017). New York, NY; 2017.

194. Moffat JG, Rudolph J, Bailey D. Phenotypic screening in cancer drug discovery — past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2014 138. 2014 Jul 18;13(8):588–602.
195. (NIH) NCI. Enhancing Drug Discovery and Development - National Cancer Institute [Internet]. 2015. [cited 2021 Dec 28]. Available from: <https://www.cancer.gov/research/areas/treatment/enhancing-drug-discovery>
196. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1–2):55–63.
197. Gubler H, Schopfer U, Jacoby E. Theoretical and Experimental Relationships between Percent Inhibition and IC50 Data Observed in High-Throughput Screening. *J Biomol Screen*. 2013 Jan;18(1):1-13.
198. Wang Y, Xing J, Xu Y, Zhou N, Peng J, Xiong Z, *et al*. In silico ADME/T modelling for rational drug design. *Q Rev Biophys*. 2015 Jul 16;48(4):488–515.
199. Puttini M, Redaelli S, Moretti L, Brussolo S, Gunby RH, Mologni L, *et al*. Characterization of compound 584, an Abl kinase inhibitor with lasting effects. *Haematologica*. 2008 May 1;93(5):653–61.
200. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 1997 Mar 1;21(1):A.3B.1-A.3B.2.
201. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, *et al*. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol*. 2012;10(1):29.
202. Gelles JD, Edward Chipuk J. Robust high-throughput kinetic analysis of apoptosis with real-time high-content live-cell imaging. *Cell Death Dis*. 2016 Dec 1;7(12).
203. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134.
204. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.

205. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* 2010;70(2):440–6.
206. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SIS, *et al.* Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol.* 2002;20(6):592–6.
207. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia.* 1968 Sep;13(3):222–57.
208. Hernández-Molina R, Abramov PA, González-Platas J, Oramas-Royo S, Estévez-Braun A, Guerra-Rodríguez M, *et al.* Synthesis, characterization and antiproliferative activity of mixed ligand complexes of Cu<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> with lapachol. *Polyhedron.* 2019 Jun 1;165:73–8.
209. Kandioller W, Balsano E, Meier SM, Jungwirth U, Göschl S, Roller A, *et al.* Organometallic anticancer complexes of lapachol: metal centre-dependent formation of reactive oxygen species and correlation with cytotoxicity. *Chem Commun.* 2013 Mar 26;49(32):3348–50.
210. Leung CH, Yang H, Ma VPY, Chan DSH, Zhong HJ, Li YW, *et al.* Inhibition of Janus kinase 2 by cyclometalated rhodium complexes. *Medchemcomm.* 2012 May 30;3(6):696–8.
211. Martín-Acosta P, Amesty Á, Guerra-Rodríguez M, Guerra B, Fernández-Pérez L, Estévez-Braun A. Modular Synthesis and Antiproliferative Activity of New Dihydro-1H-pyrazolo[1,3-b]pyridine Embelin Derivatives. *Pharm* 2021, Vol 14, Page 1026. 2021 Oct 8;14(10):1026.
212. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Vol. 81, *Cell. Cell*; 1995. p. 323–30.
213. Lee JH, Sung JY, Choi EK, Yoon H-K, Kang BR, Hong EK, *et al.* C/EBP $\beta$  Is a Transcriptional Regulator of Wee1 at the G2/M Phase of the Cell Cycle. *Cells.* 2019 Feb 11;8(2):145.
214. Matheson CJ, Backos DS, Reigan P. Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Oct 1;37(10):872–81.

215. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, *et al.* Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosom* 1997 1066. 1997;106(6):348–60.
216. Brenner AK, Reikvam H, Lavecchia A, Bruserud Ø. Therapeutic targeting the cell division cycle 25 (CDC25) phosphatases in human acute myeloid Leukemia - The possibility to target several kinases through inhibition of the various CDC25 isoforms. Vol. 19, *Molecules*. MDPI AG; 2014. p. 18414–47.
217. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: From research tools to drug candidates. Vol. 8, *Chemistry and Biology*. Chem Biol; 2001. p. 739–58.
218. De Jong R, Ten Hoeve J, Heisterkamp N, Groffen J. Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site. *Oncogene*. 1997;14(5):507–13.
219. Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, *et al.* Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(42):17468–73.
220. Jinesh G. G, Chundururu S, Kamat AM. Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF- $\alpha$  but not through TRAIL and FasL. *J Leukoc Biol*. 2012 Jul;92(1):233–44.
221. Sun Z, Wang S, Zhao RC. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol* 2014 71. 2014 Feb 6;7(1):1–10.
222. Zheng C, Li L, Haak M, Brors B, Frank O, Giehl M, *et al.* Gene expression profiling of CD34+ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leukemia*. 2006;20(6):1028–34.
223. Schultheis B, Carapeti-Marootian M, Hochhaus A, Weier A, Goldman JM, Melo J V. Overexpression of SOCS-2 in advanced stages of chronic myeloid leukemia: possible inadequacy of a negative feedback mechanism. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1766-75.
224. Hiesinger K, Dar'In D, Proschak E, Krasavin M. Spirocyclic Scaffolds in

- Medicinal Chemistry. *J Med Chem.* 2020 Jan 14;64(1):150–83.
225. Bouhenna MM, Orlikova B, Talhi O, Schram BEN, Pinto DCGA, Taibi N, *et al.* Anti-proliferative, Cytotoxic and NF- $\kappa$ B Inhibitory Properties of Spiro(Lactone-Cyclohexanone) Compounds in Human Leukemia. *Anticancer Res.* 2017 Sep 1;37(9):5225 LP – 5233.
226. Vitaku E, Smith DT, Njardarson JT. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *J Med Chem.* 2014 Dec 26;57(24):10257–74.
227. Eldehna WM, El-Naggar DH, Hamed AR, Ibrahim HS, Ghabbour HA, Abdel-Aziz HA. One-pot three-component synthesis of novel spirooxindoles with potential cytotoxic activity against triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018 Jan 1;33(1):309–18.
228. Zhao B, Li Y, Xu P, Dai Y, Luo C, Sun Y, *et al.* Discovery of Substituted 1H-Pyrazolo[3,4-b]pyridine Derivatives as Potent and Selective FGFR Kinase Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2016 Jun 9;7(6):629–34.
229. Lisboa T, Silva D, Duarte S, Ferreira R, Andrade C, Lopes AL, *et al.* Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene–Acridine Hybrid. *Mol* 2020, Vol 25, Page 64. 2019 Dec 24;25(1):64.
230. Janočková J, Plšíková J, Kašpárková J, Brabec V, Jendželovský R, Mikeš J, *et al.* Inhibition of DNA topoisomerases I and II and growth inhibition of HL-60 cells by novel acridine-based compounds. *Eur J Pharm Sci.* 2015 Aug 30;76:192–202.
231. Trainor GL. The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2007 Jan;2(1):51–64.
232. Al Shoyaib A, Archie SR, Karamyan VT. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm Res.* 2019 Jan 1;37(1):12.
233. Copeland RA, Pompliano DL, Meek TD. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(9):730–9.
234. Lonsdale R, Ward RA. Structure-based design of targeted covalent inhibitors. Vol. 47, *Chemical Society Reviews.* Royal Society of Chemistry; 2018. p. 3816–30.

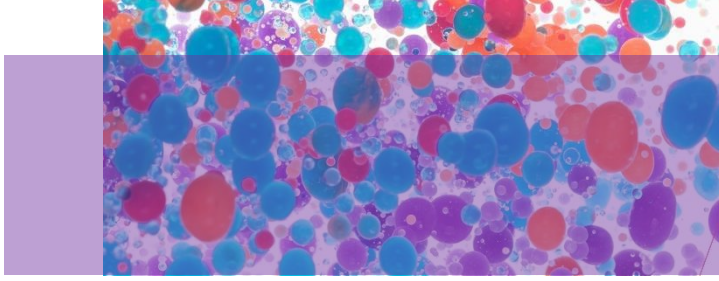


235. McGlacken GP, Fairlamb IJS. 2-Pyrone natural products and mimetics: Isolation, characterisation and biological activity. Vol. 22, Natural Product Reports. Nat Prod Rep; 2005. p. 369–85.
236. Zemenides S, Dos Santos J, Enfield L, Mantalaris A, Panoskaltsis N. Metabolism of Acute Myeloid Leukemia Cell Lines Alters with Passage in 2D Culture and Remains Stable in 3D. *Blood*. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):2787–2787.
237. Katayama K, Fujita N, Tsuruo T. Akt/Protein Kinase B-Dependent Phosphorylation and Inactivation of WEE1Hu Promote Cell Cycle Progression at G 2 /M Transition . *Mol Cell Biol*. 2005 Jul;25(13):5725–37.
238. de Gooijer MC, van den Top A, Bockaj I, Beijnen JH, Würdinger T, van Tellingen O. The G2 checkpoint—a node-based molecular switch. *FEBS Open Bio*. 2017 Apr 1;7(4):439–55.
239. Zhao H, Piwnica-Worms H. ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Mol Cell Biol*. 2001 Jul;21(13):4129–39.
240. Newell SW, Perchellet EM, Ladesich JB, Freeman JA, Chen Y, Liu L, *et al*. Tricyclic pyrone analogs: A new class of microtubule-disrupting anticancer drugs effective against murine leukemia cells *in vitro*. *Int J Oncol*. 1998 Feb 1;12(2):433–42.
241. Kong X, Luo J, Xu T, Zhou Y, Pan Z, Xie Y, *et al*. Plumbagin enhances TRAIL-induced apoptosis of human leukemic Kasumi-1 cells through upregulation of TRAIL death receptor expression, activation of caspase-8 and inhibition of cFLIP. *Oncol Rep*. 2017 Jun 1;37(6):3423–32.
242. Vrana JA, Cleaveland ES, Eastman A, Craig RW. Inducer-and cell type-specific regulation of antiapoptotic MCL1 in myeloid leukemia and multiple myeloma cells exposed to differentiation-inducing or microtubule-disrupting agents. *Apoptosis*. 2006 Aug;11(8):1275–88.
243. Sancho M, Leiva D, Lucendo E, Orzáez M. Understanding MCL1: from cellular function and regulation to pharmacological inhibition. *FEBS J*. 2021 Jul 26.
244. Grumati P, Dikic I. Ubiquitin signaling and autophagy. Vol. 293, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology

- Inc.; 2018. p. 5404–13.
245. Sun H, Kapuria V, Peterson LF, Fang D, Bornmann WG, Bartholomeusz G, *et al.* Bcr-Abl ubiquitination and Usp9x inhibition block kinase signaling and promote CML cell apoptosis. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3151–62.
246. Bartholomeusz GA, Talpaz M, Kapuria V, Ling YK, Wang S, Estrov Z, *et al.* Activation of a novel Bcr/Abl destruction pathway by WP1130 induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3470–8.
247. Shan ZL, Zhong L, Xiao CL, Gan LG, Xu T, Song H, *et al.* Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia NB4 cells through modulation of MAPKs and c-Myc. *Mol Med Rep*. 2017 Sep 1;16(3):3055–60.
248. Peltola KJ, Paukku K, Aho TLT, Ruuska M, Silvennoinen O, Ivi P, *et al.* Pim-1 kinase inhibits STAT5-dependent transcription via its interactions with SOCS1 and SOCS3. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3744–50.
249. Coppo P, Dusanter-Fourt I, Vainchenker W, Turhan AG. BCR-ABL induces opposite phenotypes in murine ES cells according to STAT3 activation levels. *Cell Signal*. 2009 Jan;21(1):52–60.
250. Chen KC, Liu WH, Chang L Sen. Suppression of ERK signaling evokes autocrine Fas-mediated death in arachidonic acid-treated human chronic myeloid leukemia K562 cells. *J Cell Physiol*. 2010 Mar;222(3):625–34.
251. Saavedra E, Del Rosario H, Brouard I, Hernández-Garcés J, García C, Quintana J, *et al.* The synthetic flavanone 6-methoxy-2-(naphthalen-1-yl)chroman-4-one induces apoptosis and activation of the MAPK pathway in human U-937 leukaemia cells. *Bioorg Chem*. 2020 Jan 1;94:103450.
252. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, *et al.* mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1500–8.
253. Civini S, Jin P, Ren J, Sabatino M, Castiello L, Jin J, *et al.* Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells. *J Transl Med*. 2013 Dec 4;11(1):1–14.
254. Prieto-Vila M, Takahashi RU, Usuba W, Kohama I, Ochiya T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci* 2017, Vol 18, Page

2574. 2017 Dec 1;18(12):2574.
255. Lotem J, Sachs L. Hematopoietic Cytokines Inhibit Apoptosis Induced by Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Cancer Chemotherapy Compounds in Myeloid Leukemic Cells. *Blood*. 1992 Oct 1;80(7):1750–7.
256. Wei Z, Chen N, Guo H, Wang X, Xu F, Ren Q, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009;28(1):141.
257. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, *et al.* AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. *Cancer Cell*. 2009 Nov 6;16(5):401–12.
258. Bullock AN, Debreczeni JÉ, Edwards AM, Sundström M, Knapp S. Crystal structure of the SOCS2–elongin C–elongin B complex defines a prototypical SOCS box ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 May 16;103(20):7637–42.
259. Villuendas R, Steegmann JL, Pollán M, Tracey L, Granda A, Fernández-Ruiz E, *et al.* Identification of genes involved in imatinib resistance in CML: A gene-expression profiling approach. *Leukemia*. 2006;20(6):1047–54.
260. Piessevaux J, Lavens D, Peelman F, Tavernier J. The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Oct 1;19(5–6):371–81.
261. Aranda-Tavío H, Recio C, Martín-Acosta P, Guerra-Rodríguez M, Brito-Casillas Y, Blanco R, *et al.* JKST6, a novel multikinase modulator of the BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway that potentiates direct BCR-ABL1 inhibition and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia. *Biomed Pharmacother*. 2021 Dec 1;144:112330.





## **ANEXO I. RESULTADOS**



## Formulaciones para JKST(6) para estudios de IRWIN

**Objetivo 1:** Obtener una formulación (IP, 1mg/ml) que es una solución neutral, y con la más cantidad de agua posible.

Tres formulaciones fueron probadas inicialmente.

F1: DMA/PEG400/Salino (10:20:70); 1 mg /ml

F2: DMA/PEG400/Salino (10:40:50); 1 mg /ml

F3: DMA/PEG400/Salino (10:30:60); 1 mg /ml

| Formulación | 1 minutos       | 15 minutos      | 30 minutos      |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| F1          | Slightly cloudy | ppt             | ppt             |
| F2          | Clear solution  | Clear solution  | Clear solution  |
| F3          | Clear solution  | Slightly cloudy | Slightly cloudy |

**Resultado:** La formulación F2 cumple con los requisitos necesarios.

**Objetivo 2:** Obtener una formulación (PO, 5mg/ml) que es homogéneo, y con la más cantidad de agua posible.

F1PO: DMA/0.5%MC (10:90); 5 mg /ml

F2PO: DMA/0.5%MC (20:80); 5 mg /ml

| Formulación | 1 minutos     | 15 minutos    | 30 minutos    |
|-------------|---------------|---------------|---------------|
| F1PO        | ppt homogéneo | ppt homogéneo | ppt homogéneo |
| F2PO        | ppt homogéneo | ppt homogéneo | ppt homogéneo |

**Resultado:** Las dos formulaciones cumplen con los requisitos necesarios. Entonces, vamos a seleccionar la con la más cantidad de agua, la F1PO.

Ensayos e informe preparado por

Fecha: 31-07-2018



Grant McNaughton-Smith Ph.D



# INFORME TEST DE IRWIN PARA JKST6

Solicitante: Dr. Leandro Fco. Fernández Pérez

Realizado por: Dra. Catalina Sierra Ramos  
y Dra. Natalia Armas Capote





## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción.....  | 2  |
| 2. Descripción del proceso.....   | 2  |
| 3. Resultados test de toxicidad aguda intraperitoneal (IP) .....                                    | 3  |
| 4. Resultados autopsia administración vía intraperitoneal.....                                      | 4  |
| 5. Resultados test de toxicidad aguda vía oral (VO) .....   | 5  |
| 6. Resultados autopsia administración vía oral .....  | 6  |
| 7. Conclusiones y recomendaciones .....   | 8  |
| 8. Anexo I. Tabla Test de Irwin vía intraperitoneal: vehículo (DMA:PEG400:SALINO;<br>10:40:50)..... | 9  |
| 9. Anexo II. Tabla Test de Irwin vía intraperitoneal: JKST6 (10mg/kg).....                          | 10 |
| 10. Anexo III. Tabla test de Irwin vía oral: vehículo (DMA:0.5%MC; 10:90) .....                     | 11 |
| 11. Anexo IV. Tabla test de Irwin vía oral: JKST6 (50mg/kg).....                                    | 12 |
| 12. Anexo V. Test de Irwin de compuestos conocidos .....  | 13 |
| 13. Anexo VI. Terminología tablas.....  | 15 |



## **1. Introducción**

El test de Irwin (Irwin, S. Psychopharmacology, 1968, 13, 22-257) es un método sistemático de observación desarrollado para ensayar el efecto de la administración de determinados compuestos en roedores. Esta prueba está entre los procedimientos más ampliamente utilizados dentro del contexto de la farmacología de seguridad.

Permite determinar los efectos primarios en el comportamiento o en las funciones fisiológicas, pudiendo utilizarse también para determinar la dosis letal mínima de un compuesto o su rango de dosis para inducir respuestas en el sistema nervioso central. Por tanto, representa una poderosa herramienta para detectar problemas potenciales de seguridad, incluyendo problemas de sedación, problemas del aparato locomotor y potencial convulsivo entre otros.

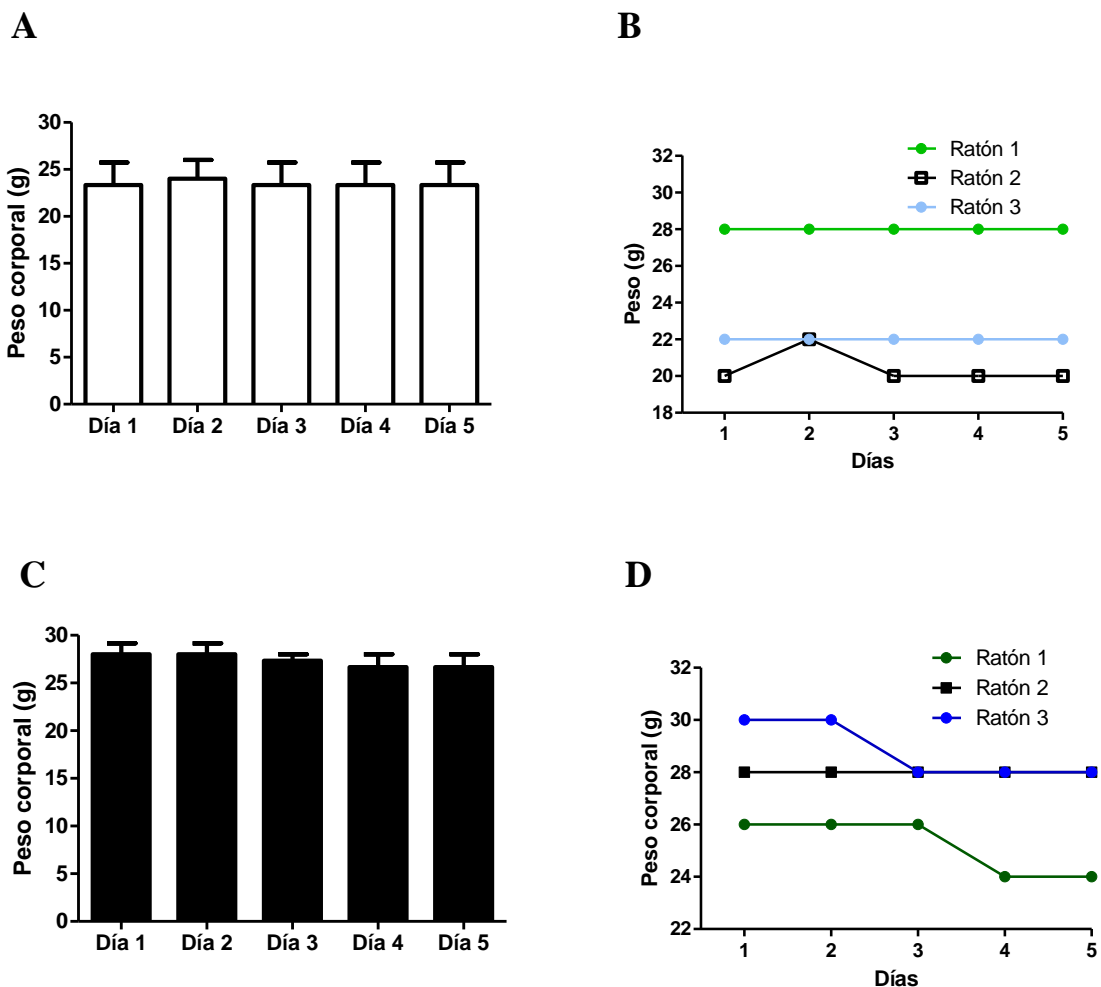
## **2. Descripción del proceso**

El test de Irwin se realizó durante 5 días consecutivos, administrando el compuesto vía intraperitoneal (10mg/kg) y vía oral (50mg/kg). Para ello se prepararon las formulaciones de compuesto necesario cada día del test. Para cada vía de administración se utilizaron 6 ratones macho consanguíneos de la cepa FVB: 3 ratones para la administración del compuesto JKST6 y 3 ratones para la administración del vehículo.

Para la realización del test los animales se separaron en tres jaulas JKST6 IP, JKST6 VO y vehículo. Durante 5 días los animales fueron pesados y administrados con compuesto o vehículo y observados durante 90 minutos por dos personas de manera independiente. Cada persona recogió la sintomatología observada en una tabla que se muestra en el anexo (excitabilidad, sedación, alteraciones del movimiento o conducta, pérdida de peso, etc.). El día 5 se sacrificaron los animales con dióxido de carbono para valoración de órganos vitales. Los datos observados en el test de toxicidad aguda se detallan a continuación.

### 3. Resultados test de toxicidad aguda intraperitoneal (IP)

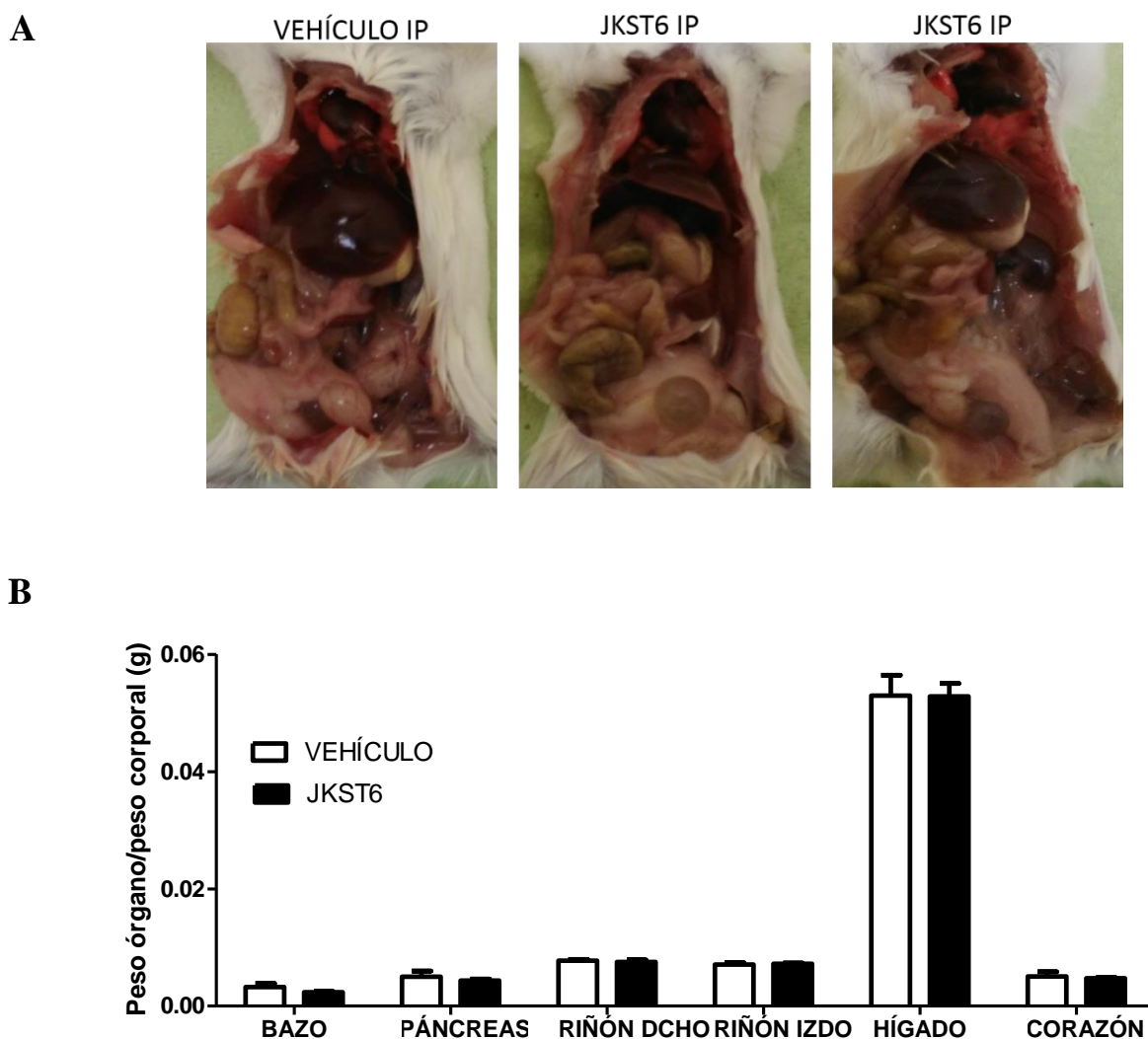
Se observaron algunos síntomas de toxicidad aguda durante los 5 días de administración vía intraperitoneal del compuesto JKST6 (10mg/kg) en comparación con el vehículo (DMA: PEG400: SALINO; 10:40:50). Concretamente se observa: excitación marcada (también se observa en uno de los vehículos), rascado en la zona de administración del compuesto (sólo en el segundo día del test) y piloerección (Bloque de “autonomía”). Para más detalle consultar las tablas de los anexos I y II. Durante los días de tratamiento no se observan diferencias significativas en el peso de los animales tratados con vehículo (Figura 1A) o compuesto (Figura 1C).



**Figura 1.** (A) Peso corporal animales tratados con vehículo IP (DMA:PEG400:SALINO; 10:40:50). *One-way ANOVA, Bonferroni post-test; n=3.* (B) Variación del peso de cada individuo tratado con vehículo IP (DMA:PEG400:SALINO; 10:40:50). (C) Peso corporal animales tratados con JKST6 IP (10mg/kg). *One-way ANOVA, Bonferroni post-test; n=3.* (D) Variación del peso de cada individuo tratado con compuesto JKST6 IP (10mg/kg).

#### 4. Resultados autopsia administración vía intraperitoneal

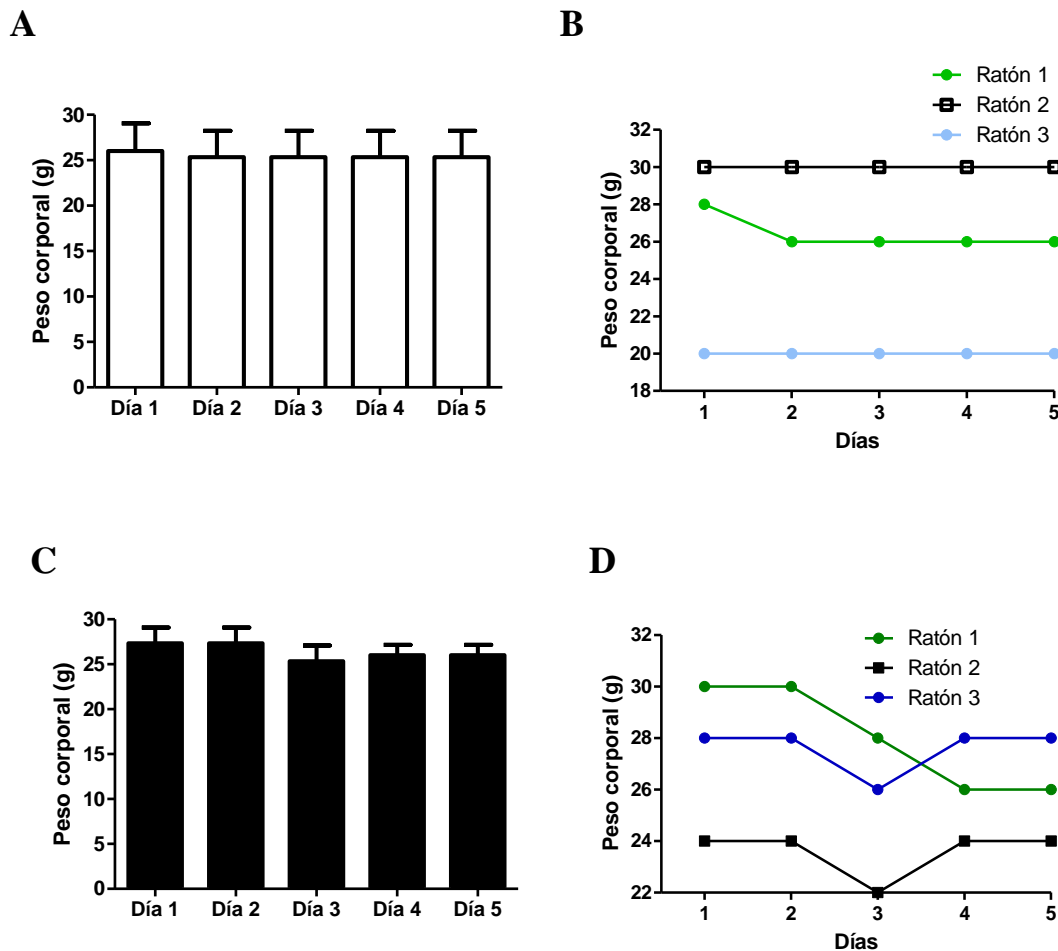
Tras 5 días de administración de compuesto (JKST6 10mg/kg) o vehículo (DMA:PEG400:SALINO; 10:40:50) los animales se eutanasiaron utilizando dióxido de carbono y se procede a la valoración y pesado de los órganos vitales. A simple vista no se observan diferencias en los órganos vitales (bazo, páncreas, riñones, hígado y corazón) entre vehículo y animales tratados con JKST6 (Figura 2A). Asimismo, no existen diferencias significativas en el peso de los órganos normalizado con el peso corporal de cada individuo (Figura 2B).



**Figura 2.** (A) Imágenes representativas de la autopsia tras 5 días de tratamiento con vehículo o JKST6 administrados vía IP. (B) Peso de los órganos normalizado con el peso corporal (*Unpaired t test*  $p < 0.05$ , con corrección de *Welch* en los datos correspondientes a corazón, puesto que las varianzas son significativamente diferentes).

## 5. Resultados test de toxicidad aguda vía oral (VO)

No se observaron síntomas de toxicidad aguda durante los 5 días de administración vía oral del compuesto JKST6 (50mg/kg) en comparación con el vehículo (DMA:0.5%MC; 10:90). Para más detalle consultar las tablas de los anexos III y IV. Asimismo, no se observan diferencias significativas en el peso de los animales tratados con vehículo (Figura 3A) o compuesto (Figura 3C).

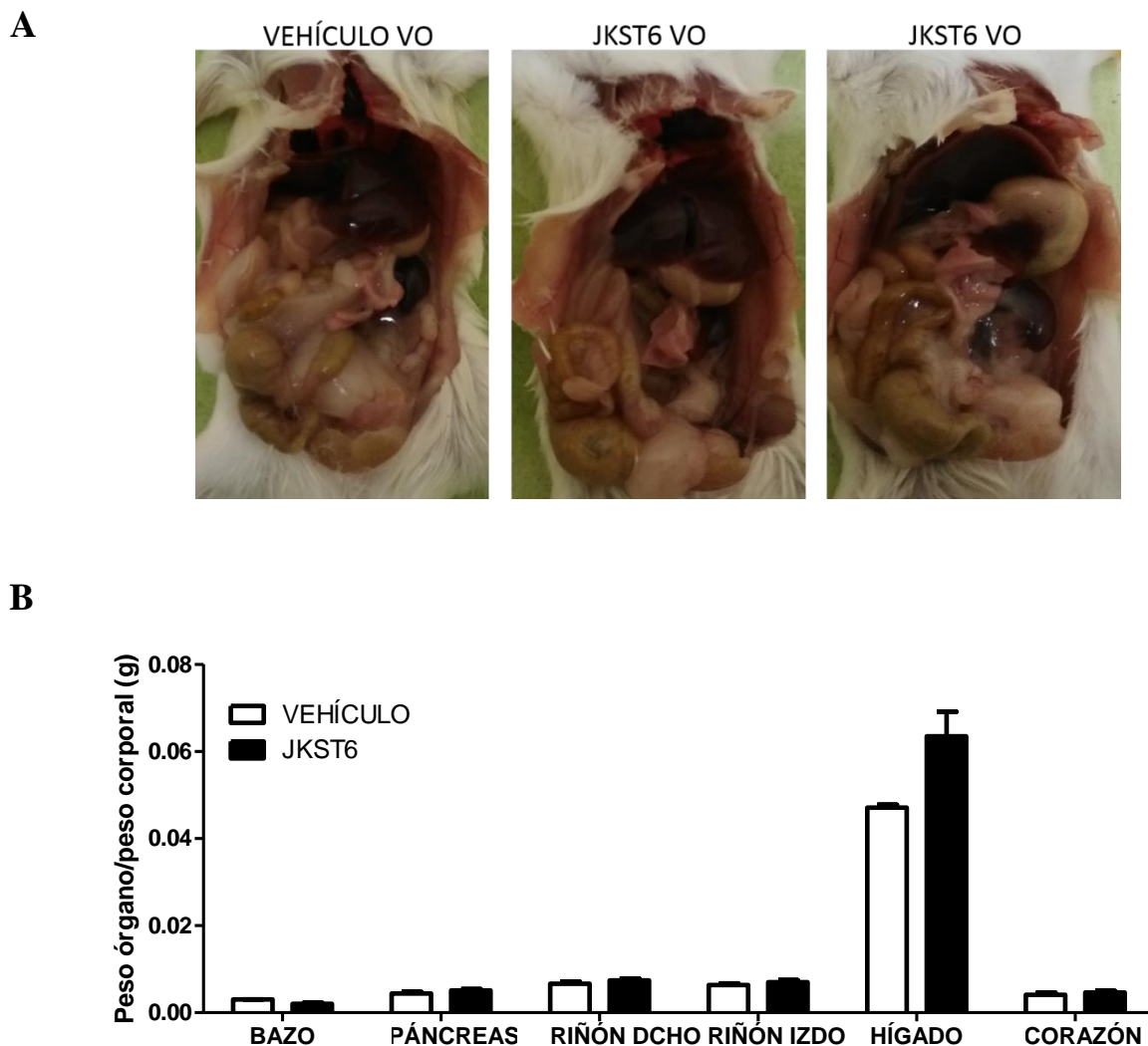


**Figura 3.** (A) Peso corporal animales tratados con vehículo VO (DMA:0.5%MC; 10:90). *One-way ANOVA*, *Bonferroni* post-test, n=3. (B) Variación del peso de cada individuo tratado con vehículo VO (DMA:0.5%MC; 10:90). (C) Peso corporal animales tratados con JKST6 VO (50mg/kg). *One-way ANOVA*, *Bonferroni* post-test, n=3. (D) Variación del peso de cada individuo tratado con compuesto JKST6 VO (50mg/kg).

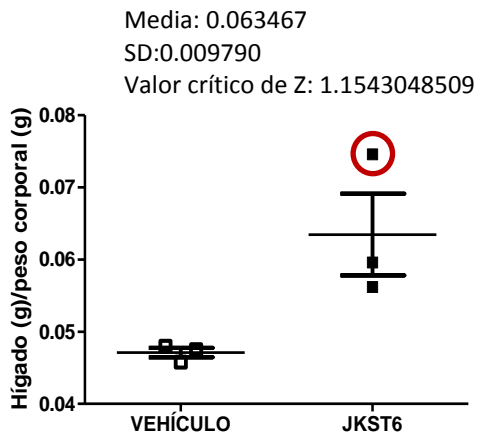
## 6. Resultados autopsia administración vía oral

Tras 5 días de administración de compuesto (JKST6 50mg/kg) o vehículo (DMA:0.5%MC; 10:90) los animales se eutanasiaron utilizando dióxido de carbono y se procede a la valoración y pesado de los órganos vitales. Durante la autopsia se observó compuesto en la porción terminal del intestino delgado de los tres individuos tratados.

A simple vista no se observan diferencias en los órganos vitales (bazo, páncreas, riñones, hígado y corazón) entre vehículo y animales tratados con JKST6 (Figura 4A), asimismo no existen diferencias significativas en el peso de los órganos normalizado con el peso corporal de cada individuo (Figura 4B). Sin embargo, existe una tendencia hacia el incremento de peso del hígado en los animales tratados con JKST6 VO. Puesto que la varianza en estos datos es significativamente diferente a la observada en el grupo tratado con vehículo, hemos realizado un test de Grubbs para determinar si alguno de los datos ha de excluirse del análisis. Los resultados de este test nos indican que hay un valor que se aleja de los otros dos pero no constituye un *outlier* significativo (Figura 4C). Si excluyésemos este dato del análisis la diferencia de peso del hígado entre animales tratados con vehículo y tratados con JKST6 sería estadísticamente significativa. Al representar todos los datos relativos al tamaño del hígado juntos (IP y VO; vehículos y JKST6) tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos (Figura 4D).

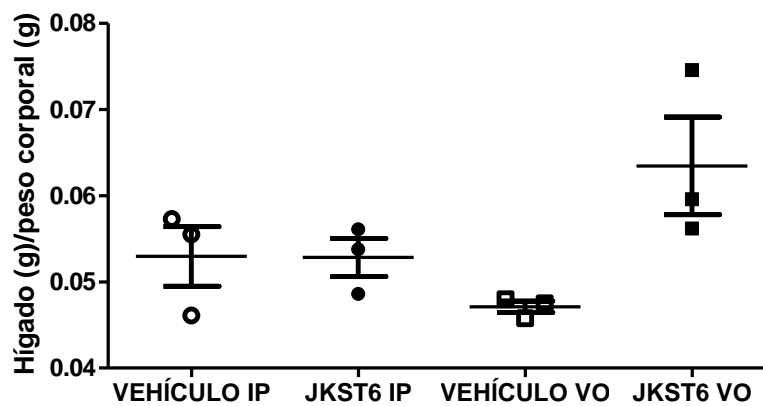


C



| Valor  | Z        | Outlier significativo?                                 |
|--------|----------|--|
| 0.0562 | 0.742218 |  |
| 0.0596 | 0.394942 |  |
| 0.0746 | 1.137160 | Lejano del resto, pero no significativo ( $p > 0.05$ ) |

D



**Figura 4.** (A) Imágenes representativas de la autopsia tras 5 días de tratamiento con vehículo o JKST6 administrados vía oral (VO). (B) Peso de los órganos normalizado con el peso corporal (*Unpaired t test*  $p < 0.05$ , con corrección de *Welch* en los datos correspondientes a hígado, puesto que las varianzas son significativamente diferentes). (C) Test de Grubbs o método ESD (*extreme studentized deviate*) para la determinación de *outliers*. (D) Peso del hígado normalizado con el peso corporal en animales vehículo (IP y VO) y tratados con JKST6 (IP y VO) (*One-way ANOVA*, *Bonferroni* post-test,  $n=3$ )

## 7. Conclusiones y recomendaciones

La agrupación de los diversos signos evaluados en el Test de Irwin en bloques nos facilita la identificación de los efectos principales del compuesto. Asimismo permite identificar el ruido de fondo de la prueba, es decir, los signos ocasionales en animales individuales que no están relacionados con la agrupación más sistemática que indica un efecto real. En el anexo V podemos observar los efectos principales de algunos compuestos conocidos. Por ejemplo, los efectos principales del diazepam son afectación del aparato locomotor y sedación y excitación en el caso de la cafeína.

En el caso del compuesto **JKST6 administrado IP (10mg/kg)** podemos determinar que los efectos principales son excitación y piloerección. Aquí debemos indicar que uno de los animales tratados con vehículo también presentó excitación y que los otros dos animales tratados con vehículo que no presentaron excitación procedían de una camada diferente; por ello este efecto podría no deberse estrictamente al fármaco, sino a una mayor susceptibilidad a la excitación a la que se suma la producida por el estrés de la reiteración de las inyecciones. Para poder asegurar este hecho habría que aumentar el número de animales a analizar. En este grupo de animales la autopsia no reveló cambios en los órganos vitales con el tratamiento con JKST6.

Por otra parte, en la administración **VO del compuesto JKST6 (50mg/kg)** no se registró ningún signo de toxicidad en el desarrollo del test de Irwin. Sin embargo, se observa una tendencia de aumento de tamaño del hígado en los animales tratados con compuesto. No obstante, el test de Irwin *per se* no contempla la autopsia de los animales y no se observó cambio aparente a simple vista en el aspecto de este órgano durante la autopsia. Para saber si esta diferencia tiene repercusión fisiológica habría que realizar un estudio histológico de este tejido y aumentar el número de animales a analizar.

Podemos concluir determinando que el compuesto JKST6 supera las pruebas de toxicidad aguda cuando se administra vía intraperitoneal a una dosis de 10mg/kg y vía oral a una dosis de 50mg/kg.

Recomendamos la realización de un estudio de dosis letal y/o un estudio más a largo plazo, para poder determinar los posibles efectos crónicos del compuesto.



**8. Anexo I. Tabla Test de Irwin vía intraperitoneal: vehículo (DMA:PEG400:SALINO; 10:40:50)**

|  | Time (min)                               | DÍA 1                                   |    |    |    | DÍA 2 |     |      |    | DÍA 3 |    |    |     | DÍA 4 |    |    |    | DÍA 5 |     |      |    |    |    |    |     |
|--|--|---|----|----|----|-------|-----|------|----|-------|----|----|-----|-------|----|----|----|-------|-----|------|----|----|----|----|-----|
|  |  | 0-15                                    | 15 | 30 | 60 | 90    | 24h | 0-15 | 15 | 30    | 60 | 90 | 24h | 0-15  | 15 | 30 | 60 | 90    | 24h | 0-15 | 15 | 30 | 60 | 90 | 24h |
| <b>Excitación</b>                          | Convulsiones                             |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Tremor                                   |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Cola Straub                              |   |    |    |    |       |     |      | X  |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Excitación: marcada                      |   |    |    |    |       |     | X    |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      | X  |    |    |    |     |
|  | Excitación: moderada                     |   |    |    |    |       |     | X    |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     | X    |    |    |    |    |     |
|  | Excitación: ligera                       |   |    |    |    |       |     | X    |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     | X    |    |    |    |    |     |
|  | Salto                                    |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| <b>Autonomía</b>                           | Incremento de la reactividad al tocar    |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     | X    |    |    |    |    |     |
|  | Aumento del miedo                        |   |    |    |    |       |     |      | X  |       |    |    |     |       |    |    |    |       | X   |      |    |    |    |    |     |
|  | Aumento tono muscular                    |   |    |    |    |       |     |      | X  |       |    |    |     |       |    |    |    |       | X   |      |    |    |    |    |     |
|  | Agresión                                 |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     | X    |    |    |    |    |     |
| <b>Estereotipia</b>                        | Pisarse patas delanteras                 |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Contracciones nerviosas de la cabeza     |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Estereotipia movimientos de la cabeza    |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Estereotipia masticar                    |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| <b>Motor</b>                               | Estereotipia oler                        |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Catalepsia                               |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Aquinesia pérdida de movimientos         |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | trastornos de la marcha tambalearse      |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Estirarse al andar                       |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Caminar puntillas                        |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| <b>Sedación</b>                            | Pérdida del equilibrio                   |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Pérdida de tracción                      |   |    |    |    |       |     |      | X  |       |    |    |     |       |    |    |    |       | X   |      |    |    |    |    |     |
|  | Disminución de la pérdida de agarre      |   |    |    |    |       |     |      | X  |       |    |    |     |       |    |    |    |       | X   |      |    |    |    |    |     |
|  | Pérdida de reflejos                      |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Pérdida de reflejo corneal               |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Postura del cuerpo plana                 |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| <b>Dolor</b>                               | Sedación marcada                         |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Sedación moderada                        |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Sedación ligera                          |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Disminución del tono muscular            |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Disminución de la reactividad al tocarlo |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Disminución del miedo                    |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| <b>Otras medidas</b>                       | Aumento de la respiración                |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Disminución de la respiración            |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| <b>Excitación</b>                          | Hipertermia                              |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Hipotermia                               |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Rascado                                  |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Muerte                                   |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Retorcimiento                            |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Analgésia                                |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | <b>Autonomía</b>                         | Prosis Caída de los párpados superiores |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |  |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| Miosis contracción permanente de la pupila |  |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| Micriasis Dilatación de la pupila          |  |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| Ruboración                                 |  |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| Defecación/diarrea                         |  |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| Salivación                                 |  |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
| <b>Excitación</b>                          | Lacrimación                              |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Aumento de la respiración                |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Disminución de la respiración            |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Hipertermia                              |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Hipotermia                               |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Rascado                                  |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |
|  | Muerte                                   |   |    |    |    |       |     |      |    |       |    |    |     |       |    |    |    |       |     |      |    |    |    |    |     |

\*Código de colores según número de animales que presente sintomatología. Blanco/gris:0 ; amarillo:1 ; naranja:2 ; rojo: 3.



10. Anexo III. Tabla test de Irwin vía oral: vehículo (DMA:0.5%MC; 10:90)

|                       | DÍA 1                                      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | DÍA 2 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | DÍA 3 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | DÍA 4 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | DÍA 5 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------|--|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-------|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|                       | Time (min)                                 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15  |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90  |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Excitación</b>     | Convulsiones                               |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Tremor                                     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Cola Straub                                |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Excitación: marcada                        |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     | x   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Excitación: moderada                       |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     | x   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Excitación: ligera                         |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     | x   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Salto                                      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     | x   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Incremento de la reactividad al tocar      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     | x   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Aumento del miedo                          |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     | x   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Aumento tono muscular |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x   |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Agresión              |  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | 0-15                                       |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Esterotipia</b>    | Pisarse patas delanteras                   |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Contracciones nerviosas de la cabeza       |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Esterotipia movimientos de la cabeza       |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Esterotipia masticar                       |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Esterotipia oler                           |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | 0-15                                       |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Motor</b>          | Catalepsia                                 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Aquiescia pérdida de movimientos           |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | trastornos de la marcha tambalearse        |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Estirarse al andar                         |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Caminar puntillas                          |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Pérdida del equilibrio                     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Pérdida de tracción                        |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Disminución de la pérdida de agarre        |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       |  | 0-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | 15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | 30 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | 60 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | 90 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     | 24h |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      | 0-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    | 15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    | 30 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    | 60 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    | 90 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     | 24h |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      | 0-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    | 15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    | 30 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    | 60 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    | 90 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Sedación</b>       | Pérdida de reflejos                        |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Pérdida de reflejo corneal                 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Postura del cuerpo plana                   |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Sedación marcada                           |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Sedación moderada                          |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Sedación ligera                            |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Disminución del tono muscular              |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Disminución de la reactividad al tocarlo   |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Disminución del miedo                      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | 0-15                                       |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Dolor</b>          | Retorcimiento                              |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Analgésia                                  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | 0-15                                       |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Autonomía</b>      | Ptoisis Caída de los párpados superiores   |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Miosis contracción permanente de la pupila |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Midriasis Dilatación de la pupila          |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Piloerécción                               |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Defecación/diarrea                         |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Salivación                                 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Lacrimación                                |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       | x  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | 0-15                                       |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 24h |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0-15 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 15 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 60 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 90 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Otras medidas</b>  | Aumento de la respiración                  |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Disminución de la respiración              |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Hipertermia                                |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Hipotermia                                 |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Rascado                                    |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                       | Muerte                                     |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |       |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |     |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |      |      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |



12. Anexo V. Test de Irwin de compuestos conocidos

|                            | 1 - Diazepam (p.o.) |    |    |     | 2 - Caffeine (i.p.) |    |    |     |
|----------------------------|---------------------|----|----|-----|---------------------|----|----|-----|
|                            | 2                   | 4  | 8  | 16  | 4                   | 8  | 16 | 32  |
| DOSE                       | 0-15                | 30 | 60 | 120 | 0-15                | 30 | 60 | 120 |
| CONFUSIONS                 |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| TREMOR                     |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| STRAIT TAIL                |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| EXCITATION: MILD           |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| EXCITATION: MODERATE       |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| EXCITATION: SEVERE         |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| JUMPING                    |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| INCREASED REACTIVITY TOUCH |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| INCREASED TEAR             |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| INCREASED MUSCLE TONE      |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| AGGRESSION                 |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| FOE-TAIL TRAILING          |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| HEAD TITCHES               |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| STEREOTYP (HEAD MOVEMENTS) |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| STEREOTYP (CHEWING)        |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| STEREOTYP (SHREWING)       |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| CAUDAL SWAY                |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| ANOREXIA                   |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| ABNORMAL GAIT (BOLLING)    |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| ABNORMAL GAIT (TIP TOE)    |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| MOTOR INCOORDINATION       |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| LOSS OF BALANCE            |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| LOSS OF Traction           |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| DECREASED GRASPING         |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| LOSS OF RIGHTING REFLEX    |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| LOSS OF CORNEAL REFLEX     |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| FLAT BODY POSTURE          |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| SEIZURE: MILD              |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| SEIZURE: MODERATE          |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| SEIZURE: SEVERE            |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| DECREASED MUSCLE TONE      |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| DECREASED REACTIVITY TOUCH |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| DECREASED TEAR             |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| WETTING                    |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| ANALGESIA                  |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| PROZE                      |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| DIOPHORIA                  |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| MYOZOS                     |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| MYOBIOSIS                  |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| MYOCLONUS                  |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| URINATION/DIARRHEA         |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| SAVATION                   |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| LACTATION                  |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| INCREASED REPERATION       |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| DECREASED REPERATION       |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| SPHETEREMIA                |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| SPHETEREMIA                |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| SCATCHING                  |                     |    |    |     |                     |    |    |     |
| OTHER OBSERVATIONS         |                     |    |    |     |                     |    |    |     |

### 5 - Promethazine (p.o.)

| (mg/kg p.o.)             | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
|--------------------------|----|-----|-----|-----|-----|
| <b>DEATH</b>             |    |     |     |     |     |
| <b>EXCITATION</b>        |    |     |     |     |     |
| CONVULSIONS              |    |     |     |     |     |
| DRICK                    |    |     |     |     |     |
| FLAT                     |    |     |     |     |     |
| SPASTIC FLAILS           |    |     |     |     |     |
| EXCITANT HAZARD          |    |     |     |     |     |
| EXCITANT HIGRADE         |    |     |     |     |     |
| EXCITANT SIGHT           |    |     |     |     |     |
| JUMPING                  |    |     |     |     |     |
| INCREASED REACTIV TOUCH  |    |     |     |     |     |
| INCREASED PAIN           |    |     |     |     |     |
| INCREASED MUSCLE TONE    |    |     |     |     |     |
| AGGRESSION               |    |     |     |     |     |
| FOUR-TW TREASING         |    |     |     |     |     |
| <b>STEREOTYPY</b>        |    |     |     |     |     |
| HEAD TWITCHES            |    |     |     |     |     |
| STRICTORY HEAD MOVEMENTS |    |     |     |     |     |
| STRICTORY SPINNING       |    |     |     |     |     |
| STRICTORY SWIRLING       |    |     |     |     |     |
| COURTSHIP                |    |     |     |     |     |
| DANCE                    |    |     |     |     |     |
| ARCHES                   |    |     |     |     |     |
| <b>MOTOR</b>             |    |     |     |     |     |
| ABNORMAL GAIT (BOLLING)  |    |     |     |     |     |
| ABNORMAL GAIT (TIP TOE)  |    |     |     |     |     |
| MOTOR INCOORDINATION     |    |     |     |     |     |
| LOSS OF BALANCE          |    |     |     |     |     |
| LOSS OF TRACTION         |    |     |     |     |     |
| DECREASED GRASPING       |    |     |     |     |     |
| <b>SEDATION</b>          |    |     |     |     |     |
| LOSS OF BIKING REFLEX    |    |     |     |     |     |
| LOSS OF CORNEAL REFLEX   |    |     |     |     |     |
| FLAT BODY POSTURE        |    |     |     |     |     |
| SEMI-DORMANT             |    |     |     |     |     |
| SEMI-DORMANT HIGRADE     |    |     |     |     |     |
| SEMI-DORMANT SIGHT       |    |     |     |     |     |
| DECREASED MUSCLE TONE    |    |     |     |     |     |
| DECREASED REACTIV TOUCH  |    |     |     |     |     |
| DECREASED PAIN           |    |     |     |     |     |
| <b>PAIN</b>              |    |     |     |     |     |
| ANALGESIA                |    |     |     |     |     |
| FLORS                    |    |     |     |     |     |
| <b>AUTONOMIC</b>         |    |     |     |     |     |
| DILATED PUPILS           |    |     |     |     |     |
| MYOPIA                   |    |     |     |     |     |
| HYPERMIA                 |    |     |     |     |     |
| MYOCLONUS                |    |     |     |     |     |
| DIPLOCACIA/DIMBLEIA      |    |     |     |     |     |
| SAVIATION                |    |     |     |     |     |
| <b>OTHER MEASURES</b>    |    |     |     |     |     |
| ANESTHESIA               |    |     |     |     |     |
| DECREASED RESPIRATION    |    |     |     |     |     |
| DECREASED RESPIRATION    |    |     |     |     |     |
| HYPOTENSIA               |    |     |     |     |     |
| HYPERTENSIA              |    |     |     |     |     |
| SEIZURES                 |    |     |     |     |     |
| RES. STIMULANS INJECT    |    |     |     |     |     |
| RES. STIMULANS           |    |     |     |     |     |

### 4 - Morphine (i.p.)

| (mg/kg i.p.)             | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
|--------------------------|---|---|---|----|----|
| <b>DEATH</b>             |   |   |   |    |    |
| <b>EXCITATION</b>        |   |   |   |    |    |
| CONVULSIONS              |   |   |   |    |    |
| DRICK                    |   |   |   |    |    |
| FLAT                     |   |   |   |    |    |
| SPASTIC FLAILS           |   |   |   |    |    |
| EXCITANT HAZARD          |   |   |   |    |    |
| EXCITANT HIGRADE         |   |   |   |    |    |
| EXCITANT SIGHT           |   |   |   |    |    |
| JUMPING                  |   |   |   |    |    |
| INCREASED REACTIV TOUCH  |   |   |   |    |    |
| INCREASED PAIN           |   |   |   |    |    |
| INCREASED MUSCLE TONE    |   |   |   |    |    |
| AGGRESSION               |   |   |   |    |    |
| FOUR-TW TREASING         |   |   |   |    |    |
| <b>STEREOTYPY</b>        |   |   |   |    |    |
| HEAD TWITCHES            |   |   |   |    |    |
| STRICTORY HEAD MOVEMENTS |   |   |   |    |    |
| STRICTORY SPINNING       |   |   |   |    |    |
| STRICTORY SWIRLING       |   |   |   |    |    |
| COURTSHIP                |   |   |   |    |    |
| DANCE                    |   |   |   |    |    |
| ARCHES                   |   |   |   |    |    |
| <b>MOTOR</b>             |   |   |   |    |    |
| ABNORMAL GAIT (BOLLING)  |   |   |   |    |    |
| ABNORMAL GAIT (TIP TOE)  |   |   |   |    |    |
| MOTOR INCOORDINATION     |   |   |   |    |    |
| LOSS OF BALANCE          |   |   |   |    |    |
| LOSS OF TRACTION         |   |   |   |    |    |
| DECREASED GRASPING       |   |   |   |    |    |
| <b>SEDATION</b>          |   |   |   |    |    |
| LOSS OF BIKING REFLEX    |   |   |   |    |    |
| LOSS OF CORNEAL REFLEX   |   |   |   |    |    |
| FLAT BODY POSTURE        |   |   |   |    |    |
| SEMI-DORMANT             |   |   |   |    |    |
| SEMI-DORMANT HIGRADE     |   |   |   |    |    |
| SEMI-DORMANT SIGHT       |   |   |   |    |    |
| DECREASED MUSCLE TONE    |   |   |   |    |    |
| DECREASED REACTIV TOUCH  |   |   |   |    |    |
| DECREASED PAIN           |   |   |   |    |    |
| <b>PAIN</b>              |   |   |   |    |    |
| ANALGESIA                |   |   |   |    |    |
| FLORS                    |   |   |   |    |    |
| <b>AUTONOMIC</b>         |   |   |   |    |    |
| DILATED PUPILS           |   |   |   |    |    |
| MYOPIA                   |   |   |   |    |    |
| HYPERMIA                 |   |   |   |    |    |
| MYOCLONUS                |   |   |   |    |    |
| DIPLOCACIA/DIMBLEIA      |   |   |   |    |    |
| SAVIATION                |   |   |   |    |    |
| <b>OTHER MEASURES</b>    |   |   |   |    |    |
| ANESTHESIA               |   |   |   |    |    |
| DECREASED RESPIRATION    |   |   |   |    |    |
| DECREASED RESPIRATION    |   |   |   |    |    |
| HYPOTENSIA               |   |   |   |    |    |
| HYPERTENSIA              |   |   |   |    |    |
| SEIZURES                 |   |   |   |    |    |
| RES. STIMULANS INJECT    |   |   |   |    |    |
| RES. STIMULANS           |   |   |   |    |    |

### 13. Anexo VI. Terminología tablas

|   |  |
|---|--|
| <b>CONVULSIONES</b>                     | Movimientos alternados de flexión y estiramiento   |
| <b>TREMOR</b>                           | Temblores de las extremidades  |
| <b>COLA STRAUB</b>                      | Levantamiento persistente de la cola, la cual toma forma de J  |
| <b>EXCITACIÓN: MARCADA</b>              | Movimientos muy rápidos sin pausa  |
| <b>EXCITACIÓN: MODERADA</b>             | Movimientos muy rápidos con pausa  |
| <b>EXCITACIÓN: LIGERA</b>               | Movimientos ligeramente más rápidos que los controles  |
| <b>SALTOS</b>                           | Presencia  |
| <b>INCREMENTO REACTIVIDAD AL TOCAR</b>  | Aumento reacción al tocar  |
| <b>AUMENTO DEL MIEDO</b>                | Aumento del miedo ante estímulos externos (sonoros)  |
| <b>AUMENTO TONO MUSCULAR</b>            | Aumento de la dureza muscular que se percibe al tacto  |
| <b>AGRESIVIDAD</b>                      | Aumento agresión ante experimentador   |
| <b>PISARSE PATAS DELANTERAS</b>         | Movimiento repetitivo de pisarse patas delanteras  |
| <b>CONTRACCIONES NERVIOSAS CABEZA</b>   | Movimiento repetitivo de sacudidas bruscas y repentinas de cabeza  |
| <b>ESTEROTIPIA MOVIMIENTO CABEZA</b>    | Movimiento repetitivo de cabeza sin propósito aparente   |
| <b>ESTEROTIPIA MASTICAR</b>             | Movimiento repetitivo de masticación sin propósito aparente  |
| <b>ESTEROTIPIA OLER</b>                 | Movimiento repetitivo de olfacción sin propósito aparente  |
| <b>CATALEPSIA</b>                       | Trastorno nervioso repentino con inmovilidad y rigidez del cuerpo y pérdida de la sensibilidad y capacidad de contraer los músculos voluntariamente. |
| <b>AQUINESIA</b>                        | Falta, pérdida o ausencia de movimiento  |
| <b>TAMBALEARSE</b>                      | Trastorno de la marcha, tambalearse al andar   |
| <b>CAMINAR DE PUNTILLAS</b>             | Trastorno de la marcha, caminar de puntillas   |
| <b>PÉRDIDA EQUILIBRIO</b>               | Trastorno de la marcha, pérdida de equilibrio  |
| <b>PÉRDIDA TRACCIÓN</b>                 | Disminución agarre patas traseras en comparación control   |
| <b>DISMINUCIÓN AGARRE</b>               | Disminución agarre patas delanteras en comparación control   |
| <b>PÉRDIDA REFLEJOS</b>                 | Presencia de pérdida de reflejos   |
| <b>PÉRDIDA REFLEJO CORNEAL</b>          | Pérdida de parpadeo involuntario producido por la estimulación de la córnea  |
| <b>POSTURA DEL CUERPO PLANA</b>         | Presencia  |
| <b>SEDACIÓN MARCADA</b>                 | Ausencia de movimiento   |
| <b>SEDACIÓN MODERADA</b>                | Movimientos muy lentos   |
| <b>SEDACIÓN LIGERA</b>                  | Movimiento más lento que el control  |
| <b>DISMINUCIÓN DEL TONO MUSCULAR</b>    | Disminución de la dureza muscular que se percibe al tacto  |
| <b>DISMINUCIÓN REACTIVIDAD AL TOCAR</b> | Disminución reacción al tocar  |
| <b>DISMINUCIÓN MIEDO</b>                | Disminución del miedo ante estímulos externos (sonoros)  |
| <b>RETORCIMIENTO</b>                    | Dolor abdominal severo y contracción de la musculatura abdominal   |
| <b>ANALGESIA</b>                        | Desaparición de cualquier sensación de dolor   |
| <b>PTOSIS</b>                           | Descenso permanente de los párpados superiores   |
| <b>EXOFTALMIA</b>                       | Posición anormalmente saliente del globo ocular  |
| <b>MIOSIS</b>                           | Contracción anormal permanente de la pupila  |
| <b>MIDRIASIS</b>                        | Dilatación anormal de la pupila con inmovilidad del iris   |
| <b>PILOERECCIÓN</b>                     | Erección del pelo  |
| <b>DEFECACIÓN/DIARREA</b>               | Aumento defecación/defecación líquida  |
| <b>SALIVACIÓN</b>                       | Presencia de secreciones alrededor del hocico  |
| <b>LACRIMACIÓN</b>                      | Presencia de secreciones sobre el globo ocular y en los párpados   |
| <b>AUMENTO DE LA RESPIRACIÓN</b>        | Presencia  |
| <b>DISMINUCIÓN DE LA RESPIRACIÓN</b>    | Presencia  |
| <b>HIPERTERMIA</b>                      | Aumento temperatura corporal por encima de lo normal   |
| <b>HIPOTERMIA</b>                       | Disminución temperatura corporal por debajo de lo normal   |
| <b>RASCADO</b>                          | Rascarse con patas delanteras o traseras en cualquier parte del cuerpo   |
| <b>MUERTE</b>                           | Presencia  |



Centro Atlántico del Medicamento, S.A.  
N.I.F.: A-38857595  
Avda Trinidad 61  
7ª Planta Torre Agustín Arévalo  
38204 La Laguna  
Tfno. : 822 102 653  
[www.ceamedsa.com](http://www.ceamedsa.com)

En La Laguna a 30 de Agosto de 2018,

Firmado: Catalina Sierra Ramos PhD

Natalia Armas Capote PhD





# INFORME ESTUDIO HEPATOTOXICIDAD JKST6 VO

Solicitante: Dr. Leandro Fco. Fernández Pérez

Realizado por: Dra. Catalina Sierra Ramos



*Centro Atlántico del Medicamento, S.A.  
N.I.F.: A-38857595  
Avda Trinidad 61  
7ª Planta Torre Agustín Arévalo  
38204 La Laguna  
Tfno. : 822 102 653  
[www.ceamedsa.com](http://www.ceamedsa.com)*

## **ÍNDICE**

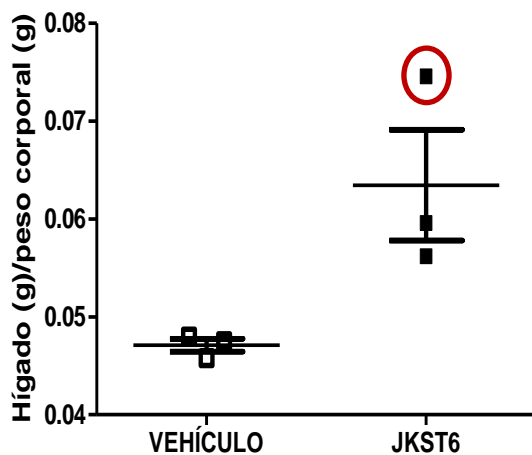
|   |   |
|---|---|
| 1. Antecedentes .....                       | 2 |
| 2. Descripción del proceso.....             | 3 |
| 3. Resultados estudio hepatotoxicidad ..... | 4 |

## 1. Antecedentes

El pasado 30 de agosto se analizaron los datos obtenidos durante la realización del Test de Irwin para el compuesto JKST6 administrado tanto vía oral como intraperitoneal.

En la administración **VO del compuesto JKST6 (50mg/kg)** no se registró ningún signo de toxicidad en el desarrollo del test de Irwin. Sin embargo, se observó una tendencia de aumento de tamaño del hígado en los animales tratados con compuesto. No obstante, no se observó cambio aparente a simple vista en el aspecto de este órgano durante la autopsia. Para saber si esta diferencia tiene repercusión fisiológica se recomendó la realización de un estudio histológico de este tejido y aumentar el número de animales a analizar.

**A**



**B**

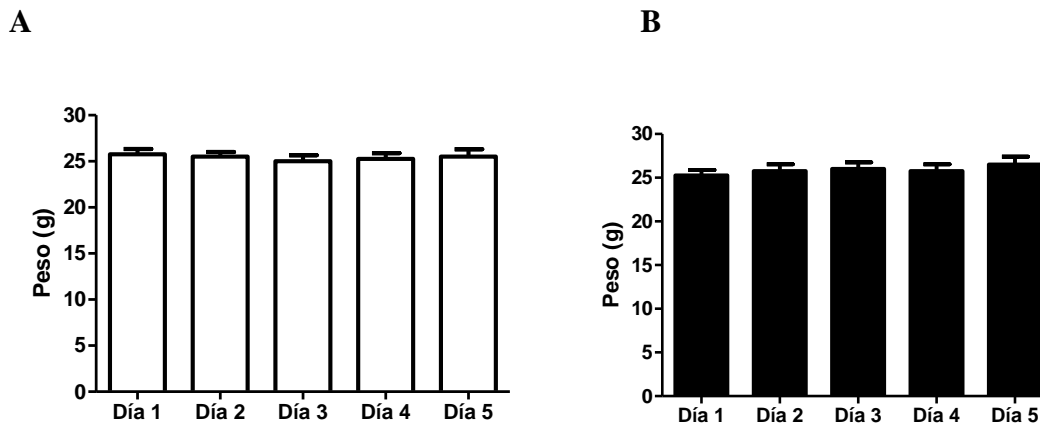
Media: 0.0635  
 SD:0.0098  
 Valor crítico de Z: 1.1543

| Valor  | Z      | Outlier significativo?                                 |
|--------|--------|--|
| 0.0562 | 0.7422 |  |
| 0.0596 | 0.3949 |  |
| 0.0746 | 1.1372 | Lejano del resto, pero no significativo ( $p > 0.05$ ) |

**Figura 1. (A)** Peso del hígado normalizado con el peso corporal de animales tratados con vehículo (DMA:0.5%MC; 10:90) o JKST6 (50mg/kg) VO (*Unpaired t test*  $p < 0.05$ , con corrección de *Welch*, puesto que las varianzas son significativamente diferentes). **(B)** Test de Grubbs o método ESD (*extreme studentized deviate*) para la determinación de *outliers*

## 2. Descripción del proceso

Durante 5 días se administró vehículo (DMA: 0,5%MC; 10:90) o compuesto (JKST6 50mg/kg) a 8 ratones FVB macho vía oral. Los animales fueron pesados cada día, no observándose cambios en el peso de los mismos con el vehículo (Figura 2A) o el compuesto (Figura 2B).



**Figura 2.** (A) Peso corporal animales tratados con vehículo VO (DMA:0.5%MC; 10:90). *One-way ANOVA, Bonferroni post-test, n=8.* (B) Peso corporal animales tratados con JKST6 VO (50mg/kg). *One-way ANOVA, Bonferroni post-test, n=8.*

Tras 5 días de administración de compuesto o vehículo los animales se anestesiaron en cámara inhalatoria de isoflurano. Una vez anestesiados se procedió a la apertura de los mismos para extracción sanguínea por punción cardiaca utilizando una aguja de calibre 23G. La sangre obtenida se recolectó en tubos *Sarstedt Li-Heparina*. Posteriormente se centrifugó a 1,500 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante (plasma) se recogió en tubos de 1,5ml y se congeló en nitrógeno líquido para posteriormente conservar a -80°C.

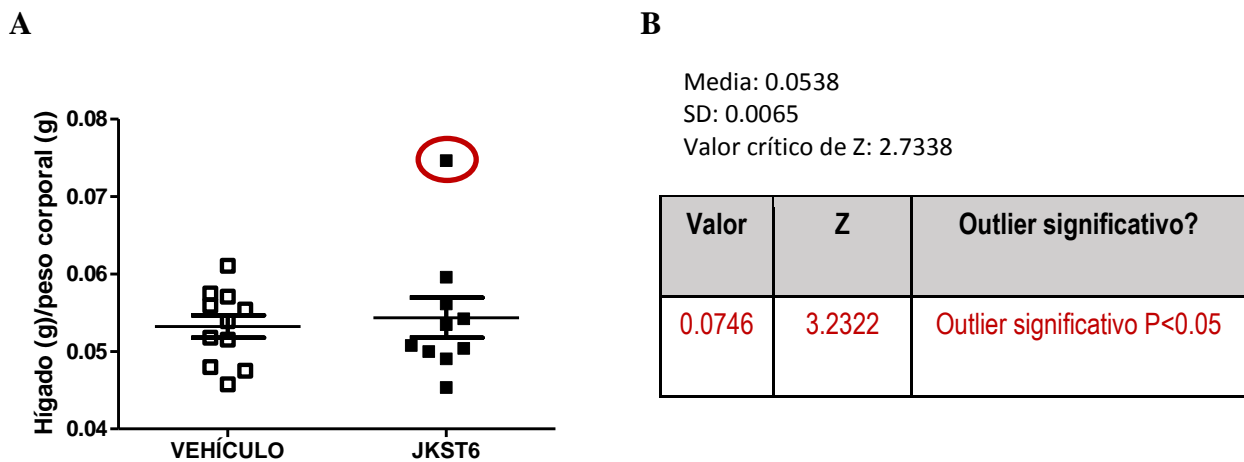
Posteriormente se procede a la valoración de los órganos vitales (bazo, páncreas, riñones, hígado y corazón), no observándose diferencias a simple vista entre los animales tratados con vehículo y tratados con JKST6. Durante la autopsia se observó compuesto en la porción terminal del intestino delgado de los individuos tratados con JKST6.

A continuación se extrajo el hígado, se lavó en solución salina fría y se secó en una gasa estéril. Posteriormente se pesó este órgano. El lóbulo mayor del hígado se fijó durante 24h en buffer de formol al 4% (VWR). Tras 24h de fijación las muestras se conservan en etanol al 70% separadas en casetes para inclusión en parafina. El resto del hígado se dividió en dos tubos de 1,5ml y se congeló en nitrógeno líquido, las muestras se conservan a -80°C para análisis de RNA o proteínas.

### 3. Resultados estudio hepatotoxicidad

A continuación se muestran los datos obtenidos para el peso del hígado normalizado con el peso corporal de cada individuo. Se muestran los valores obtenidos en este estudio junto a los obtenidos previamente en el Test de Irwin (Figura 3A y tabla 1). Hemos realizado un test de Grubbs para determinar si alguno de los datos de animales tratados con JKST6 ha de excluirse del análisis. Los resultados de este test nos indican que hay un valor que constituye un *outlier* significativo (Figura 3B).

De esta manera podemos concluir afirmando que no existen cambios significativos en el peso del hígado cuando los animales son tratados con JKST6 (50mg/kg) vía oral durante 5 días en comparación con los animales tratados con vehículo.



**Figura 3.** Peso del hígado normalizado con el peso corporal de animales tratados con vehículo VO (DMA:0.5%MC; 10:90) o JKST6 (50mg/kg) durante 5 días VO. (*Unpaired t* test  $p < 0.05$ ,  $n = 11$  para vehículo y  $N = 10$  para JKST6). (**B**) Test de Grubbs o método ESD (*extreme studentized deviate*) para la determinación de *outliers*.

| Ratón    | Tratamiento | Peso corporal (g) | Hígado(g) | Hígado/BW(g) |
|----------|-------------|-------------------|-----------|--------------|
| 1        | VEHÍCULO VO | 28                | 1,45      | 0,052        |
| 2        |             | 22                | 1,23      | 0,056        |
| 3        |             | 28                | 1,71      | 0,061        |
| 4        |             | 28                | 1,51      | 0,054        |
| 5        |             | 24                | 1,37      | 0,057        |
| 6        |             | 24                | 1,33      | 0,055        |
| 7        |             | 24                | 1,38      | 0,058        |
| 8        |             | 26                | 1,34      | 0,052        |
| 1(IRWIN) | VEHÍCULO VO | 26                | 1,19      | 0,046        |
| 2(IRWIN) |             | 30                | 1,44      | 0,048        |
| 3(IRWIN) |             | 20                | 0,95      | 0,048        |
| 1        | JKST6 VO    | 26                | 1,41      | 0,054        |
| 2        |             | 28                | 1,27      | 0,045        |
| 3        |             | 32                | 1,57      | 0,049        |
| 4        |             | 24                | 1,2       | 0,050        |
| 5        |             | 26                | 1,31      | 0,050        |
| 6        |             | 26                | 1,39      | 0,053        |
| 7        |             | 24                |           |              |
| 8        |             | 26                | 1,32      | 0,051        |
| 1(IRWIN) | JKST6 VO    | 26                | 1,46      | 0,056        |
| 2(IRWIN) |             | 24                | 1,43      | 0,060        |
| 3(IRWIN) |             | 28                | 2,09      | 0,075        |

**Tabla 1.** Valores de peso corporal y peso del hígado de animales tratados con vehículo VO (DMA:0.5%MC; 10:90) o JKST6 (50mg/kg) durante 5 días.

En La Laguna a 24 de Septiembre de 2018,



Firmado: Catalina Sierra Ramos PhD

## **Test de toxicidad sub-crónica del JKST6 en Balb/c.**

**Signos clínicos y seguimiento de consumo de agua y alimento.**









|                   | Fecha muestra  |               | Día 6 Intervención 29 JUNIO 2020 |                              | Día 7 Observación 30 JUNIO 2020 |               | Día 8 Intervención 01 JULIO 2020 |   |
|-------------------|--|---------------|----------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------|----------------------------------|---|
|                   | Tempo (min)  | 0-30 MIN POST | JAJULA 1 VEH MACHOS              | 5 HORAS POST 7:24H POST INTE | JAJULA 1 VEH MACHOS             | 16:30 HORAS P | 0-30 MIN POST                    | 60 MIN POST I/15 HORAS POST 24H POST INTE |
| Extradón          | Convulsiones   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Temor  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Cola Straub  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Excitación: marcada  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Excitación: moderada   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
| Esterotipia       | Excitación: ligera   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Saltos   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Incremento de la reactividad al tocar                                  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Aumento del miedo  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Aumento tono muscular  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
| Motor             | Agresión   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Presarse patas delanteras  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Contracciones nerviosas de la cabeza                                   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Esterotipia movimientos de la cabeza                                   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Esterotipia masticar   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
| Sedación          | Catalepsia   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Aquiescencia pérdida de movimientos trasornos de la marcha tambalearse |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Estrafase al andar   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Pérdida del equilibrio   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Pérdida de tracción  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
| Autonomía         | Disminución de la pérdida de agarre                                    |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Caminar de puntillas   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Pérdida de reflejos  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Pérdida de reflejo corneal   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Postura del cuerpo plana   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
| Otras medidas     | Sedación marcada   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Sedación moderada  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Sedación ligera  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Disminución del tono muscular  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Disminución de la reactividad al tocarlo                               |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
| Dolor             | Prosis Caída de los párpados superiores                                |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Exoftalmia (ojos hacia afuera)   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Miosis contracción permanente de la pupila                             |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Midriasis Dilatación de la pupila                                      |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Piloerección   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
| Escala de Grimace | Defecación/diarrea   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Sialivación  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Lacrimación  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Aumento de la respiración  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Disminución de la respiración  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
| Escala de Gimmace | Hipertermia  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Hipotermia   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Rascado  |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Muerte   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
|                   | Retrotrimiento   |               |                                  |                              |                                 |               |                                  |   |
| Analgésia         | 1) Estrechamiento ojos   | 2             | 1                                | 1                            | 0                               | 2             | 1                                | 0   |
|                   | 2) Abultamiento nariz  | 2             | 1                                | 1                            | 0                               | 2             | 1                                | 0   |
|                   | 3) Abultamiento de mejillas  | 0             | 1                                | 0                            | 0                               | 1             | 1                                | 0   |
|                   | 4) Posición de orejas  | 0             | 0                                | 1                            | 0                               | 0             | 0                                | 0   |
|                   | 5) Cambio en los bigotes   | 0             | 0                                | 0                            | 0                               | 0             | 0                                | 0   |

|                          | Dia 9 Observación 02 JULIO 2020            |             |                    | Dia 10 Intervención 03 JULIO 2020 |               |             | Dia 11 Observación 04 JULIO 2020                        |               |             |                |               |
|--------------------------|--|-------------|--------------------|-----------------------------------|---------------|-------------|---|---------------|-------------|----------------|---------------|
|                          | Fecha muestra                              | Tempo (min) | 09:00h (= que 24h) | 16:30 HORAS                       | Fecha muestra | Tempo (min) | 0-30 MIN POST 60 MIN POST 115 HORAS POST 24H POST INTER | Fecha muestra | Tempo (min) | 09:00h INTERV. | 16:30 HORAS P |
| Excitacion               | Convulsiones                               |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Temor                                      |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Cola Straub                                |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Excreción marcada                          |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Excitación: moderada                       |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
| Esterotipia              | Excitación: ligera                         |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Salto                                      |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Aumento del miedo                          |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Aumento tono muscular                      |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
| Motor                    | Agresión                                   |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Contracciones nerviosas de la cabeza       |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Esterotipia movimientos de la cabeza       |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Esterotipia oler                           |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
| Sedación                 | Catalepsia                                 |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Aquiescencia pérdida de movimientos        |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Trasornos de la marcha tambalearse         |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Estirarse al andar                         |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Pérdida del equilibrio                     |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
| Autonomía                | Pérdida de tracción                        |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Disminución de la pérdida de agarre        |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Carramar de pupilas                        |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Pérdida de reflejos                        |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Pérdida de reflejo corneal                 |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
| Dolor:                   | Postura del cuerpo plana                   |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Sedación marcada                           |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Sedación moderada                          |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Sedación ligera                            |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Disminución del tono muscular              |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
| Escala de Gimnase        | Disminución de la reactividad al tacto     |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Disminución del miedo                      |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
| Otras medidas            | Midriasis Dilatación de la pupila          |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Piloerecton                                |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Defecación/diarrea                         |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Salivación                                 |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | La erimación                               |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
| Dolor:                   | Aumento de la respiración                  |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Disminución de la respiración              |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Hipotermia                                 |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Rasado                                     |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Mueres                                     |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
| Escala de Gimnase        | Retorcimiento                              |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | Analgésia                                  |             |                    |                                   |               |             |   |               |             |                |               |
|                          | 1) Estrechamiento ojos                     | 0           | 0,5                | 0,5                               | 2             | 2           | 2   | 1,5           | 0,5         |                |               |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      | 0,5         | 0,5                | 0,5                               | 2             | 2           | 2   | 1             | 1           |                |               |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                | 0,5         | 0,5                | 0,5                               | 2             | 2           | 2   | 1             | 1           |                |               |
| 4) Posición de orejas    | 0,5  | 0,5         | 0,5                | 2                                 | 2             | 2           | 1   | 0,5           |             |                |               |
| 5) Cambio en los bigotes | 0  | 0           | 0                  | 0,5                               | 0,5           | 1           | 1   | 0,5           |             |                |               |





|                   | Fecha                                      |             | Dia 18 Observación 11 JULIO 2020 |                   | Dia 19 Observación 12 JULIO 2020 |             | Dia 20 Intervención 13 JULIO 2020 |                   |
|-------------------|--|-------------|----------------------------------|-------------------|----------------------------------|-------------|-----------------------------------|-------------------|
|                   | muestra                                    | Tempo (min) | 09:00h INTERV.                   | 16:30 HORAS P 24h | muestra                          | Tempo (min) | 09:00h INTERV.                    | 16:30 HORAS P 24h |
| Excitacion        | Convulsiones                               |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Tremor                                     |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Cola Straub                                |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Excitacion marcada                         |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Excitacion moderada                        |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
| Estereotipia      | Excitacion ligera                          |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Salto                                      |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Incremento de la reactividad al tocar      |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Aumento del miedo                          |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Aumento tono muscular                      |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
| Motor             | Agresion                                   |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Pisarse patas delanteras                   |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Contracciones rítmicas de la cabeza        |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Estereotipia movimientos de la cabeza      |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Estereotipia masticar                      |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
| Sedación          | Catalepsia                                 |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Aquiescencia pérdida de movimientos        |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Trastornos de la marcha tambalearse        |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Estivarse al andar                         |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Pérdida del equilibrio                     |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
| Autonomía         | Pérdida de tracción                        |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Disminución de la pérdida de agarre        |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Caminar de puntillas                       |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Pérdida de reflejos                        |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Pérdida de reflejo corneal                 |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
| Dolor             | Postura del cuerpo plana                   |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Sedación marcada                           |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Sedación moderada                          |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Sedación ligera                            |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Disminución del tono muscular              |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
| Escala de Girmace | Disminución de la reactividad al tacto     |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Prosis Caída de los párpados superiores    |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Exortalmia (Ojos hacia afuera)             |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Miosis contracción permanente de la pupila |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Miodesis Dilatación de la pupila           |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
| Otras medidas     | Piloerección                               |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Defecación/diarrea                         |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Salivación                                 |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Aumento de la respiración                  |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Disminución de la respiración              |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
| Dolor             | Hipotermia                                 |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Hipersudoración                            |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Muerte                                     |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Retorcimiento                              |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | Analgesia                                  |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
| Escala de Girmace | 1) Estrechamiento ojos                     |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | 2) Abultamiento nariz                      |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | 3) Abultamiento de mejillas                |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | 4) Posición de orejas                      |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |
|                   | 5) Cambio en los bigotes                   |             |                                  |                   |                                  |             |                                   |                   |

|                          | Dia 21 Observación 14 JULIO 2020           |             |                |                   | Dia 22 Intervención 15 JULIO 2020 |             |  |               | Dia 23 Observación 16 JULIO 2020 |                |                         |  |
|--------------------------|--|-------------|----------------|-------------------|-----------------------------------|-------------|--|---------------|----------------------------------|----------------|-------------------------|--|
|                          | Fecha muestra                              | Tempo (min) | 09:00h INTERV. | 19:30 HORAS P 24h | Fecha muestra                     | Tempo (min) | 0-30 MIN POST 60 MIN POST 115 HORAS POST 24H POST INTERV | Fecha muestra | Tempo (min)                      | 09:00h INTERV. | 16:30 HORAS P 24h 9:30h |  |
| Excitacion               | Convulsiones                               |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Temor                                      |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Cola Straub                                |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Excitacion marcada                         |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Excitacion moderada                        |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Estereotipia             | Excitacion ligera                          |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Salto                                      |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Aumento del miedo                          |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Aumento tono muscular                      |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Motor                    | Agresion                                   |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Contracciones nerviosas de la cabeza       |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Estereotipia movimientos de la cabeza      |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Estereotipia masticar                      |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Sedacion                 | Cataplexia                                 |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Aquiescencia perdida de movimientos        |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Trasornos de la marcha tambalearse         |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Estirarse al andar                         |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Perdida del equilibrio                     |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Autonomia                | Perdida de traccion                        |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Disminucion de la perdida de agarre        |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Caminar de puntillas                       |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Perdida de reflejos                        |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Perdida de reflejo corneal                 |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Dolor                    | Postura del cuerpo plana                   |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Sedacion marcada                           |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Sedacion moderada                          |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Sedacion ligera                            |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Disminucion del tono muscular              |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Escala de Gimnase        | Disminucion de la reactividad al tacto     |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Disminucion del miedo                      |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Otras medidas            | Midriasis Dilatación de la pupila          |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Piloerecton                                |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Defecacion/diarrea                         |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Salivacion                                 |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | La erimacion                               |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Dolor                    | Aumento de la respiración                  |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Disminución de la respiración              |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Hipotermia                                 |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Rasado                                     |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Muerte                                     |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Escala de Gimnase        | Retorquimiento                             |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | Analgesia                                  |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                          | 1) Estrechamiento ojos                     | 0,5         | 0              | 0,5               | 0                                 | 1           | 0,5  | 0,5           | 0,5                              | 0              | 0                       |  |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      | 0           | 0              | 0                 | 0                                 | 1           | 0,5  | 0,5           | 0,5                              | 0              | 0                       |  |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                | 0           | 0              | 0                 | 0                                 | 1           | 0,5  | 0,5           | 0,5                              | 0              | 0                       |  |
| 4) Posición de orejas    | 0  | 0           | 0              | 0                 | 1                                 | 0,5         | 0  | 0             | 0                                | 0              |                         |  |
| 5) Cambio en los bigotes | 0  | 0           | 0              | 0                 | 1                                 | 0,5         | 0  | 0             | 0                                | 0              |                         |  |





|                          | Fecha muestra                              |     | Dia 27 Intervención 20 JULIO 2020 |   | Fecha muestra |     | Dia 28 Observación 21 JULIO 2020 |     | Fecha muestra |  | Dia 29 Intervención 22 JULIO 2020 |  |
|--------------------------|--|-----|-----------------------------------|---|---------------|-----|----------------------------------|-----|---------------|--|-----------------------------------|--|
|                          | Tempo (min)                                |     | Tempo (min)                       |   | Tempo (min)   |     | Tempo (min)                      |     | Tempo (min)   |  | Tempo (min)                       |  |
| Excitacion               | Convulsiones                               |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Temor                                      |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Cara Straub                                |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Excitacion: marcada                        |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Excitacion: moderada                       |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Excitacion: ligera                         |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Salto                                      |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Aumento del miedo                          |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Aumento tono muscular                      |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
| Estereotipia             | Agresion                                   |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Contracciones nervosas de la cabeza        |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Estereotipia movimientos de la cabeza      |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Estereotipia masticar                      |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
| Motor                    | Estereotipia oler                          |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Catalepsia                                 |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Aquiescia perdida de movimientos           |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Trastornos de la marcha tambalearse        |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Estrarse al andar                          |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Perdida de equilibrio                      |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
| Sedacion                 | Perdida de traccion                        |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Disminucion de la perdida de agarre        |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Caminar de puntillas                       |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Perdida de reflejos                        |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Perdida de reflejo corneal                 |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Postura del cuerpo plana                   |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Sedacion marcada                           |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Sedacion moderada                          |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Sedacion ligera                            |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Disminucion del tono muscular              |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
| Autonomia                | Disminucion de la reactividad al tacto     |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Disminucion del miedo                      |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Midriasis Dilatación de la pupila          |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Piloerecton                                |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Defecacion/diarrea                         |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Salivacion                                 |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Lacrimacion                                |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
| Otras medidas            | Aumento de la respiracion                  |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Disminucion de la respiracion              |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Hipertermia                                |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Hipotermia                                 |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Rascado                                    |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
| Dolor:                   | Muerte                                     |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | Refortoramiento                            |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
| Escala de Grimace        | Analgesia                                  |     |                                   |   |               |     |                                  |     |               |  |                                   |  |
|                          | 1  Estrechamiento ojos                     | 0.5 | 0                                 | 0 | 0             | 0.5 | DESCANSO                         | 0.5 |               |  |                                   |  |
|                          | 2  Abultamiento nariz                      | 1   | 0.5                               | 0 | 0             | 0.5 |                                  | 0.5 |               |  |                                   |  |
|                          | 3  Abultamiento de mejillas                | 1   | 0.5                               | 0 | 0             | 0.5 |                                  | 0.5 |               |  |                                   |  |
|                          | 4  Dificultad de oídos                     | 0.5 | 0.5                               | 0 | 0             | 0.5 |                                  | 0.5 |               |  |                                   |  |
| 5  Cambio en los bigotes | 0  | 0   | 0.5                               | 0 | 0.5           |     | 0.5                              |     |               |  |                                   |  |





|                             | Día 6 Intervención 29 JUNIO 2020           |               |             |                | Día 7 Observación 30 JUNIO 2020 |      |               |         | Día 8 OBSERVACIÓN 01 JULIO 2020 |               |               |             |                |          |      |
|-----------------------------|--|---------------|-------------|----------------|---------------------------------|------|---------------|---------|---------------------------------|---------------|---------------|-------------|----------------|----------|------|
|                             | Fecha muestra                              | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 115 HORAS POST | 24H POST                        | INTE | Fecha muestra | 09-00h. | 16:30 HORAS                     | Fecha muestra | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 115 HORAS POST | 24H POST | INTE |
| Excitación                  | Convulsiones                               |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Temor                                      |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Cara Straub                                |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Excitación marcada                         |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Excitación: moderada                       |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
| Estereotipia                | Excitación: ligera                         |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Salto                                      |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Incremento de la reactividad al tocar      |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Aumento del miedo                          |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Aumento tono muscular                      |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
| Motor                       | Agrasión                                   |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Pisarse patas delanteras                   |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Contracciones nerviosas de la cabeza       |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Estereotipia movimientos de la cabeza      |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Estereotipia masticar                      |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
| Sedación                    | Estereotipia oler                          |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Catalepsa                                  |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Aquiescencia pérdida de movimientos        |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Trastornos de la marcha tambalearse        |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Estirarse al andar                         |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
| Autonomía                   | Pérdida de equilibrio                      |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Pérdida de tracción                        |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Disminución de la pérdida de agarre        |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Caminar de puntillas                       |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Pérdida de reflejos                        |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
| Dolor:                      | Pérdida de reflejo corneal                 |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Postura del cuerpo plana                   |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Sedación marcada                           |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Sedación moderada                          |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Sedación ligera                            |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
| Escala de Gimnase           | Disminución del tono muscular              |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Disminución de la reactividad al tacto     |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Prosis Caída de los párpados superiores    |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Miosis contracción permanente de la pupila |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
| Otras medidas               | Midriasis Dilatación de la pupila          |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Piloerecton                                |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Defecación/diarrea                         |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Salivación                                 |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | La orinación                               |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
| Dolor:                      | Aumento de la respiración                  |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Disminución de la respiración              |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Hipertermia                                |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Hipotermia                                 |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Rasgado                                    |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
| Escala de Gimnase           | Muerte                                     |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Reforzamiento                              |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | Analgésia                                  |               |             |                |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |                |          |      |
|                             | 1) Estrechamiento ojos                     | 2             | 1           | 1              | 0,5                             | 2    | 1             | 1       | 0                               | 2             | 2             | 2           | 0,5            |          |      |
|                             | 2) Abultamiento nariz                      | 2             | 1           | 1              | 0,5                             | 2    | 1             | 1       | 0                               | 2             | 2             | 2           | 0,5            |          |      |
| 3) Abultamiento de mejillas | 2  | 1             | 1           | 0,5            | 2                               | 1    | 1             | 0,5     | 2                               | 2             | 2             | 0,5         |                |          |      |
| 4) Posición de orejas       | 2  | 1             | 1           | 0,5            | 2                               | 1    | 1             | 0,5     | 2                               | 2             | 2             | 0,5         |                |          |      |
| 5) Cambio en los bigotes    | 1  | 0             | 0           | 0              | 1                               | 0    | 0             | 0       | 2                               | 2             | 2             | 0           |                |          |      |

|                          | Fecha muestra                              |          | Dia 9 Observación 02 JULIO 2020 |             | Dia 10 Intervención 03 JULIO 2020                         |             | Dia 11 Observación 04 JULIO 2020 |               |
|--------------------------|--|----------|---------------------------------|-------------|---|-------------|----------------------------------|---------------|
|                          | Tempo (min)                                | 09:00h . | 16:30 HORAS                     | Tempo (min) | 0-30 MIN POST 60 MIN POST 115 HORAS POST 24H POST INTERV. | Tempo (min) | 08:00h INTERV.                   | 16:30 HORAS P |
| <b>Excitacion</b>        | Convulsiones                               |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Temor                                      |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Cola Straub                                |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Excitacion: marcada                        |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Excitacion: moderada                       |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
| <b>Esterotipia</b>       | Excitacion: ligera                         |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Saltos                                     |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Aumento del miedo                          |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Aumento tono muscular                      |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
| <b>Motor</b>             | Agresion                                   |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Contracciones nerviosas de la cabeza       |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Esterotipia movimientos de la cabeza       |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Esterotipia masticar                       |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
| <b>Sedacion</b>          | Catatonias                                 |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Aquinesia perdida de movimientos           |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Trasarnos de la marcha tambalearse         |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Estirarse al andar                         |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Perdida del equilibrio                     |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
| <b>Autonomia</b>         | Perdida de traccion                        |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Disminucion de la perdida de agarre        |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Caminar de puntillas                       |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Perdida de reflejos                        |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Perdida de reflejo corneal                 |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
| <b>Dolor</b>             | Postura del cuerpo plana                   |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Sedacion marcada                           |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Sedacion moderada                          |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Sedacion ligera                            |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Disminucion del tono muscular              |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
| <b>Escala de Gimnace</b> | Disminucion de la reactividad al tocarlo   |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Miodesis Dilatación de la pupila           |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
| <b>Otras medidas</b>     | Piloerecton                                |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Defecación/diarrea                         |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Salivación                                 |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Aumento de la respiración                  |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Disminución de la respiración              |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
| <b>Escala de Gimnace</b> | Hipotermia                                 |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Rasado                                     |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Muerte                                     |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Reforzamiento                              |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
|                          | Analgesia                                  |          |                                 |             |   |             |                                  |               |
| <b>Escala de Gimnace</b> | 1) Estrechamiento ojos                     | 0.5      | 1                               | 0.5         | 2   | 2           | 2                                |               |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      | 0.5      | 1                               | 0.5         | 2   | 2           | 2                                |               |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                | 0.5      | 1                               | 0.5         | 2   | 2           | 2                                |               |
|                          | 4) Posición de orejas                      | 0.5      | 0                               | 0.5         | 2   | 2           | 1                                |               |
|                          | 5) Cambio en los bigotes                   | 0        | 0                               | 0           | 1   | 1           | 1                                |               |



|                          | Fecha muestra                              |               | Día 15 Intervención 08 JULIO 2020 |               | Fecha muestra |            | Día 16 Observación 09 JULIO 2020 |                   | Fecha muestra |               |
|--------------------------|--|---------------|-----------------------------------|---------------|---------------|------------|----------------------------------|-------------------|---------------|---------------|
|                          | Tempo (min)                                | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST                       | 15 HORAS POST | 24H POST      | INTE       | 09-00h INTERV.                   | 16:30 HORAS P 24h | Tempo (min)   | 0-30 MIN POST |
| Excitacion               | Convulsiones                               |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Temor                                      |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Cola Straub                                |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Excreción marcada                          |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Excitación: moderada                       |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
| Esterotipia              | Excitación: ligera                         |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Salto                                      |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Aumento del miedo                          |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Aumento tono muscular                      |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
| Motor                    | Agrasión                                   |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Contracciones nerviosas de la cabeza       |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Esterotipia movimientos de la cabeza       |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Esterotipia masticar                       |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
| Sedación                 | Catálisis                                  |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Aquinesia pérdida de movimientos           |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Trasornos de la marcha tambalearse         |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Estarse al andar                           |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Pérdida del equilibrio                     |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
| Autonomía                | Pérdida de tracción                        |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Disminución de la pérdida de agarre        |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Caminar de puntillas                       |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Pérdida de reflejos                        |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Pérdida de reflejo corneal                 |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
| Escala de Gimnase        | Postura del cuerpo plana                   |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Sedación marcada                           |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Sedación moderada                          |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Sedación ligera                            |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Disminución del tono muscular              |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
| Otras medidas            | Disminución de la reactividad al tocarlo   |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Disminución del miedo                      |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Moisis contracción permanente de la pupila |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
| Dolor:                   | Midriasis Dilatación de la pupila          |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Piloerección                               |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Defecación/diarrea                         |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Salivación                                 |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Aumento de la respiración                  |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
| Escala de Gimnase        | Disminución de la respiración              |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Hipotermia                                 |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Rasgado                                    |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Muerte                                     |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | Reforzamiento                              |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
| Escala de Gimnase        | Analgesia                                  |               |                                   |               |               |            |                                  |                   |               |               |
|                          | 1) Estrechamiento ojos                     | 2             | 1                                 | 1             | 0,5           | deca:ansan | 0                                | 2                 | 0,5           | deca:ansan    |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      | 2             | 1                                 | 1             | 0,5           | deca:ansan | 0,5                              | 2                 | 0,5           | deca:ansan    |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                | 2             | 1                                 | 1             | 0,5           | deca:ansan | 0,5                              | 2                 | 0,5           | deca:ansan    |
|                          | 4) Posición de orejas                      | 2             | 1                                 | 1             | 0,5           | deca:ansan | 0                                | 1                 | 0,5           | deca:ansan    |
| 5) Cambio en los bigotes | 2  | 1             | 1                                 | 0             | deca:ansan    | 0          | 1                                | 0,5               | deca:ansan    |               |

|                          | Fecha muestra                              |                | Dia 18 Observación 11 JULIO 2020 |             | Dia 19 Observación 12 JULIO 2020 |                   | Dia 20 Intervención 13 JULIO 2020 |  |
|--------------------------|--|----------------|----------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|--|
|                          | Tempo (min)                                | 09:00h INTERV. | 16:30 HORAS P 24h                | Tempo (min) | 09:00h INTERV.                   | 16:30 HORAS P 24h | Tempo (min)                       | 0-30 MIN POST 60 MIN POST 115 HORAS POST 24H POST INTE |
| Excitacion               | Convulsiones                               |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Tremor                                     |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Cola Straub                                |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Excitacion marcada                         |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Excitacion moderada                        |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| Estereotipia             | Excitacion ligera                          |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Salto                                      |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Aumento del miedo                          |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Aumento tono muscular                      |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| Motor                    | Agresion                                   |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Contracciones rítmicas de la cabeza        |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Estereotipia movimientos de la cabeza      |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Estereotipia masticar                      |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| Sedación                 | Catalepsia                                 |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Aquiescencia pérdida de movimientos        |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Trastornos de la marcha tambalearse        |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Estivarse al andar                         |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Pérdida del equilibrio                     |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| Autonomía                | Pérdida de tracción                        |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Disminución de la pérdida de agarre        |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Caminar de puntillas                       |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Pérdida de reflejos                        |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Pérdida de reflejo corneal                 |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| Dolor                    | Postura del cuerpo plana                   |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Sedación marcada                           |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Sedación moderada                          |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Sedación ligera                            |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Disminución del tono muscular              |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| Escala de Girmace        | Disminución de la reactividad al tacto     |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Exortalmia (Ojos hacia afuera)             |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Miodesis Dilatación de la pupila           |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| Otras medidas            | Piloerección                               |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Defecación/diarrea                         |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Salivación                                 |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Aumento de la respiración                  |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Disminución de la respiración              |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| Dolor                    | Hipotermia                                 |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Hipertermia                                |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Resacado                                   |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Muerte                                     |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | Retorcimiento                              |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| Escala de Girmace        | Analgésia                                  |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | 1) Estrechamiento ojos                     |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
|                          | 4) Posición de orejas                      |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |
| 5) Cambio en los bigotes |  |                |                                  |             |                                  |                   |                                   |  |



|                          | Fecha muestra                              |              | Día 21 Observación 14 JULIO 2020 |                   | Día 22 Intervención 15 JULIO 2020 |             | Día 23 Observación 16 JULIO 2020 |               |
|--------------------------|--|--------------|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------|----------------------------------|---------------|
|                          | Fecha muestra                              | Tiempo (min) | 09:00h INTERV.                   | 19:30 HORAS P 24h | 0-30 MIN POST                     | 60 MIN POST | 115 HORAS POST                   | 24H POST INTÉ |
| <b>Excitadón</b>         | Convulsiones                               |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Temor                                      |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Cola Straub                                |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Excitación: marcada                        |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Excitación: moderada                       |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
| <b>Etereoibla</b>        | Excitación: ligera                         |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Salto                                      |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Aumento del miedo                          |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Aumento tono muscular                      |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
| <b>Motor</b>             | Agresión                                   |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Contracciones nerviosas de la cabeza       |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Esterotopia movimientos de la cabeza       |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Esterotopia oler                           |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
| <b>Sedación</b>          | Catalepsia                                 |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Aquiescencia pérdida de movimientos        |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Trastornos de la marcha tambalearse        |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Estirarse al andar                         |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Pérdida del equilibrio                     |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
| <b>Otras medidas</b>     | Pérdida de tracción                        |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Disminución de la pérdida de agarre        |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Caminar de puntillas                       |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Pérdida de reflejos                        |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Pérdida de reflejo corneal                 |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
| <b>Dolor</b>             | Postura del cuerpo plana                   |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Sedación marcada                           |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Sedación moderada                          |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Sedación ligera                            |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Disminución del tono muscular              |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
| <b>Autonomía</b>         | Disminución de la reactividad al tacto     |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Disminución del miedo                      |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
| <b>Escala de Gimnase</b> | Midriasis Dilatación de la pupila          |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | ptosis                                     |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Defecación/diarrea                         |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Salivación                                 |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Aumento de la respiración                  |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
| <b>Analgesia</b>         | Disminución de la respiración              |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Hipotermia                                 |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Rasado                                     |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Muerte                                     |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
|                          | Retorcimiento                              |              |                                  |                   |                                   |             |                                  |               |
| <b>decaño</b>            | 1) Estrechamiento ojos                     | 0            | 0,5                              | 0                 | 0,5                               | 0,5         | 0,5                              | 0,5           |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      | 0            | 0,5                              | 0                 | 0,5                               | 0,5         | 0,5                              | 0,5           |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                | 0            | 0,5                              | 0                 | 0,5                               | 0,5         | 0,5                              | 0,5           |
|                          | 4) Posición de orejas                      | 0            | 0,5                              | 0                 | 0,5                               | 0,5         | 0,5                              | 0,5           |
|                          | 5) Cambio en los bigotes                   | 0            | 0,5                              | 0                 | 0,5                               | 0,5         | 0,5                              | 0,5           |



|                           | Dia 27 Intervención 20 JULIO 2020          |               |             |                | Dia 28 Observación 21 JULIO 2020 |          |               |               | Dia 29 Intervención 22 JULIO 2020 |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|---------------------------|--|---------------|-------------|----------------|----------------------------------|----------|---------------|---------------|-----------------------------------|----------------|----------|------|---------------|---------------|-------------|----------------|----------|------|--|
|                           | Fecha muestra                              | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 1 5 HORAS POST | 24H POST                         | INTE     | Fecha muestra | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST                       | 1 5 HORAS POST | 24H POST | INTE | Fecha muestra | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 1 5 HORAS POST | 24H POST | INTE |  |
| Estroptia                 | Convulsiones:                              |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Temor                                      |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Cola Straub                                |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Excitación marcada                         |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Excitación: moderada                       |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
| Excitación                | Excitación: ligera                         |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Salto                                      |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Incremento de la reactividad al tocar      |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Aumento del miedo                          |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Aumento tono muscular                      |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
| Estroptia                 | Agresión                                   |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Prisarse patas delanteras                  |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Contracciones nerviosas de la cabeza       |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Estroptia movimientos de la cabeza         |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Estroptia mastilar                         |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
| Motor                     | Estroptia oler                             |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Catalepsia                                 |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Aquiescia pérdida de movimientos           |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Trastornos de la marcha tambalearse        |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Estirarse al andar                         |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
| Sedación                  | Pérdida de equilibrio                      |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Pérdida de tracción                        |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Disminución de la pérdida de agarre        |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Cambiar de pupilas                         |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Pérdida de reflejos                        |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
| Autonomía                 | Pérdida de reflejo corneal                 |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Postura del cuerpo plana                   |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Sedación marcada                           |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Sedación moderada                          |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Sedación ligera                            |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
| Otras medidas             | Disminución del tono muscular              |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Disminución de la reactividad al tacto     |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Disminución del miedo                      |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Prosis Calda de los párpados superiores    |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
| Dolor                     | Miosis contracción permanente de la pupila |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Midriasis Dilatación de la pupila          |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Piloerección                               |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Defecación/diarrea                         |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Salivación                                 |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
| Escala de Gimnase         | Aumento de la respiración                  |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Disminución de la respiración              |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Hipertermia                                |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Resaca                                     |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Muerte                                     |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
| Escala de Gimnase         | Retorcimiento                              |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | Analgesia                                  |               |             |                |                                  |          |               |               |                                   |                |          |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | 1 1 Estrechamiento ojos                    | 2             | 1           | 1              | 1                                | 0        | descanso      | 2             | 1                                 | 1              | DESCANSO |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | 2 3 Abultamiento nariz                     | 2             | 1           | 1              | 1                                | 0        | descanso      | 2             | 1                                 | 1              | 0        |      |               |               |             |                |          |      |  |
|                           | 4 5 Posición de orejas                     | 2             | 1           | 1              | 1                                | 0        | descanso      | 2             | 1                                 | 1              | 0        |      |               |               |             |                |          |      |  |
| 5 6 Cambio en los bigotes | 1  | 1             | 1           | 1              | 0                                | descanso | 2             | 1             | 1                                 | 0              |          |      |               |               |             |                |          |      |  |

**Tabla del test de toxicidad sub-crónica vía intraperitoneal:  
Balb/c hembras vehículo (DMSO:PEG400:SALINO; 10:40:50).**

| CODIGO COLOR                 | CADA GRUPO EXPERIMENTAL SON 5 INDIVIDUOS   | Fecha                           |              | Dia 1 Intervencion 24 JUNIO 2020 |                     | Dia 2 Observación 25 JUNIO 2020 |                     |
|------------------------------|--|---------------------------------|--------------|----------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|
|                              |  | muestra                         | tiempo (min) | Jaula 3 VEH HEMBRAS              | Jaula 3 VEH HEMBRAS | Jaula 3 VEH HEMBRAS             | Jaula 3 VEH HEMBRAS |
| ESCALA DE GRINACE            |  | 0: UNIDAD DE ACCION NO PRESENTE |              | 60 MIN POST INTES HORAS POST INT |                     | 16.30 HORAS P                   |                     |
| 1: U.A. MODERADAMENTE VISIBL |  | 0-30 MIN POST IW                |              | 24H POST INTERV                  |                     |                                 |                     |
| 2: U.A. SEVERO               |  | muestra                         |              | muestra                          |                     |                                 |                     |
|                              |  | 0-30 MIN POST IW                |              | 09:00h INTERV.                   |                     |                                 |                     |
|                              |  | muestra                         |              | muestra                          |                     |                                 |                     |
|                              |  | 0-30 MIN POST IW                |              | 16.30 HORAS P                    |                     |                                 |                     |
|                              |  | muestra                         |              | muestra                          |                     |                                 |                     |
| Excitación                   | Convulsiones                               |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Tremor                                     |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Cola Straub                                |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Excitación marcada                         |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Excitación moderada                        |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
| Esterotipia                  | Excitación ligera                          |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Salto                                      |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Incremento de la reactividad al tocar      |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Aumento del miedo                          |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Aumento tono muscular                      |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
| Motor                        | Piarse patas delanteras                    |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Contracciones nerviosas de la cabeza       |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Esterotipia movimientos de la cabeza       |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Esterotipia mastigar                       |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Esterotipia oler                           |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
| Sedación                     | Catalepsia                                 |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Aquilinea pérdida de movimientos           |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Trasarnos de la marcha tambalearse         |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Estrarse al andar                          |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Pérdida del equilibrio                     |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
| Autonomía                    | Pérdida de tracción                        |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Disminución de la pérdida de agarre        |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Garrinar de puntillas                      |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Pérdida de reflejos                        |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Pérdida de reflejo corneal                 |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
| Dolor:                       | Postura del cuerpo plana                   |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Sedación marcada                           |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Sedación moderada                          |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Sedación ligera                            |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Disminución del tono muscular              |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
| Otras medidas                | Disminución de la reactividad al tocarlo   |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Disminución del miedo                      |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Prosis Caída de los párpados superiores    |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Miosis contracción permanente de la pupila |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
| Escala de Grinace            | Midriasis Dilatación de la pupila          |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Piloerectio                                |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Defecación/diarrea                         |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Salivación                                 |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | La erimación                               |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
| Dolor:                       | Aumento de la respiración                  |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Disminución de la respiración              |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Hipertermia                                |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Hipotermia                                 |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Rascado                                    |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
| Dolor:                       | Muerte                                     |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Retorquimiento                             |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | Analgesia                                  |                                 |              |                                  |                     |                                 |                     |
|                              | 1) Estrechamiento ojos                     | 2                               | 0            | 0                                | 2                   | 0                               | 0                   |
|                              | 2) Abultamiento nariz                      | 2                               | 0            | 0                                | 2                   | 0                               | 0                   |
| 3) Abultamiento de mejillas  | 2  | 0                               | 0            | 0                                | 0                   | 0                               |                     |
| 4) Posición de orejas        | 2  | 0                               | 0            | 0                                | 0                   | 0                               |                     |
| 5) Cambio en los bigotes     | 2  | 0                               | 0            | 0                                | 0                   | 0                               |                     |

|                          | Fecha muestra                              |             | Día 3 Intervención 26 JUNIO 2020 |          | Día 4 Observación 27 JUNIO 2020 |               | Día 5 Observación 28 JUNIO 2020 |               |
|--------------------------|--|-------------|----------------------------------|----------|---------------------------------|---------------|---------------------------------|---------------|
|                          | 0-30 MIN POST                              | 60 MIN POST | 15 HORAS POST                    | 24H POST | 09:00h INTERV.                  | 16:30 HORAS P | 09:00h INTERV.                  | 16:30 HORAS P |
| <b>Excitacion</b>        | Convulsiones                               |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Temor                                      |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Colis Straub                               |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Excitacion: marcada                        |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Excitacion: moderada                       |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
| <b>Esterotipia</b>       | Excitacion: ligera                         |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Salto                                      |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Aumento del miedo                          |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Aumento tono muscular                      |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
| <b>Motor</b>             | Agresion                                   |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Contracciones nerviosas de la cabeza       |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Esterotipia movimientos de la cabeza       |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Esterotipia masticar                       |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
| <b>Sedacion</b>          | Catalsia                                   |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Aquiescia perdida de movimientos           |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Trasornos de la marcha tambalearse         |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Estirarse al andar                         |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Perdida del equilibrio                     |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
| <b>Autonomia</b>         | Perdida de traccion                        |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Disminucion de la perdida de agarre        |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Caminar de puntillas                       |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Perdida de reflejos                        |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Perdida de reflejo corneal                 |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
| <b>Otras medidas</b>     | Postura del cuerpo plana                   |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Sedacion marcada                           |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Sedacion moderada                          |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Sedacion ligera                            |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Disminucion del tono muscular              |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
| <b>Dolor</b>             | Disminucion de la reactividad al tocarlo   |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Disminucion del miedo                      |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
| <b>Escala de Gimnace</b> | Midriasis Dilatación de la pupila          |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Piloerecton                                |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Defecacion/diarrea                         |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Salivacion                                 |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | La crimacion                               |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
| <b>Escala de Gimnace</b> | Aumento de la respiracion                  |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Disminucion de la respiracion              |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Hipotermia                                 |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Resaca                                     |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Muerte                                     |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
| <b>Escala de Gimnace</b> | Reforzamiento                              |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | Analgesia                                  |             |                                  |          |                                 |               |                                 |               |
|                          | 1) Estrechamiento ojos                     | 1           | 1                                | 0        |                                 |               |                                 | 1             |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      | 2           | 2                                | 0        |                                 |               |                                 | 1             |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                | 1           | 1                                | 0        |                                 |               |                                 | 1             |
| 4) Posicion de orejas    | 1  | 1           | 0                                |          |                                 |               | 1                               |               |
| 5) Cambio en los bigotes | 0  | 0           | 0                                |          |                                 |               | 1                               |               |

|                   | Día 6 Intervención 29 JUNIO 2020           |               |             |               |          | Día 7 Observación 30 JUNIO 2020 |               |        |                     |             | Día 8 OBSERVACION 01 JULIO 2020 |               |             |               |          |      |
|-------------------|--|---------------|-------------|---------------|----------|---------------------------------|---------------|--------|---------------------|-------------|---------------------------------|---------------|-------------|---------------|----------|------|
|                   | fecha muestra                              | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 15 HORAS POST | 24H POST | INTE                            | fecha muestra | 09:00h | JAUJA 3 VEH HEMBRAS | 16:30 HORAS | fecha muestra                   | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 15 HORAS POST | 24H POST | INTE |
| Excitación        | Convulsiones                               |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Temor                                      |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Cola Straub                                |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Excitación marcada                         |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Excitación moderada                        |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Excitación ligera                          |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Salto                                      |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Incremento de la reactividad al tocar      |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Aumento del miedo                          |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Aumento tono muscular                      |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
| Agresión          |  |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
| Esterotipia       | Pasarse patas delanteras                   |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Contracciones nerviosas de la cabeza       |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Esterotipia movimientos de la cabeza       |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Esterotipia masticar                       |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
| Motor             | Catálensia                                 |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Aquiescia pérdida de movimientos           |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Trasorno de la marcha tambalearse          |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Estirarse al andar                         |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Pérdida del equilibrio                     |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Pérdida de tracción                        |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Disminución de la pérdida de agarre        |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Caminar de puntillas                       |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Pérdida de reflejos                        |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Pérdida de reflejo corneal                 |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
| Sedación          | Postura del cuerpo plana                   |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Sedación marcada                           |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Sedación moderada                          |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Sedación ligera                            |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
| Autonomía         | Disminución del tono muscular              |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Disminución de la reactividad al tacto     |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Disminución del miedo                      |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Prosis caída de los párpados superiores    |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Miosis contracción permanente de la pupila |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Midriasis Dilatación de la pupila          |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Piloerección                               |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Defecación/diarrea                         |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Salivación                                 |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
| Otras medidas     | Aumento de la respiración                  |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Disminución de la respiración              |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Hipertermia                                |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Hipotermia                                 |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
| Dolor:            | Rascado                                    |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Muerde                                     |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
| Escala de Gimnase | Retorcimiento                              |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | Analgésia                                  |               |             |               |          |                                 |               |        |                     |             |                                 |               |             |               |          |      |
|                   | 1) Estrechamiento ojos                     | 2             | 2           | 1             | 1        | 1                               | 0,5           | 0,5    | 0,5                 | 2           | 2                               | 2             | 2           | 2             | 0,5      |      |
|                   | 2) Abultamiento nariz                      | 2             | 2           | 1             | 1        | 1                               | 0,5           | 0,5    | 0,5                 | 2           | 2                               | 2             | 2           | 2             | 0,5      |      |
| Escala de Gimnase | 3) Abultamiento de mejillas                | 2             | 2           | 1             | 1        | 0                               | 0             | 0      | 0                   | 2           | 2                               | 2             | 2           | 2             | 0,5      |      |
|                   | 4) Posición de orejas                      | 1             | 1           | 0,5           | 0,5      | 0                               | 0,5           | 0,5    | 0,5                 | 1,5         | 1,5                             | 1,5           | 1,5         | 1,5           | 0,5      |      |
|                   | 5) Cambio en los bigotes                   | 1             | 1           | 0,5           | 0,5      | 0                               | 0             | 0      | 0                   | 1           | 1                               | 1             | 1           | 1             | 0        |      |

|                             | Dia 9 Observación 02 JULIO 2020                                       |             |          |             | Dia 10 Intervención 03 JULIO 2020 |               |             |               | Dia 11 Observación 04 JULIO 2020 |                |          |       |             |                |               |
|-----------------------------|---|-------------|----------|-------------|-----------------------------------|---------------|-------------|---------------|----------------------------------|----------------|----------|-------|-------------|----------------|---------------|
|                             | Fecha muestra   | Tempo (min) | 09:00h . | 16:30 HORAS | 24h                               | Fecha muestra | Tempo (min) | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST                      | 115 HORAS POST | 24H POST | INTER | Tempo (min) | 09:00h INTERV. | 16:30 HORAS P |
| Excitacion                  | Conmulsiones  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Cola Straub   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Excitacion: marcada   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Excitacion: moderada  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Excitacion: ligera  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
| Estereotipia                | Salto   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Incremento de la reactividad al tocar                                 |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Aumento del miedo   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Aumento tono muscular   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Agresion  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
| Motor                       | Pisarse patas delanteras  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Contracciones nerviosas de la cabeza                                  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Estereotipia movimientos de la cabeza                                 |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Estereotipia oler   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Cataplexia  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
| Sedacion                    | Aquiescencia pérdida de movimientos trasomos de la marcha tambalearse |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Estirarse al andar  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Pérdida del equilibrio  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Pérdida de tracción   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Disminución de la presión de agarre                                   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
| Autonomia                   | Carreras de puntillas   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Período de reflejos   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Pérdida de reflejo corneal  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Postura del cuerpo plana  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Sedación marcada  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
| Otras medidas               | Sedación ligera   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Disminución del tono muscular   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Disminución de la reactividad al tacto                                |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Prosis Caída de los párpados superiores                               |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Exoftalmia (ojos hacia afuera)  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
| Dolor:                      | Miosis contracción permanente de la pupila                            |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Midriasis Dilatación de la pupila                                     |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Piloerección  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Defecación/diarrea  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Salivación  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
| Escala de Gimnase           | Aumento de la respiración   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Disminución de la respiración   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Hipertermia   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Hipotermia  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Rasgado   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
| Escala de Gimnase           | Muerte  |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Retorcimiento   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | Analgesia   |             |          |             |                                   |               |             |               |                                  |                |          |       |             |                |               |
|                             | 1) Estrechamiento ojos  | 0,5         |          |             |                                   | 0,5           |             |               |                                  | 2              | 1,5      | 1     | 1           | 1              |               |
|                             | 2) Abultamiento nariz   | 0,5         |          |             |                                   | 0,5           |             |               |                                  | 2              | 1        | 1     | 1           | 1              |               |
| 3) Abultamiento de mejillas | 0,5   |             |          |             | 0,5                               |               |             |               | 2                                | 1              | 1        | 1     | 1           |                |               |
| 4) Posición de orejas       | 0,5   |             |          |             | 0,5                               |               |             |               | 0,5                              | 0,5            | 0,5      | 0,5   | 0,5         |                |               |
| 5) Cambio en los bigotes    | 0   |             |          |             | 0                                 |               |             |               | 0                                | 0              | 0        | 0     | 0           |                |               |





|                   | Dia 15 Intervención 08 JULIO 2020          |               |             |               | Dia 16 Observación 09 JULIO 2020 |      |               |                | Dia 17 Intervención 10 JULIO 2020 |               |               |             |               |          |      |
|-------------------|--|---------------|-------------|---------------|----------------------------------|------|---------------|----------------|-----------------------------------|---------------|---------------|-------------|---------------|----------|------|
|                   | Fecha muestra                              | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 15 HORAS POST | 24H POST                         | INTE | Fecha muestra | 09:00h INTERV. | 16:30 HORAS P 24h                 | Fecha muestra | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 15 HORAS POST | 24H POST | INTE |
| Excitación        | Convulsiones                               |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Temor                                      |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Cola Straub                                |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Excitación marcada                         |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Excitación: moderada                       |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
| Estereotipia      | Excitación: ligera                         |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Salto                                      |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Incremento de la reactividad al tocar      |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Aumento del miedo                          |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Aumento tono muscular                      |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
| Motor             | Agresión                                   |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Pararse patas delanteras                   |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Contracciones nerviosas de la cabeza       |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Estereotipia movimientos de la cabeza      |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Estereotipia masticar                      |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
| Sedación          | Estereotipia oler                          |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Catalepsia                                 |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Aquiescencia pérdida de movimientos        |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Trasornos de la marcha tambalearse         |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Estirarse al andar                         |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
| Autonomía         | Pérdida del equilibrio                     |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Pérdida de tracción                        |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Disminución de la pérdida de agarre        |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Caminar de puntillas                       |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Pérdida de reflejos                        |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
| Dolor:            | Pérdida de reflejo corneal                 |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Postura del cuerpo plana                   |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Sedación marcada                           |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Sedación moderada                          |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Sedación ligera                            |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
| Otras medidas     | Disminución del tono muscular              |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Disminución de la reactividad al tacto     |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Disminución del miedo                      |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Prosis Caída de los párpados superiores    |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
| Escala de Gimnase | Miosis contracción permanente de la pupila |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Miodesis Dilatación de la pupila           |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Piloerección                               |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Defecación/diarrea                         |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Salivación                                 |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
| Dolor:            | Aumento de la respiración                  |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Disminución de la respiración              |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Hipotermia                                 |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Resaca                                     |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Muerte                                     |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
| Escala de Gimnase | Retorcimiento                              |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | Analgésia                                  |               |             |               |                                  |      |               |                |                                   |               |               |             |               |          |      |
|                   | 1) Estrechamiento ojos                     | 1,5           | 1           | 1             | 1                                | 1    | decausan      | 0              | 2                                 | 1             | decausan      |             |               |          |      |
|                   | 2) Abultamiento nariz                      | 1             | 1           | 1             | 1                                | 1    | decausan      | 0,5            | 2                                 | 1             | decausan      |             |               |          |      |
|                   | 3) Abultamiento de mejillas                | 1             | 1           | 1             | 1                                | 1    | decausan      | 0,5            | 2                                 | 1             | decausan      |             |               |          |      |
| Escala de Gimnase | 4) Posición de orejas                      | 1             | 1           | 1             | 1                                | 1    | decausan      | 0,5            | 0,5                               | 1             | decausan      |             |               |          |      |
|                   | 5) Cambio en los bigotes                   | 0,5           | 0,5         | 0,5           | 0,5                              | 0,5  | decausan      | 0              | 0                                 | 0             | decausan      |             |               |          |      |







|                                | Fecha muestra                              |             | Dia 27 Intervención 20 JULIO 2020 |             | Fecha muestra |             | Dia 28 Observación 21 JULIO 2020 |             | Fecha muestra |             | Dia 29 Intervención 22 JULIO 2020 |             |
|--------------------------------|--|-------------|-----------------------------------|-------------|---------------|-------------|----------------------------------|-------------|---------------|-------------|-----------------------------------|-------------|
|                                | 0-30 MIN POST                              | 60 MIN POST | 0-30 MIN POST                     | 60 MIN POST | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 0-30 MIN POST                    | 60 MIN POST | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 0-30 MIN POST                     | 60 MIN POST |
| <b>Excitacion</b>              | Convulsiones                               |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Temor                                      |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Cola Straub                                |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Excitacion marcada                         |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Excitacion: moderada                       |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
| <b>Esterotopia</b>             | Excitacion: ligera                         |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Salto                                      |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Incremento de la reactividad al tocar      |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Aumento del miedo                          |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Aumento tono muscular                      |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
| <b>Motor</b>                   | Agresion                                   |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Pisarse patas delanteras                   |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Contracciones nerviosas de la cabeza       |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Esterotopia movimientos de la cabeza       |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Esterotopia masticar                       |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
| <b>Sedacion</b>                | Catalepsia                                 |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Aquinesia perdida de movimientos           |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Trasarnos de la marcha tambalearse         |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Estirarse al andar                         |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Perdida del equilibrio                     |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
| <b>Otras medidas</b>           | Perdida de traccion                        |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Disminucion de la perdida de agarre        |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Caminar de puntillas                       |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Perdida de reflejos                        |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Perdida de reflejo corneal                 |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
| <b>Autonomia</b>               | Postura del cuerpo plana                   |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Sedacion marcada                           |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Sedacion moderada                          |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Sedacion ligera                            |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Disminucion del tono muscular              |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
| <b>Dolor</b>                   | Disminucion de la reactividad al tocarlo   |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Disminucion del miedo                      |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Proxis Caída de los párpados superiores    |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Exoftalmia (ojos hacia afuera)             |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Miosis contracción permanente de la pupila |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
| <b>Escala de Gimnace</b>       | Midriasis Dilatación de la pupila          |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Piloerecton                                |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Defecacion/diarrea                         |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Salivacion                                 |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | La erimacion                               |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
| <b>Analgesia</b>               | Aumento de la respiración                  |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Disminución de la respiración              |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Hipotermia                                 |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Resaca                                     |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Muerte                                     |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
| <b>Reforzamiento</b>           | Reforzamiento                              |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | Analgesia                                  |             |                                   |             |               |             |                                  |             |               |             |                                   |             |
|                                | 11 Estrechamiento ojos                     | 0,5         | DESCANSA                          | 0           | DESCANSA      | descanso    | 0,5                              | DESCANSA    | 0             | DESCANSA    | descanso                          | 0,5         |
|                                | 2 Abultamiento nariz                       | 0,5         | DESCANSA                          | 0           | DESCANSA      | descanso    | 1                                | DESCANSA    | 0,5           | DESCANSA    | descanso                          | 0,5         |
|                                | 3 Abultamiento de mejillas                 | 0,5         | DESCANSA                          | 0           | DESCANSA      | descanso    | 1                                | DESCANSA    | 0,5           | DESCANSA    | descanso                          | 0,5         |
| <b>Sicambio en los bigotes</b> | 4 Posición de orejas                       | 0,5         | DESCANSA                          | 0           | DESCANSA      | descanso    | 1                                | DESCANSA    | 0,5           | DESCANSA    | descanso                          | 0,5         |
|                                | 5 Cambio en los bigotes                    | 0,5         | DESCANSA                          | 0           | DESCANSA      | descanso    | 0,5                              | DESCANSA    | 0,5           | DESCANSA    | descanso                          | 0,5         |

# Tabla del test de toxicidad sub-crónica vía intraperitoneal:

## Balb/c machos JKST6 (10mg/kg)

| CODIGO COLOR      | CADA GRUPO EXPERIMENTAL SON 5 INDIVIDUOS<br>CERO RATONES<br>1 RATON<br>2-3 RATONES<br>4-5 RATONES | Dia 1 Intervencion 24 JUNIO 2020 |                  |                                |                  | Dia 2 Observacion 25 JUNIO 2020 |               |                |               |
|-------------------|---|----------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|---------------------------------|---------------|----------------|---------------|
|                   |   | fecha muestra                    | 0-30 MIN POST IN | 60 MIN POST INTE               | 5 HORAS POST INT | 24H POST INTERV.                | fecha muestra | 09:00h INTERV. | 16:30 HORAS P |
| ESCALA DE GRADUAC |   | 0: UNIDAD DE ACCION NO PRESENTE  |                  | 1: UN A MODERADAMENTE VISIBL E |                  | 2: UN A SEVERO                  |               |                |               |
| Excitacion        | Convulsiones  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Tremor  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Cola straub   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Excitacion: marcada   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Esterotipia       | Excitacion: moderada  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Excitacion: ligera  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Salto   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Incremento de la reactividad al tocar   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Motor             | Aumento del miedo   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Aumento tono muscular   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Agresion  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Prearse patas delanteras  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Esterotipia       | Contracciones nervosas de la cabeza   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Esterotipia movimientos de la cabeza  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Esterotipia masticar  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Esterotipia oler  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Motor             | Catalepsia  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Aquiescia pérdida de movimientos  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Trastornos de la marcha tambalearse   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Estrarse al andar   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Sedacion          | Pérdida del equilibrio  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Pérdida de tracción   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Disminucion de la pérdida de agarre   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Caminar de puntillas  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Autonomia         | Pérdida de reflejos   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Pérdida de reflejo corneal  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Postura del cuerpo plana  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Sedacion marcada  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Dolor:            | Sedacion moderada   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Sedacion ligera   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Disminucion del tono muscular   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Disminucion de la reactividad al tocarlo  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Otras medidas     | Disminucion del miedo   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Prostis Caída de los párpados superiores  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Exoftalmia (ojos hacia afuera)  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Miosis contracción permanente de la pupila  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Escala de Grinace | Mihrasis Dilatación de la pupila  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | plioercción   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Detección/diuresa   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Salivación  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Dolor:            | Lacrimación   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Aumento de la respiración   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Disminución de la respiración   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Hipertermia   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Dolor:            | Hipotermia  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Rascado   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Muerte  |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | Retorcimiento   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
| Escala de Grinace | Analgésia   |                                  |                  |                                |                  |                                 |               |                |               |
|                   | 1) Estrechamiento Ojos  | 3                                | 2                | 2                              | 2                |                                 | 2             | 2              | 2             |
|                   | 2) Abultamiento nariz   | 3                                | 1                | 1                              | 1                |                                 | 1             | 1              | 1             |
|                   | 3) Abultamiento de mejillas   | 3                                | 2                | 2                              | 2                |                                 | 0             | 0              | 0             |
| Escala de Grinace | 4) Posición de orejas   | 3                                | 2                | 2                              | 2                |                                 | 0             | 0              | 0             |
|                   | 5) Cambio en los dientes  | 2                                | 2                | 2                              | 2                |                                 | 0             | 0              | 0             |

|                          | Fecha muestra                              |              | Día 3 Intervención 26 JUNIO 2020             |   | Día 4 Observación 27 JUNIO 2020 |                                  | Día 5 Observación 28 JUNIO 2020 |                                  |
|--------------------------|--|--------------|--|---|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
|                          | Fecha muestra                              | Tiempo (min) | JAUJA 4 TTO MACHOS 0-30 MIN POST 60 MIN POST | JAUJA 4 TTO MACHOS 15 HORAS POST 24H POST | INTE                            | JAUJA 4 TTO MACHOS 16:30 HORAS P | INTE                            | JAUJA 4 TTO MACHOS 16:30 HORAS P |
| Extracción               | Convulsiones                               |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Temor                                      |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Cola Straub                                |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Excitación: marcada                        |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Excitación: moderada                       |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
| Estereotipia             | Excitación: ligera                         |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Salto                                      |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Aumento del miedo                          |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Aumento tono muscular                      |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
| Motor                    | Agresión                                   |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Contracciones nerviosas de la cabeza       |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Estereotipia movimientos de la cabeza      |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Estereotipia masticar                      |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
| Autonomía                | Cataplejía                                 |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Aquiescencia pérdida de movimientos        |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Trastornos de la marcha tambalearse        |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Estirarse al andar                         |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Pérdida del equilibrio                     |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
| Sedación                 | Pérdida de tracción                        |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Disminución de la pérdida de agarre        |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Cambiar de puntillas                       |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Pérdida de reflejos                        |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Pérdida de reflejo corneal                 |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
| Dolor:                   | Postura del cuerpo plana                   |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Sedación marcada                           |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Sedación moderada                          |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Sedación ligera                            |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Disminución del tono muscular              |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
| Escala de Girmace        | Disminución de la reactividad al tacto     |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Disminución del miedo                      |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Exoftalmia (Ojos hacia afuera)             |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
| Otras medidas            | Miopericosis                               |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Defecación/diarrea                         |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Salivación                                 |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Aumento de la respiración                  |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Disminución de la respiración              |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
| Dolor:                   | Hipertermia                                |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Hipotermia                                 |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Resaca                                     |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Muerte                                     |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | Retorcimiento                              |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
| Escala de Girmace        | Analgesia                                  |              |  |   |                                 |                                  |                                 |                                  |
|                          | 1) Estrechamiento ojos                     | 3            | 2  | 2   | 2                               | 2                                | 2                               | 0.5                              |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      | 3            | 1  | 1   | 1                               | 1                                | 1                               | 1                                |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                | 3            | 2  | 2   | 2                               | 2                                | 2                               | 1                                |
|                          | 4) Posición de orejas                      | 3            | 2  | 2   | 2                               | 2                                | 2                               | 1                                |
| 5) Cambio en los bigotes | 3  | 0            | 0  | 0   | 0                               | 0                                | 1                               |                                  |

|                          | Día 6 Intervención 29 JUNIO 2020           |               |             |               | Día 7 Observación 30 JUNIO 2020 |      |               |         | Día 8 OBSERVACIÓN 01 JULIO 2020 |               |               |             |               |          |      |
|--------------------------|--|---------------|-------------|---------------|---------------------------------|------|---------------|---------|---------------------------------|---------------|---------------|-------------|---------------|----------|------|
|                          | Fecha muestra                              | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 15 HORAS POST | 24H POST                        | INTE | Fecha muestra | 09:00h. | 16:30 HORAS                     | Fecha muestra | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 15 HORAS POST | 24H POST | INTE |
| Excitacion               | Convulsiones                               |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Temor                                      |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Cola Straub                                |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Excitacion marcada                         |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Excitacion moderada                        |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
| Esterotipia              | Excitacion ligera                          |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Salto                                      |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Aumento del miedo                          |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Aumento tono muscular                      |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
| Motor                    | Agresion                                   |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Contracciones rítmicas de la cabeza        |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Esterotipia movimientos de la cabeza       |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Esterotipia oler                           |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
| Sedación                 | Catalepsia                                 |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Aquiescencia pérdida de movimientos        |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Trastornos de la marcha tambalearse        |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Estivarse al andar                         |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Pérdida del equilibrio                     |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
| Autonomía                | Pérdida de tracción                        |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Disminución de la pérdida de agarre        |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Caminar de puntillas                       |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Pérdida de reflejos                        |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Pérdida de reflejo corneal                 |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
| Dolor                    | Postura del cuerpo plana                   |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Sedación marcada                           |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Sedación moderada                          |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Sedación ligera                            |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Disminución del tono muscular              |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
| Otras medidas            | Disminución de la reactividad al tacto     |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Disminución del miedo                      |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Exortalmia (Ojos hacia afuera)             |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
| Escala de Gimnase        | Midriasis Dilatación de la pupila          |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Piloerección                               |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Defecación/diarrea                         |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Salivación                                 |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | La erimación                               |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
| Dolor                    | Aumento de la respiración                  |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Disminución de la respiración              |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Hipotermia                                 |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Resaca                                     |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Muerte                                     |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
| Escala de Gimnase        | Retorcimiento                              |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | Analgesia                                  |               |             |               |                                 |      |               |         |                                 |               |               |             |               |          |      |
|                          | 1) Estrechamiento ojos                     | 2             | 2           | 2             | 1                               | 1    | 2             | 2       | 1                               | 0,5           | 2             | 2           | 2             | 1        |      |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      | 2             | 2           | 2             | 1                               | 1    | 2             | 2       | 1                               | 1             | 2             | 2           | 2             | 0,5      |      |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                | 2             | 2           | 2             | 1                               | 0,5  | 2             | 2       | 1                               | 1             | 2             | 2           | 2             | 0,5      |      |
| 4) Posición de orejas    | 2  | 2             | 1           | 1             | 1                               | 2    | 2             | 1       | 0,5                             | 2             | 2             | 1           | 0,5           |          |      |
| 5) Cambio en los bigotes | 2  | 2             | 0           | 0             | 0                               | 2    | 2             | 0       | 0                               | 2             | 2             | 1           | 0             |          |      |







|                   |  | Fecha muestra | Dia 15 Intervención 08 JULIO 2020 |             | Fecha muestra | Dia 16 Observación 09 JULIO 2020 |      | Fecha muestra  | Dia 17 Intervención 10 JULIO 2020 |              |               |             |                |          |      |
|-------------------|--|---------------|-----------------------------------|-------------|---------------|----------------------------------|------|----------------|-----------------------------------|--------------|---------------|-------------|----------------|----------|------|
|                   |  | Tiempo (min)  | 0-30 MIN POST                     | 60 MIN POST | 15 HORAS POST | 24H POST                         | INTE | 09:00h INTERV. | 16:30 HORAS P 24h                 | Tiempo (min) | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST | 115 HORAS POST | 24H POST | INTE |
| Excitación        | Convulsiones                               |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Tremor                                     |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Cola Straub                                |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Excitación marcada                         |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Excitación moderada                        |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
| Etiotropia        | Excitación ligera                          |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Salto                                      |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Incremento de la reactividad al tocar      |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Aumento del miedo                          |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Aumento tono muscular                      |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
| Motor             | Agresión                                   |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Pisarse patas delanteras                   |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Contracciones rítmicas de la cabeza        |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Etiotropia movimientos de la cabeza        |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Etiotropia oler                            |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
| Sedación          | Catalepsia                                 |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Aquiescencia pérdida de movimientos        |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Trastornos de la marcha tambalearse        |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Estivarse al andar                         |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Pérdida del equilibrio                     |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
| Otras medidas     | Pérdida de tracción                        |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Disminución de la pérdida de agarre        |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Camina de puntillas                        |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Pérdida de reflejos                        |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Pérdida de reflejo corneal                 |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
| Autonomía         | Postura del cuerpo plana                   |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Sedación marcada                           |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Sedación moderada                          |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Sedación ligera                            |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Disminución del tono muscular              |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
| Escala de Gimnase | Disminución de la reactividad al tacto     |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Prosis Caída de los párpados superiores    |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Exoftalmia (Ojos hacia afuera)             |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Miosis contracción permanente de la pupila |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Miodesis Dilatación de la pupila           |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
| Dolor             | Piloerección                               |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Defecación/diarrea                         |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Salivación                                 |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Aumento de la respiración                  |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Disminución de la respiración              |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
| Escala de Gimnase | Hipotermia                                 |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Resaca                                     |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Muerte                                     |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Retorcimiento                              |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
|                   | Analgésia                                  |               |                                   |             |               |                                  |      |                |                                   |              |               |             |                |          |      |
| Escala de Gimnase | 1) Estrechamiento ojos                     | 2             | 0,5                               | 0           | 0,5           | 1                                |      | decañsan       | 0,5                               | 1,5          | 0,5           | decañsan    |                |          |      |
|                   | 2) Abultamiento nariz                      | 2             | 0,5                               | 0,5         | 0,5           | 0,5                              |      | decañsan       | 0,5                               | 2            | 0,5           | decañsan    |                |          |      |
|                   | 3) Abultamiento de mejillas                | 2             | 0,5                               | 0,5         | 0,5           | 0,5                              |      | decañsan       | 0,5                               | 2            | 0,5           | decañsan    |                |          |      |
|                   | 4) Posición de orejas                      | 2             | 0,5                               | 0,5         | 0,5           | 0,5                              |      | decañsan       | 0,5                               | 2            | 0,5           | decañsan    |                |          |      |
|                   | 5) Cambio en los bigotes                   | 2             | 0,5                               | 0           | 0,5           | 0,5                              |      | decañsan       | 0,5                               | 2            | 0,5           | decañsan    |                |          |      |



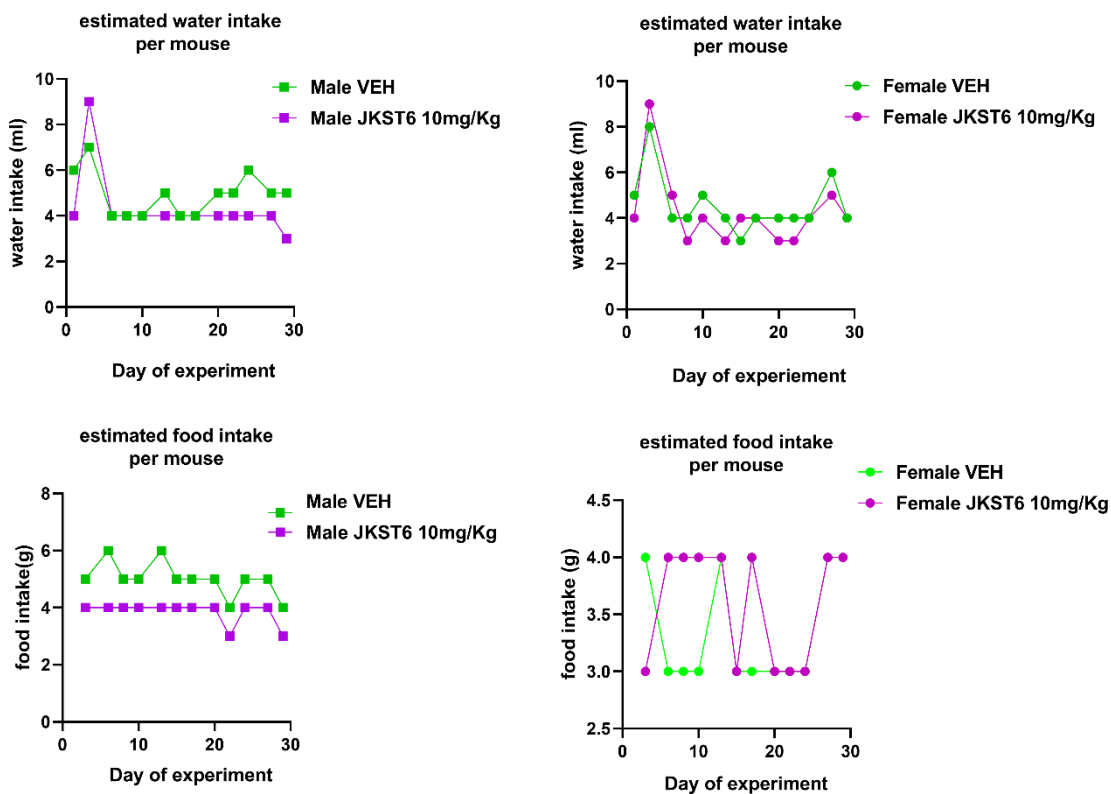
|                             | Día 21 Observación 14 JULIO 2020             |             |                |                   | Día 22 Intervención 15 JULIO 2020 |             |  |               | Día 23 Observación 16 JULIO 2020 |                |                         |  |
|-----------------------------|--|-------------|----------------|-------------------|-----------------------------------|-------------|--|---------------|----------------------------------|----------------|-------------------------|--|
|                             | Fecha muestra                                | Tempo (min) | 09:00h INTERV. | 16:30 HORAS P 24h | Fecha muestra                     | Tempo (min) | 0-30 MIN POST 60 MIN POST 115 HORAS POST 24H POST INTE | Fecha muestra | Tempo (min)                      | 09:00h INTERV. | 16:30 HORAS P 24h 9:30h |  |
| Excitadon                   | Convulsiones                                 |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Temor  |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Cola Straub                                  |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Excreción marcada                            |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Excreción moderada                           |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Esterotipia                 | Excitación: ligera                           |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Excitación: ligera                           |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Salto  |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Incremento de la reactividad al tocar        |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Aumento del miedo                            |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Motor                       | Aumento tono muscular                        |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Agresión                                     |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Pisarse patas delanteras                     |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Contracciones nerviosas de la cabeza         |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Esterotipia movimientos de la cabeza         |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Sedación                    | Esterotipia masticar                         |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Esterotipia oler                             |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Catalepsa                                    |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Aquiescencia pérdida de movimientos          |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Trasarnos de la marcha tambalearse           |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Autonomía                   | Estarse al andar                             |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Pérdida del equilibrio                       |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Pérdida de tracción                          |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Disminución de la pérdida de agarre          |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Caminar de puntillas                         |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Otras medidas               | Pérdida de reflejos                          |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Pérdida de reflejo corneal                   |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Postura del cuerpo plana                     |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Sedación marcada                             |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Sedación moderada                            |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Escala de Gimnase           | Sedación ligera                              |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Disminución del tono muscular                |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Disminución de la reactividad al tacto       |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Disminución del miedo                        |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Prosis Caída de los párpados superiores      |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Dolor:                      | Exoftalmia (ojos hacia afuera)               |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Miosis (contracción permanente de la pupila) |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Midriasis (dilatación de la pupila)          |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Piloerección                                 |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Defecación/diarrea                           |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Escala de Gimnase           | Salivación                                   |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | La erimación                                 |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Aumento de la respiración                    |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Disminución de la respiración                |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Hipotermia                                   |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
| Escala de Gimnase           | Rasgado                                      |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Muerte                                       |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Refortamiento                                |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | Analgesia                                    |             |                |                   |                                   |             |  |               |                                  |                |                         |  |
|                             | 11 Estrechamiento ojos                       | 0,5         | 1              | 2                 | 1                                 | 0,5         | 0,5  | 0,5           | 0,5                              | 0,5            | descanso 0,5            |  |
| 21 Abultamiento nariz       | 0,5  | 1           | 2              | 1                 | 0,5                               | 0,5         | 0,5  | 0,5           | 0,5                              | descanso 0,5   |                         |  |
| 31 Abultamiento de mejillas | 0,5  | 1           | 2              | 1                 | 0,5                               | 0,5         | 0,5  | 0,5           | 0,5                              | descanso 0,5   |                         |  |
| 41 Posición de oídos        | 0,5  | 1           | 1              | 1                 | 0,5                               | 0,5         | 0,5  | 0,5           | 0,5                              | descanso 0,5   |                         |  |
| 51 Cambio en los bigotes    | 0  | 1           | 1              | 1                 | 0                                 | 0,5         | 0,5  | 0,5           | 0,5                              | descanso 0     |                         |  |

|                          | Fecha muestra                              |               | Dia 24 Intervención 17 Julio 2020 |               | Fecha muestra |      | Dia 25 Observación 18 Julio 2020 |         | Fecha muestra |     | Dia 26 Observación 19 Julio 2020 |         |
|--------------------------|--|---------------|-----------------------------------|---------------|---------------|------|----------------------------------|---------|---------------|-----|----------------------------------|---------|
|                          | TIEMPO (min)                               | 0-30 MIN POST | 60 MIN POST                       | 15 HORAS POST | 24H POST      | INTE | 09:00h                           | INTERV. | 16:30 HORAS   | 12h | 09:00h                           | INTERV. |
| <b>Excitacion</b>        | Convulsiones                               |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Tremor                                     |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Cola Straub                                |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Excitacion marcada                         |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Excitacion moderada                        |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
| <b>Etiotropia</b>        | Excitacion ligera                          |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Salto                                      |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Incremento de la reactividad al tocar      |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Aumento del miedo                          |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Aumento tono muscular                      |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
| <b>Motor</b>             | Agresion                                   |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Pisarse patas delanteras                   |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Contracciones rítmicas de la cabeza        |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Etiotropia movimientos de la cabeza        |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Etiotropia oler                            |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
| <b>Sedación</b>          | Catálisis                                  |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Aquiescencia pérdida de movimientos        |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Trastornos de la marcha tambalearse        |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Estivarse al andar                         |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Pérdida del equilibrio                     |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
| <b>Autonomía</b>         | Pérdida de tracción                        |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Disminución de la pérdida de agarre        |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Camina de puntillas                        |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Pérdida de reflejos                        |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Pérdida de reflejo corneal                 |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
| <b>Dolor</b>             | Postura del cuerpo plana                   |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Sedación marcada                           |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Sedación moderada                          |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Sedación ligera                            |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Disminución del tono muscular              |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
| <b>Escala de Gimnase</b> | Disminución de la reactividad al tacto     |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Prosis Caída de los párpados superiores    |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Exoftalmia (Ojos hacia afuera)             |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Miosis contracción permanente de la pupila |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Miodesis Dilatación de la pupila           |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
| <b>Otras medidas</b>     | Piloerección                               |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Defecación/diarrea                         |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Salivación                                 |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Aumento de la respiración                  |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Disminución de la respiración              |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
| <b>Dolor</b>             | Hipotermia                                 |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Hipertermia                                |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Resaca                                     |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Muerte                                     |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | Refuerzo                                   |               |                                   |               |               |      |                                  |         |               |     |                                  |         |
| <b>Analgesia</b>         | 1) Estrechamiento ojos                     | 2             | 2                                 | 1             | descansa      | 0,5  |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | 2) Abultamiento nariz                      | 2             | 2                                 | 1             | descansa      | 0,5  |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | 3) Abultamiento de mejillas                | 2             | 2                                 | 1             | descansa      | 0,5  |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | 4) Posición de orejas                      | 2             | 2                                 | 1             | descansa      | 0,5  |                                  |         |               |     |                                  |         |
|                          | 5) Cambio en los bigotes                   | 2             | 2                                 | 1             | descansa      | 0,5  |                                  |         |               |     |                                  |         |



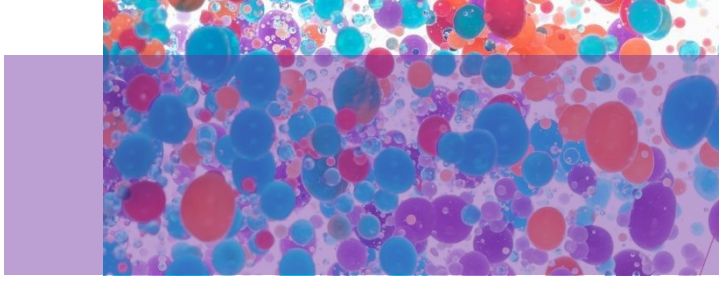
## Test de toxicidad sub-crónica.

### Consumo de agua y comida durante el experimento.



**Figura 85. Registro del consumo de agua y comida de los ratones Balb/c en el ensayo de toxicidad sub-crónica.** Se midió el consumo por jaula (grupo experimental) en los días de intervención (cada dos días) y se realizó una estimación del consumo por ratón al día a partir de las diferencias de peso de comida (gramos) o volumen de agua (mililitros) obtenidas entre los registros.





## **ANEXO II. FINANCIACIÓN**



La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación proporcionada por:

- **Proyectos competitivos nacionales:**

-Ministerio Español de Economía y Competitividad (MINECO). Retos Investigación. “Búsqueda e identificación de nuevas moléculas moduladoras de dianas terapéuticas en cáncer”. RTI2018–094356-B-C21. IP: Ana Estévez-Braun (Instituto Universitario de Bio-Orgánica (IUBO - QUIBIONAT) de la Universidad de La Laguna). 2019 - 2022.

-SAF2015-65113-C2-2, SAF 2015–65113-C2–1-R. Desarrollo preclínico de nuevas estructuras bioactivas moduladoras de las actividades oncogénicas de STAT3/5 o de los Receptores de Estrógenos. Ministerio Español de Economía y Competitividad co-financiado por el Fondo Europeo para el Desarrollo Regional (MINECO-FEDER). IP: Leandro Fernández Pérez (ULPGC -IUIBS) y Ana Estévez Braun (Instituto Universitario de Biorgánica (IUBO - QUIBIONAT) de la Universidad de La Laguna). Proyecto coordinado. 2016 - 2019.

- **Proyectos competitivos regionales:**

-Agencia Canaria de Investigación Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias. ProID2021010037. Búsqueda, síntesis y evaluación preclínica de nuevas moléculas moduladoras de la ruta JAK/STAT como agentes antitumorales y/o antiinflamatorios. Instituto Universitario de Biorgánica (IUBO - QUIBIONAT) de la Universidad de La Laguna con participación de los investigadores del grupo BIOPharm del Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS-ULPGC). IP: Ana Estévez Braun (IUBO - QUIBIONAT). 2021 - 2023.

-Premios a la investigación Biomédica Fundación DISA 2019. Evaluación de la proteína SOCS2 en la patogénesis del carcinoma hepatocelular y su papel como biomarcador en humanos. IP: Carlota Recio (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS-ULPGC)). 2020-2021.

-Proyecto Convocatoria Precompetitiva propia de la ULPGC. Evaluación de la proteína SOCS2 en la patogénesis del carcinoma hepatocelular y de su papel como diana terapéutica. IP: Carlota Recio (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS-ULPGC)). 2020 - 2021.

-Agencia Canaria de Investigación Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias. CEI2019–08/ACIISI. Cribado farmacológico de librerías químicas y desarrollo preclínico de nuevas entidades moduladoras de los oncogenes STAT3/5 y YAP1, y del receptor de estrógenos (SERM). IP: Leandro Fernández-Pérez (IP1) y C. Borja Guerra Hdez. (IP2) (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS-ULPGC)). IP: Borja Guerra Hernández. (ULPGC-IUIBS). 2020 - 2020.

-Agencia Canaria de Investigación Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias. CEI2018–23/ACIISI. Aplicación de una plataforma de Bioensayos en el cribado de bibliotecas químicas inspiradas en la biodiversidad: identificación y desarrollo de moléculas con interés biomédico en oncología. IP: C. Borja Guerra Hdez. (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS-ULPGC)). 2019 - 2019.

- **Convenios con Fundaciones:**

-Fundación “Alfredo Martín Reyes” (Arehucas) - Fundación del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC). Grupo BIOPharm del Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS-ULPGC).

- **Contratos Laborales y Becas:**

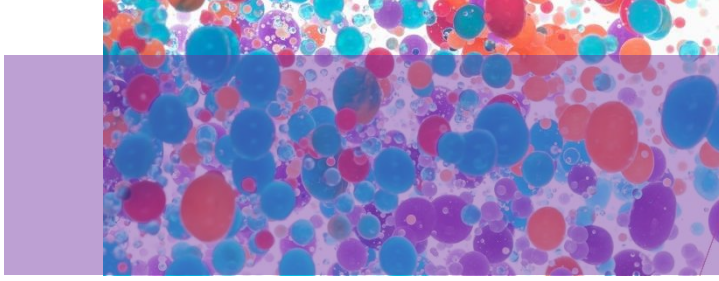
-Contrato Predoctoral del Programa Propio de la ULPGC para personal investigador en formación. Convocatoria: 2016. Referencia de la ayuda: PIFULPGC-2016-CCSALUD. Período: julio 2017 - julio 2021.

-Ayuda Erasmus+Prácticas (SMT) de la ULPGC para Estancia de Formación en el laboratorio del Dr. David Greaves en el Sir William Dunn School of

Pathology. University of Oxford. Convocatoria 2018/2019. Período: octubre 2018 - diciembre 2018

-Contrato de Técnico de Investigación Competitivo PTA, convocatoria del Ministerio de Economía y Competitividad, para la promoción del Empleo Joven e Implantación de Garantía Juvenil en I+D+I, de la convocatoria BOE número 14, de 16 de enero de 2015. REF. PEJ-2014-P-00565 (IUIBS). Período: diciembre 2015 - julio 2017.





## **ANEXO III. APORTACIONES CIENTÍFICAS**





- **Artículos indexados en revistas científicas:**

- 1) Purvis GSD, **Aranda-Tavío H**, Channon KM, Greaves DR. Bruton's tyrosine kinase (BTK) regulates myeloid cell recruitment during acute inflammation. **Br J Pharmacol.** 2021 Dec 12. Impact Factor (Journal Citation Reports 2020): 8.740. Journal Impact Factor Quartile: Q1. Journal Impact Factor Rank: 12/276 in Pharmacology & Pharmacy (SCIE edition).
- 2) **Aranda-Tavío H**, Recio C, Martín-Acosta P, Guerra-Rodríguez M, Brito-Casillas Y, Blanco R, Junco V, León J, Montero JC, Gandullo-Sánchez L, McNaughton-Smith G, Zapata JM, Pandiella A, Amesty A, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L, Guerra B. JKST6, a novel multikinase modulator of the BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway that potentiates direct BCR-ABL1 inhibition and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia. **Biomed Pharmacother.** 2021 Dec 1;144:112330. Impact Factor (Journal Citation Reports 2020): 6.530. Journal Impact Factor Quartile: Q1. Journal Impact Factor Rank: 25/276 in Pharmacology & Pharmacy (SCIE edition).
- 3) Guerra B, Recio C, **Aranda-Tavío H**, Guerra-Rodríguez M, García-Castellano JM, Fernández-Pérez L. The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy. **Front Oncol.** 2021 Feb 25;11:626971. Journal Impact Factor (Journal Citation Reports 2020): 6.244. Journal Impact Factor Quartile: Q2. Journal Impact Factor Rank: 62/242 in Oncology (SCIE edition).
- 4) Purvis GSD, Collino M, **Aranda-Tavío H**, Chiazza F, O'Riordan CE, Zeboudj L, Mohammad S, Collotta D, Verta R, Guisot NES, Bunyard P, Yaqoob MM, Greaves DR, Thiemermann C. Inhibition of Bruton's TK regulates macrophage NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation in metabolic inflammation. **Br J Pharmacol.** 2020 Oct 1;177(19):4416–32. Impact Factor (Journal Citation Reports 2020): 8.740. Journal Impact Factor Quartile: Q1. Journal Impact Factor Rank: 12/276 in Pharmacology & Pharmacy (SCIE edition).

- 5) Recio C, Guerra B, Guerra-Rodríguez M, **Aranda-Tavío H**, Martín-Rodríguez P, de Mirecki-Garrido M, Brito-Casillas Y, García-Castellano JM, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L. Signal transducer and activator of transcription (STAT)-5: an opportunity for drug development in oncohematology. **Oncogene**. 2019 Jun 13;38(24):4657–68. Impact Factor (Journal Citation Reports 2019): 7.971. Journal Impact Factor Quartile: Q1. Journal Impact Factor Rank: 29/297 in Biochemistry & Molecular Biology (SCIE edition).
  
  - 6) Hernández-Molina R, Abramov PA, González-Platas J, Oramas-Royo S, Estévez-Braun A, Guerra-Rodríguez M, **Aranda-Tavío H**, Guerra B, Fernández-Pérez L. Synthesis, characterization and antiproliferative activity of mixed ligand complexes of Cu<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> with lapachol. **Polyhedron**. 2019 Jun 1;165:73–8. Impact Factor (Journal Citation Reports 2019): 2.343. Journal Impact Factor Quartile: Q2. Journal Impact Factor Rank: 17/45 in Chemistry, Inorganic & Nuclear (SCIE edition).
  
  - 7) Martín-Rodríguez P, Guerra B, Hueso-Falcón I, **Aranda-Tavío H**, Díaz-Chico J, Quintana J, Estévez F, Díaz-Chico B, Amesty A, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L. A novel naphthoquinone-coumarin hybrid that inhibits BCR-ABL1-STAT5 oncogenic pathway and reduces survival in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. **Front Pharmacol**. 2019;9 Jan. Impact Factor (Journal Citation Reports 2019): 4.225. Journal Impact Factor Quartile: Q1. Journal Impact Factor Rank: 52/271 in Pharmacology & Pharmacy (SCIE edition).
- **Capítulos de libro:**
- 1) Recio C, **Aranda-Tavío H**, Guerra-Rodríguez M, Mirecki-Garrido M de, Martín-Rodríguez P, Guerra B, Fernández-Pérez L. JAK, an Oncokinase in Hematological Cancer. Published by IntechOpen on February 15th 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84177. Book: Tyrosine Kinases as Druggable Targets in Cancer. ISBN: 978-1-78984-809-0. Book edited by Prof. Huan Ren. Indexing: WEB OF SCIENCE CITATION INDEX, WorldCat, OpenAIRE, BASE bielefeld

Academic Search Engine, AtoZ EBSCO, Google Scholar.

- **Aportaciones a congresos:**

- Internacionales:**

- 1) **Aranda-Tavío H**; Martín-Acosta P; Recio C; Guerra-Rodríguez M; Amesty A; Estévez-Braun A; Guerra B; Fernández-Pérez L. Comunicación oral. “A new naphthoquinone pyrone hybrid with antitumor activity against chronic and acute myeloid leukemia cells overcomes Imatinib resistance”. 3rd conference of Junior Researchers of the Canary Islands and first International Conference of Youth People for Research. Vicerrectorado de Investigación, Transferencia y Campus Santa Cruz y Sur de la Universidad de La Laguna, **JINTE**. 27/11/2020, Tenerife, Spain.
- 2) Guerra-Rodríguez M; López-Rojas P; Amesty Á; Recio C; **Aranda-Tavío H**; Rodrigo-González L; Estévez-Braun A; Fernández-Pérez L; Guerra B. Póster. “Pharmacological Screening of Brand-new Estrogen Receptor Modulators in Estrogen Receptor Positive (ER+) Breast Cancers”. 3rd conference of Junior Researchers of the Canary Islands and first International Conference of Youth People for Research. Vicerrectorado de Investigación, Transferencia y Campus Santa Cruz y Sur de la Universidad de La Laguna, **JINTE**. 27/11/2020, Tenerife, Spain.
- 3) **Aranda-Tavío H**; Martín-Rodríguez P; Guerra-Rodríguez M; Recio C; de Mirecki Garrido M; Martín-Acosta P; Estévez-Braun A; Guerra B; Fernández-Pérez L. Póster. “Evaluation of JKST-6, a new naphthoquinone-pyrone dimer, as anticancer agent in BCR-ABL+, JAK2 mutated and FLT3 ITD+ hematological malignancies”. The 15th international symposium on Myelodysplastic Syndromes. **The Myelodysplastic Syndromes Foundation**. 08/05/2019. Copenhagen, Denmark.
- 4) Purvis GSD; O’Riordan C; **Aranda-Tavío H**; Greaves DR.; Thiemermann C. Póster. “Ibrutinib has both anti-inflammatory and anti-diabetic effects in a model

of HFD induced insulin resistance and diabetic nephropathy”. British Pharmacology Society Meeting. **British Pharmacological Society**. 18/12/2018, London, England.

- 5) Guerra-Rodríguez M, **Aranda-Tavío H**; Martín-Rodríguez P; Recio C; de Mirecki-Garrido M; Martín-Acosta P; Amesty A; Estévez-Braun A; Fernández-Pérez L; Guerra B. Póster. “Pharmacological Screening of a Novel Chemical Library to find Novel Anti-Breast Cancer Agents”. 6th New Concepts in the Biology of Aggressive Breast Cancer Symposium. International Inflammatory **Breast Cancer Symposium**. 20/09/2018. Madrid, Spain.
- 6) Martín-Acosta P; Amesty Á; Martín-Rodríguez P; Guerra-Rodríguez M; **Aranda-Tavío H**; Guerra B; Fernández-Pérez L; Estévez-Braun A. Póster. “Multicomponent synthesis of new cytotoxic dihydro-1H-pyrazolo[1,3-b]pyridine embelin derivatives”. International Symposium on Medicinal Chemistry. **European Federation For Medicinal Chemistry**. 02/09/2018. Ljubljana. Slovenia.
- 7) Brito-Casillas Y; **Aranda-Tavío H**; Rodrigo-González L; Expósito-Montesdeoca A; Martín-Rodríguez P; Guerra B; Wägner A; Fernández-Pérez L. Comunicación oral. “Socs2-/- mouse as a potential model of macrosomia and gestational diabetes”. 53rd Annual Meeting of the EASD. **European Association for the Study of Diabetes**. 15/09/2017. Lisboa, Portugal.

#### **-Nacionales:**

- 1) **Aranda-Tavío H**; Rodrigo-González L; Expósito-Montesdeoca A; Martín-Rodríguez P; Guerra B; Wägner A; Fernández-Pérez L; Brito-Casillas Y. Póster. “A possible model of foetal macrosomia associated to Gestational Diabetes Mellitus”. XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio. (**SECAL**). 18/06/2017. Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- 2) Guerra B; Martín-Rodríguez P; Díaz-Chico J; **Aranda-Tavío H**; Rodrigo-

González L; Estévez-Braun A; Fernández-Pérez L. Póster. “Synthesis and Biological evaluation of novel inhibitors of Signal Transducer and activator of Transcription (STAT) protein in hematological malignances”. National Meeting with guest Society: The British pharmacological Society 37th. **Sociedad Española de Farmacología**. 18/06/2017. Catalonia, Spain. Publicación: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology (ISSN: 1742-7835) Aug 2018, Vol. 123, Suplemento S2, Póster P003, Páginas 26-26.

- 3) Fernández-Pérez L; Martín-Rodríguez P; Hueso-Falcón I; Guerra B; Díaz-Chico J; **Aranda-Tavío H**; Rodrigo-González L; Estévez-Rosas F; Quintana J; Díaz-Chico BN; Estévez-Braun A. Póster. “Phenotypic- and target-based strategies identify naphthoquinone derivatives that induce apoptosis in human Chronic Myelogenous Leukaemia”. VIII Spanish Drug Discovery Network Meeting. **Bioga**. 03/11/2016. Santiago de Compostela, Spain.



## Bruton's tyrosine kinase (BTK) regulates myeloid cell recruitment during acute inflammation.

Gareth S. D. Purvis<sup>1,2</sup>, Haidee Aranda-Tavio<sup>1</sup>, Keith M. Channon<sup>2,3,4</sup> and David R. Greaves<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, OX1 3RE, UK.

<sup>2</sup>BHF Centre of Research Excellence, University of Oxford, Oxford, OX3 9DU, UK.

<sup>3</sup>Wellcome Centre for Human Genetics, University of Oxford, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7BN, UK. <sup>4</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Radcliffe Department of Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford, OX3 9DU, UK.

\*Corresponding

Author

### Abstract:

**Background and Purpose:** Bruton's tyrosine kinase (BTK) is a non-receptor kinase best known for its role in B lymphocyte development that is critical for proliferation, and survival of leukemic cells in B cell malignancies. However, BTK is expressed in myeloid cells, particularly neutrophils, monocytes and macrophages where its inhibition has been reported to exhibit anti-inflammatory properties.

**Experimental Approach:** We explored the role of BTK on the migration of myeloid cells (neutrophils, monocytes and macrophages); *in vitro* using chemotaxis assays and *in vivo* using zymosan induced peritonitis as model systems.

**Key Results:** Using the zymosan induced peritonitis model of sterile inflammation we demonstrated that acute inhibition of BTK prior to zymosan challenge reduced phosphorylation of BTK in circulating neutrophils and monocytes. Moreover, we demonstrated that pharmacological inhibition of BTK with ibrutinib specifically inhibits neutrophil and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes, but not Ly6C<sup>lo</sup> monocyte recruitment to the peritoneum. XID mice, which have a point mutation in the *Btk* gene had reduced neutrophil and monocyte recruitment to the peritoneum following zymosan challenge. To better understand the role of BTK in myeloid cell recruitment we investigated both chemotaxis and chemokine production in macrophages. Pharmacological or genetic inhibition of BTK signalling substantially reduced human monocyte and murine macrophage chemotaxis, to a range of clinically relevant chemoattractants (C5a and CCL2). We also demonstrated that inhibition of BTK in tissue resident macrophages significantly decreases chemokine secretion by reducing NF- $\kappa$ B activity and Akt signalling.

**Conclusion and Implications:** Our work has identified a new role of BTK in regulating myeloid cell recruitment via two mechanisms, 1) reducing monocyte/macrophages' ability to undergo chemotaxis, and 2) reducing chemokine secretion, via reduced NF- $\kappa$ B and Akt activity in tissue resident macrophages.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/BPH.15778







## JKST6, a novel multikinase modulator of the BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway that potentiates direct BCR-ABL1 inhibition and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia

Haidée Aranda-Tavío<sup>a</sup>, Carlota Recio<sup>a</sup>, Pedro Martín-Acosta<sup>b</sup>, Miguel Guerra-Rodríguez<sup>a</sup>, Yeray Brito-Casillas<sup>a</sup>, Rosa Blanco<sup>c</sup>, Vanessa Junco<sup>c</sup>, Javier León<sup>c</sup>, Juan Carlos Montero<sup>d</sup>, Lucía Gandullo-Sánchez<sup>d</sup>, Grant McNaughton-Smith<sup>f</sup>, Juan Manuel Zapata<sup>e</sup>, Atanasio Pandiella<sup>d</sup>, Angel Amesty<sup>b</sup>, Ana Estévez-Braun<sup>b</sup>, Leandro Fernández-Pérez<sup>a,\*</sup>, Borja Guerra<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Farmacología Molecular y Traslacional (BIOPharm), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>b</sup> Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González" (IUBO), Departamento de Química Orgánica, QUIBIONAT, Universidad de La Laguna (ULL), La Laguna, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTec), Universidad de Cantabria-CSIC, Santander, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC and CIBERONC. Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

<sup>e</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" - CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>f</sup> Centro Atlántico del Medicamento (CEAMED) SA, La Laguna, Tenerife, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Chronic myelogenous leukemia  
BCR-ABL1  
Synergism  
Imatinib resistance

### ABSTRACT

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a hematological malignancy that highly depends on the BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway for cell survival. First-line treatments for CML consist of tyrosine kinase inhibitors that efficiently target BCR-ABL1 activity. However, drug resistance and intolerance are still therapeutic limitations in Ph+ cells. Therefore, the development of new anti-CML drugs that exhibit alternative mechanisms to overcome these limitations is a desirable goal. In this work, the antitumoral activity of JKST6, a naphthoquinone-pyrone hybrid, was assessed in imatinib-sensitive and imatinib-resistant human CML cells. Live-cell imaging analysis revealed JKST6 potent antiproliferative activity in 2D and 3D CML cultures. JKST6 provoked cell increase in the subG1 phase along with a reduction in the G0/G1 phase and altered the expression of key proteins involved in the control of mitosis and DNA damage. Rapid increases in Annexin V staining and activation/cleavage of caspases 8, 9 and 3 were observed after JKST6 treatment in CML cells. Of interest, JKST6 inhibited BCR-ABL1/STAT5 signaling through oncokine downregulation that was preceded by rapid polyubiquitination. In addition, JKST6 caused a transient increase in JNK and AKT phosphorylation, whereas the phosphorylation of P38-MAPK and Src was reduced. Combinatory treatment unveiled synergistic effects between imatinib and JKST6. Notably, JKST6 maintained its antitumor efficacy in BCR-ABL1-T315I-positive cells and CML cells that overexpress BCR-ABL and even restored imatinib efficacy after a short exposure time. These findings, together with the observed low toxicity of JKST6, reveal a novel multikinase modulator that might overcome the limitations of BCR-ABL1 inhibitors in CML therapy.

### 1. Introduction

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a hematopoietic stem cell disease associated with abnormal proliferation of clonal cells of the

myelogenous lineage [1]. This malignant myeloproliferative disorder is characterized by a chromosomal translocation t(9;22)(q34;q11) that provokes Philadelphia (Ph) chromosome emergence, a hallmark present in 95% of CML cases but also at lower frequencies in acute lymphoblastic

\* Corresponding authors at: Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Farmacología Molecular y Traslacional (BIOPharm), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

E-mail addresses: [leandroco.fernandez@ulpgc.es](mailto:leandroco.fernandez@ulpgc.es) (L. Fernández-Pérez), [borja.guerra@ulpgc.es](mailto:borja.guerra@ulpgc.es) (B. Guerra).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2021.112330>

Received 3 September 2021; Received in revised form 6 October 2021; Accepted 8 October 2021

0753-3322/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





# The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy

**Borja Guerra\***, Carlota Recio, Haidée Aranda-Tavío, Miguel Guerra-Rodríguez, José M. García-Castellano and Leandro Fernández-Pérez\*

*Molecular and Translational Pharmacology Lab, Institute for Biomedical and Health Research (IUIBS), University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain*

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Miriam Martini,  
University of Turin, Italy

### Reviewed by:

Khalid Omer Alfarouk,  
Alfarouk Biomedical Research LLC,  
United States

Parames C. Sil,  
Bose Institute, India

### \*Correspondence:

Borja Guerra  
borja.guerra@ulpgc.es  
Leandro Fernández-Pérez  
leandrofco.fernandez@ulpgc.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cancer Metabolism,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

**Received:** 07 November 2020

**Accepted:** 18 January 2021

**Published:** 25 February 2021

### Citation:

Guerra B, Recio C, Aranda-Tavío H, Guerra-Rodríguez M, García-Castellano JM and Fernández-Pérez L (2021) The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* 11:626971. doi: 10.3389/fonc.2021.626971



A hallmark of cancer cells includes a metabolic reprogramming that provides energy, the essential building blocks, and signaling required to maintain survival, rapid growth, metastasis, and drug resistance of many cancers. The influence of tumor microenvironment on cancer cells also results an essential driving force for cancer progression and drug resistance. Lipid-related enzymes, lipid-derived metabolites and/or signaling pathways linked to critical regulators of lipid metabolism can influence gene expression and chromatin remodeling, cellular differentiation, stress response pathways, or tumor microenvironment, and, collectively, drive tumor development. Reprogramming of lipid metabolism includes a deregulated activity of mevalonate (MVA)/cholesterol biosynthetic pathway in specific cancer cells which, in comparison with normal cell counterparts, are dependent of the continuous availability of MVA/cholesterol-derived metabolites (i.e., sterols and non-sterol intermediates) for tumor development. Accordingly, there are increasing amount of data, from preclinical and epidemiological studies, that support an inverse association between the use of statins, potent inhibitors of MVA biosynthetic pathway, and mortality rate in specific cancers (e.g., colon, prostate, liver, breast, hematological malignances). In contrast, despite the tolerance and therapeutic efficacy shown by statins in cardiovascular disease, cancer treatment demands the use of relatively high doses of single statins for a prolonged period, thereby limiting this therapeutic strategy due to adverse effects. Clinically relevant, synergistic effects of tolerable doses of statins with conventional chemotherapy might enhance efficacy with lower doses of each drug and, probably, reduce adverse effects and resistance. In spite of that, clinical trials to identify combinatory therapies that improve therapeutic window are still a challenge. In the present review, we revisit molecular evidences showing that deregulated activity of MVA biosynthetic pathway has an essential role in oncogenesis and drug resistance, and the potential use of MVA pathway inhibitors to improve therapeutic window in cancer.

**Keywords:** mevalonate, cholesterol, oxysterols, isoprenoids, sterol regulatory element binding protein, cancer, statins



## RESEARCH PAPER

# Inhibition of Bruton's TK regulates macrophage NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation in metabolic inflammation

Gareth S.D. Purvis<sup>1,2</sup>  | Massimo Collino<sup>3</sup>  | Haidee Aranda-Tavio<sup>2</sup> | Fausto Chiazza<sup>3</sup> | Caroline E. O'Riordan<sup>1</sup> | Lynda Zeboudj<sup>2</sup> | Shireen Mohammad<sup>1</sup> | Debora Collotta<sup>3</sup> | Roberta Verta<sup>3</sup> | Nicolas E.S. Guisot<sup>4</sup> | Peter Bunyard<sup>4</sup> | Magdi M. Yaqoob<sup>1,5</sup> | David R. Greaves<sup>2</sup>  | Christoph Thiemermann<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>William Harvey Research Institute, Queen Mary University of London, London, UK

<sup>2</sup>Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, UK

<sup>3</sup>Department of Drug Science and Technology, University of Turin, Turin, Italy

<sup>4</sup>Redx Pharma, Macclesfield, UK

<sup>5</sup>Centre for Diabetic Kidney Disease, Bart's and The London Hospital, London, UK

## Correspondence

Gareth S. D. Purvis, Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford OX1 3RE, UK.

Email: gareth.purvis@path.ox.ac.uk

Haidee Aranda-Tavio, Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain.

Email: haidee.aranda101@alu.ulpgc.es

## Funding information

Bart's and The London Charity Centre of Diabetic Kidney Disease; Queen Mary University of London to C.E.O. William Harvey Research Foundation; Oxford BHF Centre of Research Excellence, Grant/Award Number: RE/13/1/30181; British Heart Foundation, Grant/Award Numbers: FS/13/58/30648, RG/15/10/23915

**Background and Purpose:** There are no medications currently available to treat metabolic inflammation. Bruton's tyrosine kinase (BTK) is highly expressed in monocytes and macrophages and regulates NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activity; both propagate metabolic inflammation in diet-induced obesity.

**Experimental Approach:** Using an *in vivo* model of chronic inflammation, high-fat diet (HFD) feeding, in male C57BL/6J mice and *in vitro* assays in primary murine and human macrophages, we investigated if ibrutinib, an FDA approved BTK inhibitor, may represent a novel anti-inflammatory medication to treat metabolic inflammation.

**Key Results:** HFD-feeding was associated with increased BTK expression and activation, which was significantly correlated with monocyte/macrophage accumulation in the liver, adipose tissue, and kidney. Ibrutinib treatment to HFD-fed mice inhibited the activation of BTK and reduced monocyte/macrophage recruitment to the liver, adipose tissue, and kidney. Ibrutinib treatment to HFD-fed mice decreased the activation of NF- $\kappa$ B and the NLRP3 inflammasome. As a result, ibrutinib treated mice fed HFD had improved glycaemic control through restored signalling by the IRS-1/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway, protecting mice against the development of hepatosteatosis and proteinuria. We show that BTK regulates NF- $\kappa$ B and the NLRP3 inflammasome specifically in primary murine and human macrophages, the *in vivo* cellular target of ibrutinib.

**Conclusion and Implications:** We provide "proof of concept" evidence that BTK is a novel therapeutic target for the treatment of diet-induced metabolic inflammation and ibrutinib may be a candidate for drug repurposing as an anti-inflammatory agent for the treatment of metabolic inflammation in T2D and microvascular disease.

**Abbreviations:** ACR, albumin to creatinine ration; BMDM, bone marrow derived macrophage; BTK, Bruton's tyrosine kinase; CLL, chronic lymphatic leukaemia; EMA, European Medicines Agency; FDA, U.S. Food and Drug Administration; HFD, high fat diet; hMoDM, human monocyte derived macrophage; NLRP3, NLR family pyrin domain containing 3; OGTT, oral glucose tolerance test; T2D, Type 2 diabetes; TLR, toll-like receptor.

David R. Greaves and Christoph Thiemermann share senior authorship.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. British Journal of Pharmacology published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of British Pharmacological Society





# Signal transducer and activator of transcription (STAT)-5: an opportunity for drug development in oncohematology

Carlota Recio <sup>1</sup> · Borja Guerra<sup>1</sup> · Miguel Guerra-Rodríguez<sup>1</sup> · Haidée Aranda-Tavío<sup>1</sup> · Patricia Martín-Rodríguez<sup>1</sup> · Mercedes de Mirecki-Garrido<sup>1</sup> · Yeray Brito-Casillas<sup>1</sup> · José M. García-Castellano<sup>1</sup> · Ana Estévez-Braun<sup>2</sup> · Leandro Fernández-Pérez<sup>1</sup>

Received: 9 November 2018 / Revised: 9 January 2019 / Accepted: 3 February 2019 / Published online: 19 February 2019  
© Springer Nature Limited 2019

## Abstract

The signal transducer and activator of transcription (STAT) are transcription factors that work via JAK/STAT pathway regulating the expression of genes involved in cell survival, proliferation, differentiation, development, immune response, and, among other essential biological functions, hematopoiesis. JAK/STAT signaling is strictly regulated under normal physiological conditions. However, a large group of diverse diseases has been associated to an aberrant regulation of STAT factors. Erroneous modulation of the pathway leads to constitutive STAT activation, thereby driving proliferation, inflammation, and an uncontrolled immune response. Deregulated STAT5 activation has been found in the development of many hematopoietic tumors, including chronic and acute leukemias, polycythemia vera, and lymphoma. Mutations in the kinases that phosphorylate STAT5, and/or overexpression of the upstream receptor-associated tyrosine kinases have been suggested as the main drivers of constitutive STAT5 activation. Hyper-activated STAT5 leads to the aberrant expression of its target genes including antiapoptotic, proliferative, and pro-inflammatory genes, favouring tumorigenesis. In this review, we intend to discuss the biology of JAK/STAT pathway, with particular focus on STAT5 and its crucial role in the development and progression of hematologic malignancies. Furthermore, we provide a synopsis of potential therapeutic strategies based on STAT5 activity inhibition that may represent an excellent opportunity for drug development in oncohematology.

## Introduction

The Janus kinase (JAK) signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway is an intracellular mechanism which connects the extracellular signaling from cytokines, growth factors, and hormones, with the transcriptional machinery in the nucleus [1]. It is an evolutionarily highly conserved cellular cascade that includes the tyrosine kinase JAK, the transcription factor STAT, and different regulatory

proteins. In mammals, four JAKs and seven STATs have been identified [2]. Numerous essential cellular responses are mediated by JAK/STAT signaling, including cell proliferation, differentiation and migration, apoptosis, and cell survival. These cellular events are critical to a variety of biological functions like mammary gland development and lactation, sexually dimorphic growth, adipogenesis, angiogenesis, immune development, inflammatory response, and hematopoiesis [2, 3]. Under physiological conditions, JAK/STAT pathway activation–deactivation is tightly regulated. However, aberrant regulation of JAK/STAT has been identified in different pathological conditions such as cancer, atherosclerosis, and rheumatoid arthritis [3]. Dysregulation is commonly associated to permanent STAT activation, which has been reported to promote tumorigenesis, high-grade inflammation, and hyper-growing, among other processes, depending on the STAT family member [4]. Notably, among STAT proteins, STAT5 has emerged as a key activated transcription factor in many cancers [5]. Chiefly in hematologic cancers (HCs), STAT5

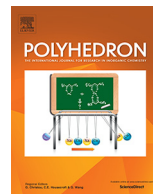
✉ Carlota Recio  
carlota.recio@ulpgc.es

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Farmacología Molecular y Traslacional - BIOPharm, Las Palmas de G.C., 35016 Las Palmas, Spain

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Bio-Organica (CIBICAN), Departamento de Química Organica, Universidad de La Laguna, 38206 Tenerife, Spain







## Synthesis, characterization and antiproliferative activity of mixed ligand complexes of Cu<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> with lapachol

Rita Hernández-Molina<sup>a,b</sup>, Pavel A. Abramov<sup>a,b,c,\*</sup>, Javier González-Platas<sup>d,e</sup>, Sandra Oramas-Royo<sup>b,f</sup>, Ana Estévez-Braun<sup>b,f</sup>, Miguel Guerra-Rodríguez<sup>g</sup>, Haidée Aranda-Tavío<sup>g</sup>, Borja Guerra<sup>g</sup>, Leandro Fernández-Pérez<sup>g</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Unidad Departamental de Química Inorgánica, Universidad de La Laguna 38200, La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>b</sup> Instituto Universitario de Biología Antonio González, Avda Astrofísico Francisco Sánchez N° 2, E-38206 La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>c</sup> Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry SB RAS, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>d</sup> Departamento de Física, Universidad de La Laguna, Avd. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, E-38200 La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>e</sup> Instituto Universitario de Estudios Avanzados en Física Atómica, Molecular y Fotónica (IUDEA) and MALTA Consolider Team, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, La Laguna, Tenerife E-38204, Spain

<sup>f</sup> Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>g</sup> Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Laboratorio de Farmacología Molecular y Traslacional, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 November 2018

Accepted 8 March 2019

Available online 21 March 2019

#### Keywords:

Lapachol

Copper

Cobalt

X-ray structures

Biological activity

### ABSTRACT

Mixed ligand complexes [Cu(phen)(Lap)<sub>2</sub>] (**1**) and [Co(dppeO)(Lap)<sub>2</sub>] (**2**) were synthesized from the reaction of lapachol (Lap) with [Cu(phen)Cl<sub>2</sub>] or [Co(dppe)Cl<sub>2</sub>] in the presence of Et<sub>3</sub>N. Complexes (**1**) and (**2**) were fully characterized by X-ray crystallography, elemental analyses, and infrared spectroscopy. Antiproliferative activities of complexes (**1**) and (**2**) against several tumor cell lines were also determined alongside those of [Cu(Lap)<sub>2</sub>(EtOH)<sub>2</sub>] (**3**) and [Co(Lap)<sub>2</sub>(EtOH)<sub>2</sub>] (**4**).

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lapachol, 2-hydroxy-3-(3'-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (Lap, Fig. 1), is a natural product obtained from the bark of various trees of the Bignoniaceae family. Several reports about the antitumor [1], antibiotic [2], antimalarial [3,4], trypanocidal [5] and leishmanicidal [6,7] activities of lapachol have been reported. Lapachol derivatives with pharmacological activities have also been studied [8,9], which shows the potential of lapachol functionalization to find new bioactive compounds. In general, the activity of the lapachol derivatives is related to the generation of reactive oxygen species (ROS) by redox cycling or intercalation between DNA base pairs [10]. Hence, the study of redox properties of these species is fundamental to understand the mechanism of bioactivity [11]. Electrochemical studies of the reduction of lapachol in DMF/TBAP 0.1 mol l<sup>-1</sup> on Hg and glassy carbon electrode

have been published, and the potential of the first well-defined wave, at  $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$  was determined as  $-0.715$  [12]. The introduction of electron-withdrawing or electron-donating groups can modulate the properties of this type of compound and represents an important strategy to obtain new active compounds [13]. A way to modulate the activity of naphthoquinones, such as lapachol, is the formation of metal complexes. Several metal complexes with lapachol as ligand are known [14–18]. In particular [Cu(Lap)<sub>2</sub>(bpy)] which is similar to presented complexes has been reported [17]. A manganese(II) lapacholate polymer has been described [19], where lapachol acts as a tridentate ligand, with two adjacent oxygen atoms chelating the metal and the remaining *trans*-quinonic oxygen binds to adjacent metal center. Correlation between the ROS and the cytotoxicity has been studied [19]. A series of naphthoquinones alongside a series of metal complexes derived from hydroxynaphthoquinones, such as lawsone, bis-lawsone, lapachol, plumbagin and juglone have been prepared [20]. Crystal structure, spectroscopic and thermal properties of [Zn(Lap)<sub>2</sub>(DMF)(H<sub>2</sub>O)] and isomorphous [M(Lap)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> (M: Cd, Mn) complexes have been

\* Corresponding authors at: Departamento de Química, Unidad Departamental de Química Inorgánica, Universidad de La Laguna 38200, La Laguna, Tenerife, Spain.

E-mail address: [abramov@niic.nsc.ru](mailto:abramov@niic.nsc.ru) (P.A. Abramov).





# A Novel Naphthoquinone-Coumarin Hybrid That Inhibits BCR-ABL1-STAT5 Oncogenic Pathway and Reduces Survival in Imatinib-Resistant Chronic Myelogenous Leukemia Cells

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Salvatore Salomone,  
Università degli Studi di Catania, Italy

### Reviewed by:

Kenneth K. W. To,  
The Chinese University of Hong Kong,  
China

Massimo Brogginì,  
Istituto di Ricerche Farmacologiche  
Mario Negri, Italy  
Sara Galimberti,  
University of Pisa, Italy

### \*Correspondence:

Leandro Fernández-Pérez  
leandrofco.fernandez@ulpgc.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Experimental Pharmacology  
and Drug Discovery,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

**Received:** 20 April 2018

**Accepted:** 18 December 2018

**Published:** 09 January 2019

### Citation:

Martín-Rodríguez P, Guerra B,  
Hueso-Falcón I, Aranda-Tavío H,  
Díaz-Chico J, Quintana J, Estévez F,  
Díaz-Chico B, Amesty A,  
Estévez-Braun A and  
Fernández-Pérez L (2019) A Novel  
Naphthoquinone-Coumarin Hybrid  
That Inhibits BCR-ABL1-STAT5  
Oncogenic Pathway and Reduces  
Survival in Imatinib-Resistant Chronic  
Myelogenous Leukemia Cells.  
Front. Pharmacol. 9:1546.  
doi: 10.3389/fphar.2018.01546

Patricia Martín-Rodríguez<sup>1</sup>, Borja Guerra<sup>1</sup>, Idaira Hueso-Falcón<sup>2</sup>, Haidee Aranda-Tavío<sup>1</sup>, Juan Díaz-Chico<sup>1</sup>, José Quintana<sup>3</sup>, Francisco Estévez<sup>3</sup>, Bonifacio Díaz-Chico<sup>1</sup>, Angel Amesty<sup>2</sup>, Ana Estévez-Braun<sup>2</sup> and Leandro Fernández-Pérez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Farmacología Molecular y Traslacional, Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain, <sup>2</sup> Departamento de Química Orgánica, Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, Universidad de La Laguna, San Cristóbal de La Laguna, Spain,

<sup>3</sup> Laboratorio de Bioquímica, Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain

BCR-ABL1-STAT5 is an oncogenic signaling pathway in human chronic myelogenous leukemia (CML) and it represents a valid target for anti-CML drug design. Resistance to direct BCR-ABL1 inhibitors is a common clinical issue, so STAT5 inhibition has become an interesting alternative target. In this study, the effects of NPQ-C6, a novel naphthoquinone-coumarin conjugate, were evaluated on human CML-derived K562 cells. Live-Cell Imaging analysis revealed that NPQ-C6 inhibited 2D (IC<sub>50</sub>AUC = 1.4 ± 0.6 μM) growth of CML cells. NPQ-C6 increased sub-G1 and reduced G0/G1 cell cycle phases in a dose- and time-dependent manner. This effect on cell cycle was related to increased levels of apoptotic nuclei, cleavage of caspase-3, -9, and PARP and annexin V-positive cells. NPQ-C6 increased γH2AX, a double-strand DNA break marker. NPQ-C6 showed a wide range of modulatory effects on cell signaling through an early increased phosphorylation of JNK, P38-MAPK and AKT, and decreased phosphorylation of ERK1/2, BCR-ABL1, and STAT5. NPQ-C6 inhibited expression of c-MYC and PIM-1, two target gene products of BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway. Cytokine-induced activation of STAT5/STAT3-dependent transcriptional and DNA binding activities were also inhibited by NPQ-C6. Notably, NPQ-C6 maintained its activity on BCR-ABL1/STAT5/c-MYC/PIM-1 oncogenic pathway in imatinib-resistant cells. Molecular modeling suggested BCR-ABL1 and JAK2 proteins as NPQ-C6 targets. In summary, our data show a novel multikinase modulator that might be therapeutically effective in BCR-ABL1-STAT5-related malignancies.

**Keywords:** leukemia, imatinib, BCR-ABL1, drug resistance, naphthoquinone, coumarin



## Chapter

# JAK, an Oncokinase in Hematological Cancer

*Carlota Recio, Haidée Aranda-Tavío,*

*Miguel Guerra-Rodríguez,*

*Mercedes de Mirecki-Garrido, Patricia Martín-Rodríguez,*

*Borja Guerra and Leandro Fernández-Pérez*

## Abstract

Janus kinases (JAKs) play an essential role in the regulation of cytokine signaling. They control cell survival, proliferation, differentiation, immune response, and hematopoiesis. Deregulation of JAK signaling has been associated to the pathogenesis of numerous immune-inflammatory diseases, hematological malignancies, and solid tumors. Thus, JAK proteins have emerged as attractive therapeutic targets in the last decade. The discovery of the gain-of-function JAK2 mutation (JAK2 V617F) as the main cause of polycythemia vera—a chronic myeloproliferative syndrome—led to the development of the JAK inhibitor ruxolitinib. This key finding opened the door to the search for new therapeutic agents able to suppress the constitutive activation of JAK signaling in hematological cancers and other tumors. However, given the conserved nature of the kinase domain among JAK family members, and the interrelated roles of JAK kinases in many physiological processes, including hematopoiesis and immunity, the broad usage of JAK inhibitors in hematology is challenged by their narrow therapeutic window. Novel therapies are, therefore, needed. This chapter focuses on the understanding of the complex signaling of JAK proteins in cancerous cells, the various JAK aberrations implicated in myeloproliferative neoplasms, leukemia, and lymphoma, and the clinically available JAK inhibitors in cancer therapy.

**Keywords:** blood cancer, hematological tumor, JAK, STAT, mutation, JAK2 V617F

## 1. Introduction

The Janus kinase (JAK) signal transducer and activators of transcription (STAT) intracellular pathway connects the signaling from extracellular cytokines, hormones, and growth factors, with the nuclear transcriptional machinery [1]. It is expressed in animals from flies to humans, being highly evolutionarily conserved [2]. The cascade consists of the tyrosine kinase JAK, the transcription factor STAT, and different regulatory proteins. In mammals, four JAKs and seven STATs have been identified [3]. JAK/STAT signaling controls numerous essential cellular responses, including cell proliferation, differentiation, migration, immune response, apoptosis, and cell survival, according to the signal, cell context, and tissue [4, 5]. These cellular events are crucial to a wide range of biological functions











