

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS CUMARÍNICOS Y
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA
HISTONA DEACETILASA CLASE I Y II EN FIBROBLASTOS
CARDÍACOS”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctora en Ciencias Farmacéuticas por:**

VIVIANA GLADYS PARDO JIMÉNEZ

Directores de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz Araya

Dr. Patricio Navarrete Encina

Santiago-CHILE

2019

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

VIVIANA GLADYS PARDO JIMÉNEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Ciencias Farmacéuticas, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz Araya _____

Dr. Patricio Navarrete Encina _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alejandro Álvarez L. (Presidente) _____

Dr. Carlos Pessoa M. _____

Dra. Lorena García N. _____

Dr. Hernán Pessoa M. _____

La presente tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Síntesis Orgánica Avanzada, Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica bajo la dirección del Dr. Patricio Navarrete Encina y en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Cardiovascular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, bajo la Dirección del Dr. Guillermo Díaz Araya.

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Proyecto FONDECYT 1130300 y 1170425.
- Beca Doctorado Nacional Conicyt N° 21140371.
- Beca de apoyo para gastos operacionales N° 21140371.

Publicaciones:

Pardo-Jiménez, V., Navarrete-Encina, P., Díaz-Araya, G. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Thiazolyl-Coumarin Derivatives as Potent Histone Deacetylase Inhibitors with Antifibrotic Activity. *Molecules*. **2019**, 24, 739.

Muñoz-Rodríguez C., Fernández S., Osorio J.M., Olivares F. Anfossi R. Bolívar S. Humeres C. Boza P. Vivar R. **Pardo-Jiménez V.**, Hemmings K.E., Turner N.A., Díaz-Araya G. Expression and Function of TLR4-induced B1R bradykinin receptor on Cardiac Fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, 351, 46-56.

Olivares Silva F., Landaeta R., Aránguiz P., Bolívar S., Humeres C., Anfossi R., Vivar R., Boza P., Muñoz C., **Pardo-Jiménez V.**, Peiró C., Sánchez Ferrer C., Díaz-Araya G. Heparan Sulfate potentiates leukocyte adhesion on cardiac fibroblast by enhancing VCAM-1 and ICAM-1 expression. *BBADis*. **2018**, 1864, 831-842.

Bolívar S., Anfossi R., Humeres C., Vivar R., Boza P., Muñoz C., **Pardo-Jiménez V.**, Olivares-Silva F., Díaz-Araya G. IFN- β Plays Both Pro- and Anti-inflammatory Roles in the Rat Cardiac Fibroblast Through Differential STAT Protein Activation. *Front. Pharmacol.* **2018**, 9, 1368.

Bolívar S., Santana R., Ayala P., Landaeta R., Boza P., Humeres C., Vivar R., Muñoz C., **Pardo-Jiménez V.**, Fernandez S., Anfossi R., Diaz-Araya G. Lipopolysaccharide activates Toll-Like Receptor 4 and prevents cardiac fibroblast-to-myofibroblast differentiation. *Cardiovasc. Toxicol.* **2017**, 4, 458-470.

Pardo-Jiménez V., Barrientos C., Pérez-Cruz K., Navarrete-Encina P.A., Olea-Azar C., Núñez-Vergara Luis J., Squella J.A. Synthesis and electrochemical oxidation of hybrid compounds: dihydropyridine-fused coumarins. *Electrochim. Acta*. **2014**, 125, 457-464.

Núñez-Vergara Luis J., **Pardo-Jiménez V.**, Barrientos C., Olea-Azar C.A., Navarrete-Encina P.A., Squella J.A. Dihydropyridine-fused and pyridine-fused coumarins: Reduction on a glassy carbon electrode in dimethylformamide. *Electrochim. Acta*. **2012**, 85, 336-344.

Salazar Ricardo, Navarrete-Encina P.A., Squella J.A., **Pardo-Jiménez V.**, Núñez-Vergara Luis J. Scavenging activity of C4-hydroxyphenyl and polyhydroxyphenyl-1,4-dihydropyridines towards free radicals. *Int. J. Chem. Kinet.* **2012**, 44, 810-820.

Pardo-Jiménez V., Barrientos C., Squella J. A., Navarrete-Encina P. A., Luis J. Núñez-Vergara. Electrochemical Oxidation of 7-, 8- and 9-hydroxy-3-ethoxycarbonyl-2,4-dimethylcoumarin[4,3-b]Pyridine Isomers at Glassy Carbon in Dimethylformamide. *J. Electrochem. Soc.* **2011**, 158, 166-172.

Ricardo Salazar, P.A. Navarrete-Encina, J.A. Squella, C. Barrientos, **V. Pardo-Jiménez**, Luis J. Núñez-Vergara. Study on the oxidation of C4-phenolic-1,4-dihydropyridines and its reactivity towards superoxide radical anion in dimethylsulfoxide. *Electrochim. Acta*, **2010**, 56, 841–852.

Presentaciones en Congresos:

2017

"Inhibitor effect on the class I histone deacetylase for new thiazolyl-coumarin derivatives". **Pardo-Jiménez, V.**, Díaz-Araya, G.A., Navarrete-Encina, P.A., XXXIX Congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Puerto Varas, Chile, 22-25 Noviembre 2017.

2016

"Síntesis y evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima histona deacetilasa de nuevos derivados tiazolilcumarínicos". **Pardo-Jiménez,V.**, Díaz-Araya, G.A., Navarrete-Encina, P.A., XXXVIII Congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Hotel Enjoy de la Isla, Ciudad de Castro, Chiloé, Chile, 26-29 Noviembre 2016.

2015

"Histone deacetylase inhibitors: Synthesis, docking and citotoxicity of thiazolylcoumarins derivatives". **Pardo-Jiménez, V.**, Díaz-Araya, G.A., Navarrete-Encina, P.A.,. Congreso Conjunto de Sociedad de Farmacología, Neurociencia y Ciencias fisiológicas, Coquimbo, Chile, 22 - 25 Septiembre 2015.

2014

"Diseño, síntesis y estudios de unión de la N-lipoil-3-acetilcumarina a la enzima histona deacetilasa". **Pardo-Jiménez, V.**, Díaz-Araya, G.A., Navarrete-Encina, P.A., XXXVI Congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Termas de Chillán, 5-7 de noviembre de 2014.

2013

"Design and synthesis of 3-aminoacetyl-coumarins-N-substituted as potential histone deacetylase inhibitors", **Pardo-Jiménez, V.** Núñez-Vergara, L.J., Díaz-Araya, G.A., Navarrete-Encina, P.A. XXXV Congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Dreams Hotel Casino & Spa, Valdivia, Chile 27-30 de Noviembre 2013.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AcOEt: Acetato de etilo

α -SMA: alfa actina de músculo liso

CAP: cabeza de grupo

DCC: Diciclohexilcarboiimida

DCU: Diclohexilurea

DMEM: Medio de mantención modificado Dulbecco

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECL: Quimioluminiscencia aumentada

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EtOH: Etanol

FBS: Suero fetal bovino

FC: Fibroblasto cardiaco

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-(1)] etanosulfónico

HDAC: Histona deacetilasa

iHDAC: inhibidor de histona deacetilasa

IL-1 β : Interleuquina 1 beta

IL-12: Interleuquina 12

INF γ : Interferón gamma

LPS: Lipopolisacárido

MEC: Matriz extracelular

MeOH: Metanol

NHS: N-hidroxisuccinimida

MMP: metaloproteinasa

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada

NO: óxido nítrico

NFκB: Factor nuclear kappa B

PBS: Tampón fosfato salino

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

rpm: Revoluciones por minuto

SEM: Error promedio estándar

TBS: Tampón de tris salino

TGF-β: Factor de crecimiento transformante β

TSA: Tricostatina

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

SAHA: Monoanilida del ácido suberoil hidroxámico

ZBG: Grupo de unión al zinc

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.2 <i>Histonas deacetilasas (HDACs)</i>	4
1.3 <i>Inhibidores de las histonas deacetilasas (iHDACs)</i>	6
1.4 <i>Síntesis de nuevos inhibidores</i>	8
1.5 <i>Fibroblastos cardíacos e histonas deacetilasas</i>	13
2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO	18
3. OBJETIVO GENERAL	18
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4. 1 <i>Materiales</i>	18
4. 2 <i>Metodología</i>	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1. ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS 3-AMINOACETILCUMARINAS: OBTENCIÓN DEL CAP	35
5.7 ESTUDIOS DE VIABILIDAD	56
5.7.1 <i>Estudio de la viabilidad de fibroblastos cardíacos de ratas neonatas en presencia de los compuestos sintetizados</i>	56
5.8 ESTUDIOS DE INHIBICIÓN HDACs	69
5.8.1 <i>Efecto de los derivados sintetizados sobre la inhibición de la actividad histona deacetilasa clase I y II</i>	69
5.8.2 <i>Efecto de los derivados sintetizados sobre la inhibición de la actividad histona deacetilasa en fibroblastos cardíacos</i>	80
5.8.3 ESTUDIO TEÓRICO	82
5.8.3.1 <i>Estudio de acoplamiento molecular inducido (Docking)</i>	82

5.9.1 ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN.....	107
<i>5.9.1 Efecto de los derivados sintetizados sobre la proliferación inducida por suero, en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas</i>	<i>107</i>
5.9.2 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	115
<i>5.9.2.1 Efecto de los derivados sintetizados sobre los niveles de expresión de la proteína alfa-actina del músculo liso (α-SMA).....</i>	<i>115</i>
<i>5.9.2.2 Efecto de los derivados sintetizados sobre los niveles de expresión de la proteína colágeno I en fibroblastos cardíacos de ratas neonatas.....</i>	<i>118</i>
6. CONCLUSIONES.....	123
7. REFERENCIAS.....	124