



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología Biología Molecular y Celular

**“Caracterización funcional de esteroides sintéticos
moduladores del receptor nuclear *DAF-12*. Análisis de su
potencial uso en el control biológico de nematodos parásitos
de plantas”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Vanessa Judith Santillán Zabala

Directora: Dra. Olga Alejandra Castro

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Iusem

Lugar de trabajo: Depto. de Fisiología, Biología Molecular y Celular-Laboratorio de
Glicobiología y Regulación Hormonal del Desarrollo en Nematodos, Facultad de Cs
Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales, Facultad de
Agronomía. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 21 de Mayo del 2020

RESUMEN

Los receptores nucleares (RN) son factores de transcripción activados por la unión de pequeñas moléculas lipofílicas que juegan un papel importante en la regulación de diversos procesos biológicos, tales como el metabolismo, el desarrollo y la reproducción. El nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* es capaz de ajustar su ciclo de vida basado en su entorno. En condiciones favorables, este nematodo sufre un rápido desarrollo a través de cuatro etapas larvales (L1 a L4), mientras que frente a condiciones adversas, puede tomar la decisión de entrar en un ciclo de vida alternativo (*dauer*). Este ciclo de vida está regulado por un sistema endócrino en el cual participa el DAF-12 y cuyos ligandos son compuestos esteroidales denominados ácidos dafacrónicos (AD). Si bien este sistema fue descrito inicialmente en *C. elegans*, se demostró posteriormente que el mismo es funcional en gusanos parásitos. Estudios anteriores demostraron que algunos esteroides sintéticos son capaces de regular el ciclo de vida de *C. elegans* presentando actividad agonista en gusanos mutantes capaces de abandonar el estadio *dauer* y retomar el ciclo reproductivo mediante la unión selectiva al DAF-12, y por otro lado presentaron actividad antagonista retrasando el desarrollo en gusanos salvajes. Por lo tanto, es posible pensar que otros compuestos análogos pueden servir para interrumpir el ciclo de vida de los parásitos debido a que poseen una etapa equivalente al estadio *dauer* que constituye la etapa infecciosa. En esta tesis se estudió la actividad de una serie de compuestos sintéticos esteroidales análogos a los AD con actividad antagonista derivados de los estudiados anteriormente a los cuales se les agregaron cadenas laterales difluorometilo modificadas para modular selectivamente la unión al receptor, y compuestos con actividad agonista mediante otra estrategia simple y rápida que permitió la generación de una pequeña biblioteca de esteroides que tienen α -aminoacilamidas estructuralmente diversas como cadenas laterales. Se caracterizaron funcionalmente a estos ligandos sintéticos mediante ensayos de genes reporteros en células e *in vivo* en *C. elegans*. Basados en la idea de que los parásitos tenían el mismo sistema de regulación, se pensó en analizar el efecto de estos compuestos en el tratamiento de parásitos de plantas, en particular del parásito emergente *Meloidogyne incognita*. Se buscaron genes ortólogos de CeDAF-12 en el proteoma de *M. incognita*, mediante estudios bioinformáticos. Una vez confirmada la existencia de estos genes por homología, probamos los compuestos agonistas y antagonistas que fueron caracterizados en *C. elegans*, como blancos del DAF-12 de *M. incognita* que controlen el ciclo de vida infeccioso de este fitonematodo, obteniendo un control efectivo con un compuesto antagonista en plantas de *Tomate platense*.

Palabras Claves: Receptor Nuclear DAF-12, Ácidos Dafacrónicos, esteroides sintéticos, ciclo de vida, infección, *Meloidogyne*.

"Functional characterization of modulatory synthetic steroids of the DAF-12 nuclear receptor. Analysis of its potential use in the biological control of plant parasitic nematodes "

SUMMARY

Nuclear receptors (NR) are transcription factors activated by the binding of small lipophilic molecules that play an important role in the regulation of various biological processes, such as metabolism, development and reproduction. The free-living nematode *Caenorhabditis elegans* is able to adjust its life cycle based on its environment. Under favorable conditions, this nematode undergoes rapid development through four larval stages (L1 to L4), whereas in the face of adverse conditions, it can make the decision to enter an alternative life cycle (*dauer*). This life cycle is regulated by an endocrine system in which DAF-12 participates and whose ligands are steroidal compounds called dafachronic acids (DA). Although this system was initially described in *C. elegans*, it was later shown to be functional in parasitic worms. Previous studies showed that some synthetic steroids are capable of regulating the life cycle of *C. elegans* by presenting agonist activity in mutant worms capable of leaving the dauer stage and resuming the reproductive cycle by selective binding to DAF-12, and on the other hand, they presented antagonistic activity delaying development in wild worms. Therefore, it is possible to think that other analogous compounds can serve to interrupt the life cycle of parasites because they have a stage equivalent to the dauer stage that constitutes the infectious stage. In this thesis we studied the activity of a series of synthetic steroidal compounds analogous to AD with antagonistic activity derived from those previously studied to which modified difluoromethyl side chains were added to selectively modulate receptor binding, and compounds with agonist activity by Another simple and fast strategy that allowed the generation of a small library of steroids that have structurally diverse α -aminoacylamides as side chains. These synthetic ligands were functionally characterized by reporter gene assays in cells and *in vivo* in *C. elegans*. Based on the idea that parasites had the same regulatory system, it was thought to analyze the effect of these compounds in the treatment of plant parasites, in particular the emerging parasite *Meloidogyne incognita*. Orthologous CeDAF-12 genes were searched for in the *M. incognita* proteome through bioinformatic studies. Once the existence of these genes was confirmed by homology, we tested the agonist and antagonist compounds that were characterized in *C. elegans*, as targets of the DAF-12 of *M. incognita* that control the infective life cycle of this phytonematode, obtaining effective control with antagonistic compound in tomato platense plants.

Keywords: DAF-12 Nuclear Receptor, Dafachronic Acids, synthetic steroids, life cycle, infection, *Meloidogyne*.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que fue quien me abrió esta puerta para poder seguir ampliando mi experiencia y conocimientos, sin duda sin Él no hubiera podido llegar a alcanzar esta meta en mi vida, que en un inicio no la tenía en mis planes, y sin embargo se convirtió en el desafío más grande que tuve hasta ahora.

A mi Familia, que siempre ha estado motivándome y sintiéndose orgullosa por mis avances en todo, fueron mi motor para seguir en esta aventura. La distancia nunca ha sido un impedimento para sentir su apoyo y amor siempre.

A mi directora Dra. Olga Castro por su paciencia, por brindarme sus conocimientos, hacerme partícipe de sus proyectos e impulsarme a dar lo mejor cada día. A pesar de haber tenido momentos difíciles como en todo desafío, tuvo la mejor disposición y pudimos llegar juntas hasta el final, gracias Ale por confiar en mí.

A mi esposo Sebastian que muchas veces vio mi cara de cansancio, y estuvo ahí para decirme que soy muy capaz y puedo todo! Y también se alegró con mis éxitos y me animó a ir por más.

A mi abuelita Judith que a pesar de no haber podido venir para la defensa de mi tesis, siempre estuvo mensajeándome y pendiente de mí. Soy la primera nieta doctora de la familia abue! Sé que el abuelito Bolívar está orgulloso también y en el cielo celebra con nosotros.

Agradezco al grupo de trabajo del Dr. Gerardo Burton, Dr. Cristian Rodríguez, Dr. Lautaro Álvarez, Dra. Celeste del Fueyo, por proporcionarme los esteroides y permitirme colaborar en sus proyectos. Especialmente a Gerardo quien inicialmente figuraba como codirector y que por motivos administrativos en el cambio de subcomisión de doctorado, no pudimos incluirlo, sin embargo siempre estuvo en los informes de seguimiento de tesis y estuvo al tanto de mi proceso, muchas gracias.

Mi gratitud al Dr. Javier Ramírez y su equipo, no solo por la síntesis de los compuestos que enriquecieron mi tesis, sino también por la motivación y empuje para que den bien los experimentos.

A la Dra. Eliana Munarriz, Dra. Florencia Kronberg por proporcionarme las herramientas para trabajar con los fitoparásitos *Meloidogyne* en la Facultad de Agronomía.

A Vicky que, aunque se incorporó con nuestro equipo en el último año, siempre estuvo atenta a todas las instrucciones y me ayudó con la mejor predisposición en lo que podía.

A Seba Rivas por ayudarme con el Image J, Photoshop, y regar las plantas, siempre compartirme un mate y preguntar cómo va todo.

A Lean por ayudarme con el electroporador, por conseguir la campana de AGBT y sacarme una sonrisa con sus ocurrencias.

A Sofi por ayudarnos a regar las plantas en el IB3 y siempre preguntar cómo iba la tesis.

A Mariana por ocuparse de regar las plantas de tomate en agronomía y evitarme un tremendo viaje para eso.

A Axel por ayudarme a fotografiar los J2 en el microscopio de campo oscuro en el cuarto piso.

Gracias a todos los del iB3 que me pararon en el pasillo a preguntarme cómo iba con la tesis, o a los que no dudaron en brindarme su afecto y su cariño.

A mis amigos y amigas quienes siempre estuvieron presentes a lo largo de este tiempo apoyándome. Sobre todo a mi amiga Marian que estuvo muy presente en la última etapa motivándome para llegar a la meta.

“Aunque tu principio haya sido pequeño, Tu postrer estado será muy grande.”

Job 8:7 (RVR1960)

ABREVIATURAS

RN: receptores nucleares

AD: Ácidos Dafacrónicos

FT: factores de transcripción

SupNR: receptores nucleares suplementarios

LBD: Dominio de unión al ligando

ERH: elementos de respuesta hormonal

IGF: Factor de crecimiento insulínico

IIS: camino señalización insulina/ IGF-1

HDAC: histona desacetilasas

HAT: histonas acetiltransferasas

HMT: histonas metiltransferasas

FXR: receptores farnesoide X

LXR: receptores de hígado

RAR: receptores de ácido retinoico

RXR: receptores retinoides X

VDR: receptores de vitamina D

HNF4: factor nuclear de hepatocitos 4

SF-1: Factor 1 esteroideogénico

LRH-1: receptor hepático Homolog-1

GCNF: factor nuclear de células germinales

ER: elementos de respuesta

RE: receptores esteroides

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

GFP: proteína verde fluorescente

NGM: Nematode Growth Medium

HEK: Human Embryonic Kidney cells

ONPG: orto-nitrofenilgalactopiranosido

AD: Ácidos Dafacrónicos

FT: factores de transcripción

SupNR: receptores nucleares suplementarios

LBD: Dominio de unión al ligando

HRE: elementos de respuesta hormonal

IGF: Factor de crecimiento insulínico

IIS: camino señalización insulina/ IGF-1

HDAC: histona desacetilasas

HAT: histonas acetiltransferasas

HMT: histonas metiltransferasas

FXR: receptores farnesoide X

LXR: receptores de hígado

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

GFP: proteína verde fluorescente

NGM: Nematode Growth Medium

HEK: Human Embryonic Kidney cells

ONPG: orto-nitrofenilgalactopiranosido

EC₅₀: Concentración efectiva 50

M9: Buffer M9

Abreviaturas de los Compuestos Ensayados:

- 1: DAF-2: $\Delta^{4,24}$ -AD
- 2: DAF-4: 24-hidroxi-3-ceto-4-coleno
- 3: 11CR112: 24-difluorometil-4-colen-3-ona
- 4: G01-168: 24-difluorometilideno-4-colen-3-ona
- 5: CC1-155P: (20S)-20,24-Epoxicol-4-en-3-ona
- 6: SP: Ácido (20S,24S)-20,24-Epoximetano-3-oxo-27-norcolest-5-en-26-oico
- 7: MP: Ácido (20S,24R)-20,24-Epoximetano-3-oxo-27-norcolest-5-en-26-oico
- 8: AG-ácido C20: Ácido (17 β) -3-oxoandrost-4-eno-17-carboxílico
- 9: AG-UGI-3D ac: Ácido {4 - [(N-ciclopropil-N - {(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il} carbonil} glicil) amino] fenil} acético
- 10: AG-UGI-1C ac: N- [4- (carboximetil) fenil] -N - {(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il} carbonil} glicilglicina
- 11: AG-UGI-1E ac: N - [(4 - {(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il} carbonil} piperazin-1-il) acetil] glicina
- 12: AG-UGI-1H ac: N- (2,4-dimetoxibencil) -N - {(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il} carbonil} glicilglicina
- 13: AG-UGI-1H NH ac: N - {(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il} carbonil} glicilglicina
- 14: 22-S: 22-S-Hidroxicolesterol
- 15: Ácido Desoxicólico: (3 α ,5 β ,12 α)-3,12-Dihidroxicolan-24-oico
- 16: Ácido Litocólico: (3 α ,24 α)-3,12-Dihidroxicolan-24-oico
- 17: Progesterona

Índice

RESUMEN.....	2
SUMMARY	3
ABREVIATURAS.....	6
1. INTRODUCCION	14
1.1 Origen de los Receptores Nucleares	15
1.2 Estructura	16
1.3 Transactivación y transrepresión	19
1.4 Interacciones Receptores Nucleares-ligando	20
1.5 Interacciones Receptores Nucleares-ADN	20
1.6 Interacciones Receptores Nucleares-proteínas co-reguladoras.....	21
1.7 Clasificación de los RN según el mecanismo de acción.....	21
1.8 Modelo biológico: <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
1.9 Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	23
1.10 Larvas <i>dauer</i>	25
1.11 Elección del ciclo de vida y transducción de las señales ambientales	26
1.12 Ácidos dafacrónicos	27
1.13 Vía biosintética de los Ácidos Dafacrónicos	28
1.14 Sistema endócrino en el que participan los AD y DAF-12	29
1.15 Ligandos sintéticos de DAF-12	31
1.16 Importancia de los RN en la química medicinal	32
1.17 Estrategias de síntesis químicas de ligandos putativos del DAF-12	33
1.18 DAF-12 en nematodos parásitos	35
1.19 Nematodos parásitos de plantas.....	36
1.20 Ciclo de Vida de <i>Meloidogyne</i>	37
1.21 Reproducción de <i>Meloidogyne</i>	39
1.22 Métodos de Control de la infección por NPP	39
2. OBJETIVOS GENERALES	42
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3. HIPOTESIS	43
4. MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1 Caracterización <i>in vivo</i> de compuestos mediante ensayos de actividad biológica en <i>C. elegans</i>	47
4.1.1 Cepas utilizadas, condiciones de crecimiento y medios de cultivo.....	47

4.1.2 Preparación de <i>E. coli</i> como alimento para <i>C.elegans</i> y conservación de las cepa OP50.	48
4.1.4 Transferencia de gusanos cultivados en placas NGM	49
4.1.5 Descontaminación de <i>C.elegans</i>	49
4.1.6 Ensayo de actividad agonista de compuestos en la cepa <i>daf-9(dh6)</i>	50
4.1.7 Ensayo de actividad antagonista de los compuestos utilizando la cepa salvaje N2	52
4.1.8 Montaje de los gusanos para observación al microscopio	53
4.2 Caracterización de los compuestos mediante ensayos de genes reporteros en células HEK 293T	54
4.2.2 Soluciones de esteroides	54
4.2.3 Plásmidos utilizados	55
4.2.4 Líneas celulares	56
4.2.5 Preparación de la solución madre de polietilenimina	56
4.2.6 Ensayo de genes reporteros	56
4.2.7 Medición Actividad β -galactosidasa	58
4.2.8 Medición Actividad Luciferasa	58
4.3 Métodos computacionales y análisis in silico para identificación de genes ortólogos de <i>Cedaf-12</i> en <i>M. incognita</i>	58
4.3.1 Identificación de receptores hormonales en el proteoma de <i>M. incognita</i>	58
4.3.2 Identificación de homólogos de CeDAF-12 en <i>M. incognita</i>	58
4.3.3 Modelo de homología	59
4.4 Ensayos de Actividad de los compuestos en plantas infectadas con <i>Meloidogyne</i>	59
4.4.1 Extracción de huevos de <i>Meloidogyne</i> y obtención del estadio J2 infectivo	59
4.4.2 Ensayos de Eclosión de huevos de <i>Meloidogyne</i>	59
4.4.3 Ensayo de mortalidad de J2	60
4.4.4 Infección de plantas de tomate	60
4.4.5 Ensayos de Migración con J2 tratados	61
4.5 Extracción de DNA plasmídico (miniprep)	61
4.6 Amplificación por PCR de fragmentos diagnósticos para la identificación de los genes de <i>M. incognita</i>	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
CAPITULO I	64
5. 1 Evaluación de la actividad biológica de los análogos sintéticos de los ácidos dafacrónicos en ensayos de genes reporteros e <i>in vivo</i> .	66
Ensayos <i>in vivo</i>	67
5.1.1 Los compuestos 3, 4 y 5 muestran actividad antagonista <i>in vivo</i>	67
Ensayos de genes reporteros en células de mamífero	72

5.1.2 El compuesto 3 presenta actividad antagonista en ensayos de genes reporteros (En colaboración con la Dra. Virginia Dansey).....	72
5.1.3 El compuesto 6 es un agonista fuerte capaz de rescatar el fenotipo Daf-c del alelo nulo daf-9	74
5.1.4 Gusanos salvajes crecidos en presencia del compuesto 6 pusieron un número de huevos mayor que el control	79
Ensayos de genes reporteros	81
5.1.5 El compuesto 6 presenta actividad agonista fuerte en ensayos de genes reporteros (en colaboración con la Dra. Celeste del Fuego)	81
CAPITULO II.....	83
5.2 Nuevo repertorio de ligandos del receptor DAF-12. Evaluación de la actividad biológica de compuestos con α -aminoacilamidas estructuralmente diversas como cadenas laterales.	84
5.2.1 Ensayos <i>In vivo</i>	86
5.2.1.1 Los compuestos 8-10 rescatan el fenotipo Daf-c en la cepa nula para el gen <i>daf-9</i>	86
5.2.1.2 Los compuestos 8-11 producen un retraso en la eclosión de los huevos en gusanos salvajes.....	91
5.2.1.3 Los compuestos 8-11 reducen la fertilidad en gusanos salvajes.....	95
5.2.1.4 Efecto de los compuestos 8-11 sobre la expectativa de vida.	96
5.2.2 Ensayos de transactivación de genes reporteros en células.....	98
5.2.2.1 Los compuestos 8-10 presentan actividad agonista del CeDAF-12 en ensayos de genes reporteros.	98
5.2.2.2 La unión de los compuestos 8-10 es desplazada en presencia del compuesto 2.....	99
5.2.2.3 Los compuestos 8-13 presentan actividad antagonista de CeDAF-12 en ensayos de genes reporteros.	100
5.2.3 Ensayos <i>In Silico</i>	101
5.2.3.1 Acoplamiento de los compuestos 9-11 al receptor ceDAF-12. Realizado en colaboración con el Dr. Lautaro Alvarez)	102
5.2.3.2 Simulaciones de dinámica molecular del compuesto 9 unido al receptor CeDAF-12.	103
CAPITULO III.....	104
5.3.1 Identificación y caracterización molecular de los genes ortólogos de <i>Cedaf-12</i> en <i>Meloidogyne incognita</i>	107
5.3.1.1 <i>minc18013</i> y <i>minc10028</i> son homólogos de <i>Cedaf-12</i> en <i>M. incognita</i>	107
5.3.1.2 <i>minc18013</i> y <i>minc10028</i> codifican proteínas homologas a DAF-12 en <i>M. incognita</i> .	109
CAPITULO IV	110
5.4 Análisis del potencial uso de compuestos sintéticos análogos de los AD en el control de los procesos infectivos de <i>Meloidogyne incognita</i>	112
Ensayos <i>in vivo</i>	112
5.4.1 Los compuestos antagonistas inhiben la eclosión de huevos de <i>M. incognita</i> y aumentan la mortalidad de J2	112

5.4.2 Determinación de las condiciones apropiadas para estudiar el efecto del compuesto 2 sobre el ciclo de vida y la infección de <i>M. incognita</i>	113
5.4.3 El compuesto 2 es un potente antagonista con potencial efecto para controlar la infección de <i>M. incognita</i>	115
5.4.4 El compuesto 2 reduce la migración de J2 hacia la raíz de plantas de tomate	116
5.4.5 El compuesto 2 presenta un efecto de transgeneracional de letalidad embrionaria	117
5.4.6 El tratamiento con el compuesto 2 mejora los parámetros de crecimiento de las planta de tomate.....	118
Ensayos en genes reporteros en células de mamífero	120
5.4.7 Evaluación de la actividad agonista sobre MINC10028 y MINC18013 en ensayos de genes reporteros.	121
5.4.8 Los compuestos 8-13 no logran reducir el porcentaje de eclosión ni la mortalidad de J2	122
CONCLUSIONES.....	123
CAPITULO I: Evaluación de la actividad biológica de los análogos sintéticos de los ácidos dafacronicos in vitro e <i>in vivo</i>	124
CAPITULO II: Nuevo repertorio de ligandos del RN DAF-12. Evaluación de la actividad biológica de compuestos con α -aminoacilamidas estructuralmente diversas como cadenas laterales. ...	126
CAPITULO III: Identificación y caracterización molecular de los genes ortólogos de <i>Cedaf-12</i> en <i>Meloidogyne incognita</i>	128
CAPITULO IV: Análisis del potencial uso de compuestos sintéticos análogos de los AD en el control de los procesos infectivos de <i>M. incognita</i>	128
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
ANEXOS.....	133
Anexo 1. Síntesis de 24-difluorometil-4-colen-3-ona (compuesto 3)	133
Anexo 2. Síntesis de 24-difluorometilideno-4-colen-3-ona (compuesto 4)	133
Anexo 3. Obtención de los ácidos 6 y 7	134
Anexo 4. Obtención de los compuestos mediante U-4CR.....	135
Anexo 5. Tabla S1. Receptores de hormona en <i>M. incognita</i>	144
Anexo 6. Tabla S2. Homólogos <i>CeDAF-12</i> identificados en <i>M. incognita</i>	145
Anexo 7. Figura S1: Alineamiento de secuencia multiple de <i>CeDAF-12</i> con Minc10028 y Minc18013 usando el programa Clustal Omega	146

INTRODUCCIÓN

Los receptores nucleares (RN) constituyen una familia de factores de transcripción que juegan un papel importante en numerosos procesos biológicos tales como el metabolismo, la reproducción y la inflamación. El primer miembro de la familia de RN en humanos fue clonado en 1985 y actualmente esta familia incluye 48 miembros. (1,2). La mayoría de los RN se encuentra regulada endógenamente por pequeños ligandos lipofílicos entre los cuales podemos mencionar los esteroides, los retinoides y los fosfolípidos. Esta familia de proteínas contiene además miembros "huérfanos" para los cuales aún no se han identificado sus ligandos. Es importante destacar la capacidad que poseen los RN para controlar múltiples fenómenos celulares en respuesta a moléculas pequeñas naturales y sintéticas. Esta característica los convierte en blancos terapéuticos ideales para controlar los procesos biológicos en los cuales participan. Los RN son capaces de unirse directamente a secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta hormonal (ERH). Una vez que el RN se ha unido al ADN, proteínas co-reguladoras y remodeladoras de la cromatina son reclutadas y junto a la maquinaria transcripcional activan o reprimen la expresión del gen de interés (3). Dado que los RN son responsables de la regulación de la expresión de miles de genes su actividad se encuentra estrictamente controlada. Enfermedades como el cáncer, la diabetes y la inflamación crónica son el producto, en muchos casos, de la pérdida de la regulación de la expresión de distintos RN. (4). El conocimiento adquirido sobre la estructura, la regulación y el mecanismo de acción de los RN se ha ampliado muchísimo en la última década debido a los avances en metodologías científicas relacionadas a estudios estructurales de los dominios proteicos que constituyen los receptores y a la identificación de nuevas proteínas co-reguladoras que modulan la actividad del receptor (5).

El avance en el conocimiento sobre los RN ha permitido establecer las bases para que las compañías farmacéuticas e investigadores académicos puedan desarrollar ligandos sintéticos que interactúen con dichos receptores (6). Sin embargo, debido a que la mayoría de los compuestos sintetizados no son estrictamente específicos para un receptor ya que los RN regulan una gran cantidad de genes, las drogas que se dirigen a los NR poseen efectos secundarios no deseados (7). Por esta razón, resulta imprescindible comprender los mecanismos que regulan tanto la expresión como la actividad de los RN a fin tanto de encontrar drogas más apropiadas como nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades.

1.1 Origen de los Receptores Nucleares

Los genes que codifican proteínas con funciones de RN se encuentran presentes y se expresan en algunos organismos simples fuera del grupo de los vertebrados. Se han identificado genes que codifican proteínas con dominios homólogos a los presentes en vertebrados en los parientes más cercanos de metazoos, conocidos como coanoflagelados unicelulares, entre los cuales se encuentra *Monosiga brevicollis*. A este grupo de eucariotas unicelulares se les atribuye una gran importancia filogenética, ya que se supone que los mismos son los parientes más próximos a los animales propiamente dichos. Por otro lado, cabe mencionar que los RN se encuentran ausentes en hongos y plantas.

Por lo tanto, los RN parecen haber surgido hace aproximadamente 635 millones de años, momento en que comienza el registro fósil de los primeros animales. Suponiendo que los RN también estuvieran presentes en los antepasados de aquellos primeros animales que evolucionaron en los océanos hace más de 270 millones de años y antes de que aparecieran los primeros animales en la tierra (hace aproximadamente 365 millones de años), los mismos estarían presentes en los animales antes de la aparición de los sistemas respiratorio, nervioso y circulatorio. Además, con seguridad la aparición de los RN resulta anterior a la aparición de los sistemas endócrinos. Sin embargo, nuestro conocimiento actual sobre los RN y sus ligandos se basa en gran parte en estudios realizados en el contexto de la señalización endócrina en mamíferos, grupo que apareció en la evolución aproximadamente 440 millones de años después de la aparición del primer gen que codifica un RN. (8).

En total, se han identificado más de 900 genes que codifican RN en animales, desde los más simples hasta los más complejos desde el punto de vista morfológico. Los organismos animales más simples, como las esponjas tienen de 1 a 4 genes que codifican RN (6-8). Los organismos morfológicamente algo más complejos, como los corales y las anémonas de mar (cnidarios), tienen entre 10 y 17 genes que codifican RN, mientras que los insectos y los vertebrados tetrápodos tienen aún un número mayor de los mismos (aproximadamente 21 y 25 respectivamente). Los mamíferos, incluyendo ratas, ratones y humanos, tienen aproximadamente 48 genes que codifican para RN. Aproximadamente para la mitad de los 48 RN encontrados en humanos se conoce cuál es el ligando mientras que el resto de los RN son huérfanos, es decir que para los mismos todavía no han sido identificados sus ligandos (6). Sin embargo, existen nematodos que poseen un número inusualmente alto de genes que codifican RN, por ejemplo, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Este organismo posee 284 genes que codifican RN, quince de los cuales

presentan homólogos claramente identificados en otras especies (HNF4, VDR, COUP-TF, SF1, ROR, PNR, GCNF, TLX en humanos y DHR3, DHR38, E75, E78, DHR78 y DHR96 en *Drosophila*). Los 271 RN restantes surgieron a partir de la amplificación de un gen ancestral homólogo al HNF4 (8) y a los mismos se los conoce como receptores nucleares suplementarios (SupNR) (9).

Basados en la evidencia mencionada anteriormente, aunque existen algunas excepciones, parecería haber una relación entre el número de células y la complejidad de tejidos de un organismo con el número de genes que codifican RN. Dicha relación, por otro lado, apoyaría la teoría que propone que los RN podrían haber jugado un papel importante en el rápido desarrollo de los metazoos (7).

Si bien dicha teoría parece estar bien fundada, la relación precisa entre el número, la variedad de RN y la complejidad morfológica queda aún por ser dilucidada. No obstante, el punto que se encuentra claramente establecido es que los RN estuvieron presentes en los organismos mucho antes de que se desarrollaran los sistemas endócrinos.

1.2 Estructura

Los miembros de la superfamilia de RN son proteínas que presentan una organización modular, poseen una región N-terminal (dominios A/B), que es una región no conservada, de tamaño e importancia funcional muy variable que contiene una superficie con función de activación 1 (AF1), seguida de un dominio de unión a ADN que se denomina DBD (por **DNA Binding Domain**) o dominio C. Además, suelen diferenciarse una región C-terminal que engloba el dominio de unión a ligando (LBD **Ligand Binding Domain** o dominio E), que es un dominio también conservado en esta superfamilia aunque menos que el DBD, unidos por una región bisagra (dominio D). En algunos receptores se considera también dentro de esta región C-terminal, un dominio F de función desconocida (10) (Fig. 1).

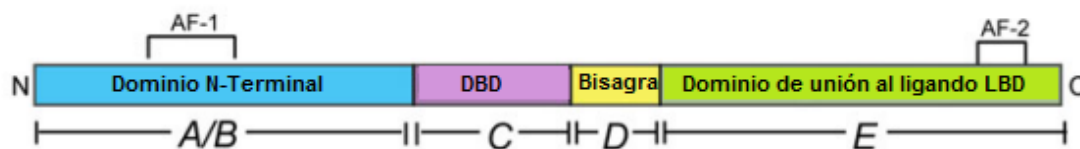


Figura 1: Organización estructural de los receptores nucleares. (Adaptado de Weikum, 2018). La estructura básica de los RN está compuesta por un Dominio N-Terminal no estructurado que contiene la superficie de función de activación 1 (AF-1), el DBD que presenta una estructura de dedos de zinc, una región de bisagra flexible y un dominio LBD al cual se une el ligando e interactúa con las proteínas co-reguladoras a través de la superficie de función de Activación 2 (AF-2).

- Región N-terminal

Esta región es la más variable, tanto en tamaño como en secuencia y función. En algunos casos, como el de los receptores de hormonas esteroideas (RE), esta región juega un papel importante en la inducción de la transcripción, ya que se ha descrito en esta región un dominio denominado AF-1 que se encuentra implicado en la transactivación independiente de ligando. Es frecuente que esta región contenga sitios de fosforilación de proteínas kinasas que participan en diferentes rutas de señalización, pudiendo esta modificación postraducciona afectar significativamente su actividad transcripcional (10).

- Dominio de unión a ADN (DBD)

Es el dominio más conservado de los RN y les confiere la habilidad de reconocer secuencias específicas en el ADN. Está formado por una secuencia de 66 a 68 aminoácidos que contiene nueve cisteínas que se encuentran conservadas. El DBD posee dos subdominios y cada uno contiene cuatro residuos de cisteína que coordinan con un átomo de zinc, formando la estructura que se denomina "dedos de zinc" (Fig. 2). Varios estudios han permitido identificar dos secuencias en el DBD que juegan un papel muy importante en el reconocimiento del ADN y que se denominan cajas P (Proximal) y D (Distal). La caja P se encuentra formada por 5 aminoácidos y está implicada en la formación de contactos directos proteína/ADN. En función de la secuencia de estos cinco aminoácidos, los RN se dividen en dos grupos: los de tipo I, al que pertenecen los receptores de esteroides (menos el de estrógenos) cuya secuencia es GSCKV y que reconocen la secuencia AGACA y los de tipo II, al que pertenece todo el resto, cuya secuencia es EGCKG/A y que reconocen la secuencia AGGTCA. La caja D contiene también cinco aminoácidos poco conservados, pero esenciales para la dimerización del receptor (11).

- Región C-terminal

Comprende un dominio de unión a ligando (LBD o dominio E) y una región bisagra intermedia (dominio D) que actúa como articulación entre el DBD y el LBD, permitiendo la rotación del primero. En muchos casos el dominio D posee señales de localización nuclear y contiene residuos cuya mutación impide la interacción con co-represores. El LBD está formado por aproximadamente 210 aminoácidos y lleva a cabo múltiples funciones: unión del ligando, dimerización y transactivación. En el reconocimiento del ligando participa la mayor parte del LBD el cual es necesario para el plegamiento y la formación del sitio de unión. Dos regiones son críticas para la dimerización: el subdominio Ti (inhibidor de la transcripción), situado en una región central, cuya mutación impide la formación de homo y heterodímeros; y una región de unos 100 aminoácidos que se encuentra en su mitad C-

terminal en la que se localizan nueve repeticiones de un heptapéptido de aminoácidos hidrofóbicos (que presenta cierta similitud con la cremallera o cierre de leucinas) y el motivo hélice-vuelta-hélice de otros factores de transcripción capaces de dimerizar. Por último, el LBD contiene también una zona capaz de activar la transcripción dependiente de ligando (AF-2), que interacciona con otros factores (co-activadores) necesarios para la transcripción (12).

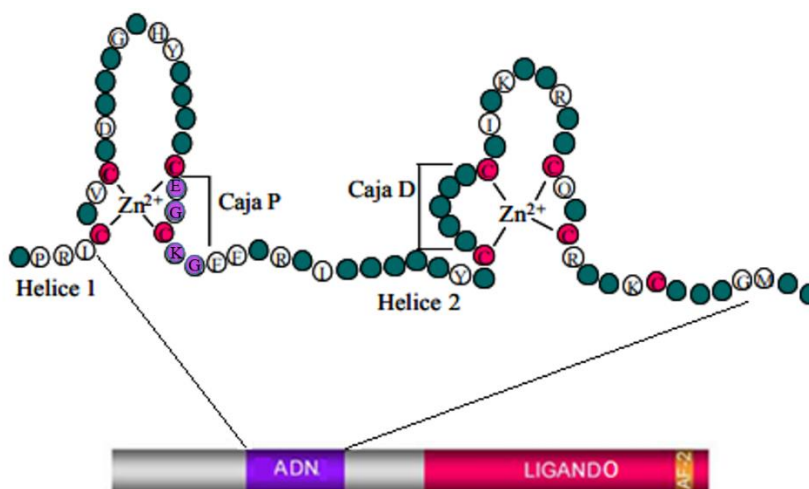


Figura 2. Esquema los dedos de zinc de un receptor nuclear. Dominio de unión al ADN compuesto de dos dedos de Zn con 4 cisteínas. Nueve cisteínas conservadas se resaltan en rojo. Se muestra en violeta, una caja P típica (CEGCKG) que confiere especificidad de unión al ADN. El dominio de unión al ligando (rojo) contiene múltiples superficies que reclutan co-activadores o co-represores. Los residuos de la caja D forman una interfase esencial para la homo o heterodimerización del receptor. La hélice de transactivación AF-2 cierra el bolsillo de unión del ligando durante la activación hormonal. (10)

La clave para la señalización de los RN reside en su estructura conservada (2). El proceso se inicia con la unión del ligando al LBD que también une co-activadores y co-represores y otras proteínas adaptadoras que permiten el acoplamiento con enzimas modificadoras de histonas, entre las cuales podríamos mencionar a las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas metiltransferasas (HMT). Estudios estructurales y bioquímicos revelan que la unión del ligando al LBD desencadena un cambio de conformación en el que una hélice presente en el del C terminal, llamada AF-2 se acerca al núcleo del LBD (11-13). En consecuencia, los co-represores unidos son desplazados por los co-activadores, lo que lleva a la expresión de los genes. Además, la actividad de los RN a menudo está regulada por fosforilación, acetilación y otras modificaciones covalentes (12).

1.3 Transactivación y transrepresión

Los RN modulan la transcripción a través de distintos mecanismos que finalmente resultan en la activación o en la represión de programas genéticos específicos. Como mencionan Novac y colaboradores, la activación transcripcional se logra mediante la unión del ligando al RN estabilizando un estado activo (13). En este estado, los RN reclutan proteínas co-activadoras, que generalmente funcionan como andamios que permiten la formación de complejos grandes de proteínas que albergan enzimas modificadoras de histonas (14). Estas acciones facilitan la apertura de la cromatina, haciéndola accesible a proteínas reguladoras adicionales. Finalmente, la maquinaria transcripcional general y la ARN polimerasa II son reclutadas para llevar a cabo la transcripción (Fig. 3 A)

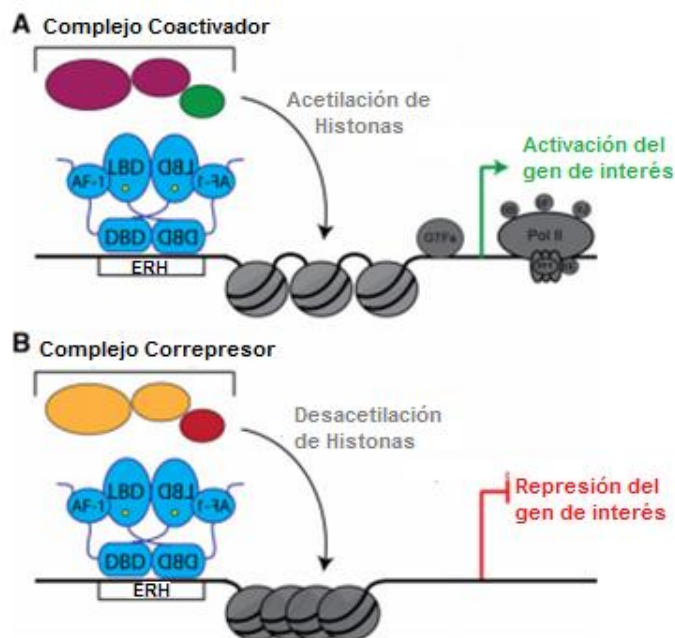


Figura 3. Los NR pueden activar o reprimir la transcripción. (A) para activar la expresión génica, los RN (azules) interactúan con su elemento de respuesta al ADN (ERH), los RN unidos al ADN reclutan las proteínas co-activadoras (magenta), que a su vez reclutan enzimas modificadoras de histonas. En definitiva, la maquinaria transcripcional general y ARN polimerasa Pol II (gris) se reclutan para impulsar la expresión génica. (B) para reprimir la transcripción, los RN reclutan proteínas co-represoras (naranja). Estas proteínas reclutan otras deacetilasas de histonas (rojas) que revierten la acetilación de histonas y restringen la accesibilidad a la cromatina. Esta condensación impide que la maquinaria transcripcional acceda al ADN, reprimiendo así la expresión génica. Adaptado de Weikum 2018 (15).

Por el contrario, los RN pueden reprimir la transcripción por dos mecanismos diferentes. Primero, los RN pueden unirse a co-represores en su estado original como ocurre en los receptores Tipo II y IV. Estas proteínas co-represoras reclutan enzimas

modificadoras de histonas como las histona deacetilasas (HDAC), que actúan en oposición a las HAT para restringir la cromatina y bloquear el acceso al ADN de la maquinaria transcripcional (Fig. 3B). Segundo, los RN pueden interactuar con "elementos negativos de respuesta" presentes en el ADN. La unión a estos elementos produce que los RN adopten conformaciones diferentes y favorece el reclutamiento de co-represores para bloquear la transcripción.

1.4 Interacciones Receptores Nucleares-ligando

Como se mencionó anteriormente, los RN se unen a una variedad de pequeños ligandos lipofílicos como esteroides, la hormona tiroidea, compuestos retinoides y lípidos que se difunden o son transportados a través de la membrana celular. De los 48 RN humanos, 24 tienen ligandos conocidos y los 24 restantes se clasifican como "huérfanos" o "huérfanos adoptados" (lo que significa que se ha identificado un probable ligando). En ausencia de ligando, los RN tienden a ser inestables mientras que la unión al mismo aumenta enormemente la estabilidad del LBD facilitando la unión de los co-reguladores. Los ligandos se unen al receptor dentro de un bolsillo en la base del LBD. El 75% de los aminoácidos en este bolsillo son hidrofóbicos, pero también contiene residuos polares críticos que participan de interacciones claves en las uniones de puente de hidrógeno con el ligando (1). Estos puentes de hidrógeno participan en el posicionamiento del ligando en la orientación correcta. El volumen del bolsillo generalmente corresponde al tamaño del ligando, lo que explica que una parte importante de la selección del mismo se centra en la influencia del volumen de un grupo funcional de la molécula denominado efecto estérico.

1.5 Interacciones Receptores Nucleares-ADN

Los DBD presentes en los RN se unen a una variedad de elementos de respuesta (ER) en el ADN cuyas secuencias de nucleótidos puede tomar la forma de un palíndromo, repetición directa o sitios monoméricos extendidos. Los receptores nucleares esteroideos (RE) se unen repeticiones palindrómicas, así como también los receptores de glucocorticoides (GR) (Fig. 4A). Los receptores que se unen a repeticiones directas incluyen los heterodímeros de los receptores de ácido retinoico y retinoides (del inglés, RAR-RXR), factor nuclear de células germinales (del inglés, GCNF) y receptores de vitamina D (del inglés, VDR) (Fig. 4B). Finalmente, el receptor hepático Homologo-1 (del inglés, LRH-1) y el factor esteroideogénico 1 (del inglés, SF-1) son ejemplos de receptores que se unen a secuencias monoméricas extendidas (Fig. 4C) (3).

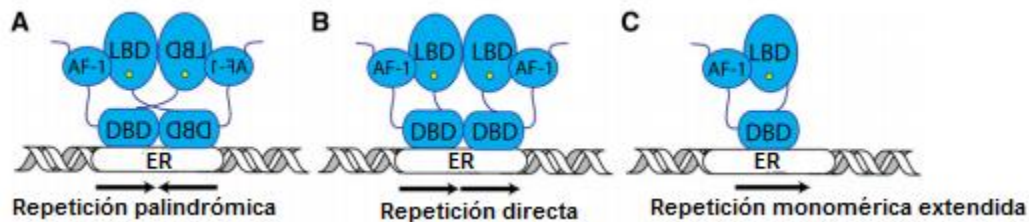


Figura 4: Elementos de respuesta genómica. Los RN se unen a los elementos de respuesta genómica (ER) que vienen en una variedad de formas (A) Los miembros de la subfamilia RE son homodímeros que se unen a repeticiones palindrómicas, (B) Los RN heterodímeros se unen a repeticiones directas, RXR-RAR, GCNF y VDR. (C) Los monómeros LRH-1 y FE-1 se unen al ADN a secuencias monoméricas extendidas. Adaptado de Weikum (15).

1.6 Interacciones Receptores Nucleares-proteínas co-reguladoras

Después de la unión al ADN, los RN reclutan una variedad de proteínas conocidas como co-reguladoras, de las cuales se han identificado aproximadamente 200. Este grupo de proteínas se divide en dos categorías principales: co-activadores y co-represores. Estos interactúan directamente con los RN en las regiones AF-1 y AF-2. Hasta el momento, no se ha podido obtener información estructural sobre estas interacciones. Sin embargo, casi todas las estructuras de LBD de los RN se co-cristalizan con fragmentos de dominios de proteínas co-reguladoras. Las proteínas co-activadoras interactúan con los RN a través de un alfa-hélice que contiene un motivo corto LXXLL (L- leucina, X- cualquier aminoácido) y que interactúan con la región AF-2 del RN (4).

1.7 Clasificación de los RN según el mecanismo de acción

Los RN se han clasificado en función de las características de unión al ADN y preferencias de dimerización en cuatro tipos (13).

Receptores nucleares tipo I: receptores de este grupo son RE y se activan por las hormonas esteroideas derivadas del colesterol, como los estrógenos, los andrógenos, los progestágenos y los corticoides. Estos receptores se localizan en el citoplasma unidos a proteínas chaperonas que luego de la activación del mismo por unión al ligando se intercambian por otras y se traslocan al núcleo, donde generalmente se unen como homodímeros a los ER de ADN los cuales consisten en dos repeticiones invertidas (Fig. 5A)

Receptores nucleares de tipo II: receptores de este tipo, como RAR y LXR (del inglés Liver X receptor), a menudo se retienen en el núcleo, independientemente de la presencia del ligando. Al unirse el ligando, el receptor es liberado de un complejo co-represor y se une a los co-activadores y la maquinaria transcripcional. Estos receptores comúnmente forman heterodímeros con RXR y se unen al ER en repeticiones directas de ADN (Fig. 5B).

Receptores nucleares tipo III: este tipo de RN, como el VDR, posee un mecanismo de acción similar a los RN de tipo II pero a diferencia de los mismo forman homodímeros, que se unen a secuencias de repetición directa en sus ER (Fig. 5C).

Receptores nucleares tipo IV: este tipo de RN tiene un mecanismo de acción similar a los RN de tipo III pero se unen al ADN como un monómero al ER y reconocen repeticiones monoméricas extendidas dentro de las ER. Un ejemplos de tipo IV es el SF-1. (Fig. 5D).

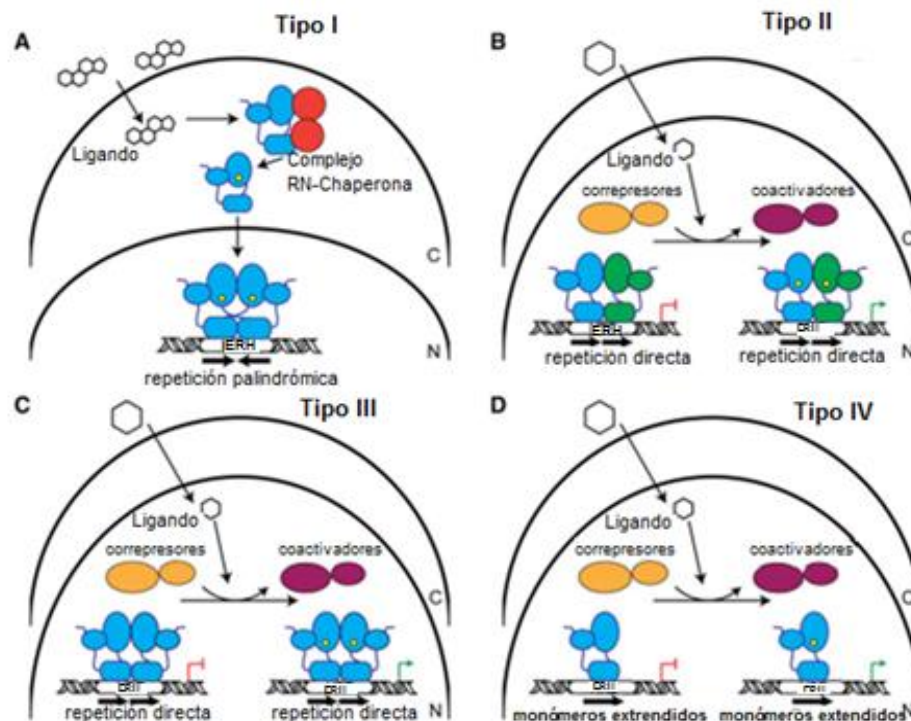


Figura 5. Esquema de mecanismo de señalización de los RN. (A) **Tipo I.** Los receptores residen en el citoplasma formando un complejo con proteínas chaperonas. Luego de la unión del ligando (hexágono), el receptor se libera de este complejo y se trasloca al núcleo donde por lo general, se unen como homodímero a los elementos de respuesta (ERH) palindrómicos. (B) **Tipo II.** Los receptores se localizan en el núcleo. En su estado no ligado, interactúan con las proteínas co-represoras, pero al unirse al ligando se intercambian por coactivadores. Los RN que pertenecen a este grupo generalmente forman complejos heterodiméricos con el RXR. (C) En forma similar a los RN de tipo II, los receptores **Tipo III** residen en el núcleo e intercambian co-represoras y co-activadores, pero a diferencia del tipo II estos receptores se unen a ER como homodímeros, también a repeticiones directas. (D) Los receptores **Tipo IV** son casi idénticos al tipo III, excepto que se unen como monómeros a ER a sitios monoméricos extendidos. Adaptado de Weikum, 2018 (15).

1.8 Modelo biológico: *Caenorhabditis elegans*

El nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* presenta condiciones morfológicas y funcionales favorables para la investigación. Su ciclo de vida es corto y su genoma es compacto; su cuerpo es transparente a lo largo de toda su vida; al ser hermafrodita, es posible la obtención y mantenimiento de individuos con mutaciones

recesivas; tiene un gran número de descendencia y los fenotipos son fácilmente observables. Es un organismo diploide de fácil mantenimiento en el laboratorio en cajas de Petri. Posee una cabeza con un orificio bucal que le permite ingerir las bacterias *Escherichia* (*E.coli*) con las que se alimenta en cultivo. Su único requerimiento de crecimiento y reproducción es un medio húmedo y un ambiente templado (18 -20 °C) con oxígeno en la atmósfera.

La importancia de este nematodo reside en que comparte estructuras celulares y moleculares con organismos superiores. Aproximadamente el 50% de los genes presentes en humanos posee un homólogo en *C. elegans* y codifican proteínas que presentan un alto grado de identidad y se ha convertido en un importante modelo de estudio para la biología.

Este nematodo ha sido introducido como modelo para el estudio de diversos procesos como la apoptosis, mecanismos de señalización celular y regulación génica, el ciclo celular, el metabolismo y el envejecimiento (16). Los numerosos estudios realizados han revelado una gran conservación en los mecanismos moleculares de regulación, entre este nematodo y los mamíferos, por lo que los avances obtenidos en este nematodo modelo podrían ser en cierta medida extendidos a los procesos en humanos.

1.9 Ciclo de vida de *C. elegans*

El ciclo de vida de *C. elegans* comprende la etapa embrionaria, cuatro etapas larvales (L1-L4) y la edad adulta. Este ciclo se lleva a cabo en aproximadamente 3 días en condiciones favorables. (Fig. 6).

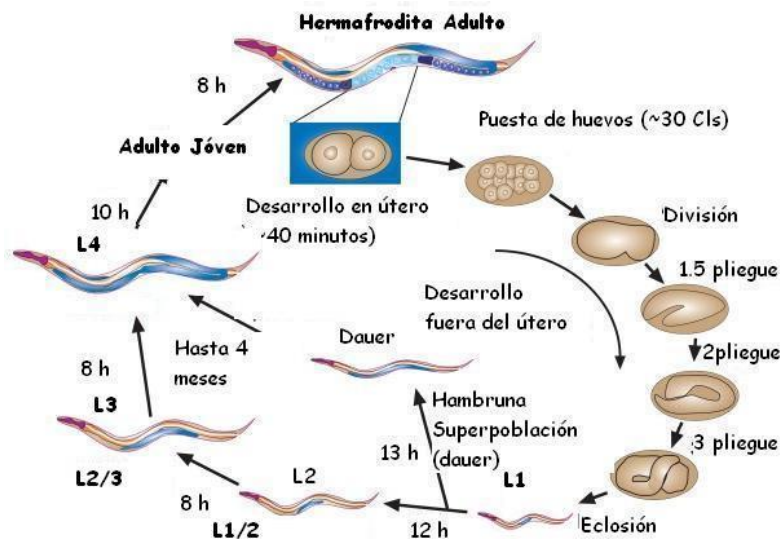


Figura 6. Ciclo de vida de *C. elegans*. (Adaptado de ©Wormatlas)

Embrión/Huevo

La embriogénesis en *C. elegans* se divide en dos etapas: 1) proliferación y 2) organogénesis/morfogénesis. La proliferación incluye divisiones celulares de una sola célula a aproximadamente 550 células esencialmente indiferenciadas. Esta etapa se subdivide en dos fases: la primera fase abarca el tiempo entre la formación del cigoto y la generación de células fundadoras embrionarias, y la segunda fase cubre la mayor parte de las divisiones celulares y la gastrulación hasta el comienzo de la organogénesis (18). Las primeras 2 h de desarrollo en la cual comienza las divisiones celulares tienen lugar dentro del útero de la madre, y el embrión sale de la hembra (ovoposición) cuando alcanza el estado aproximado de 30 células (en la gastrulación) (Fig. 7). Al final de la etapa de divisiones celulares, el embrión es un esferoide de células (estadio denominado “coma”) organizadas en tres capas germinales: el ectodermo, que produce hipodermis y neuronas; mesodermo, que genera faringe y músculo; y endodermo, que da origen a la línea germinal y al intestino. Durante la etapa de organogénesis / morfogénesis la diferenciación terminal de las células ocurre sin muchas divisiones celulares adicionales, y el embrión se alarga tres veces respecto al tamaño inicial y toma forma como un animal con tejidos y órganos totalmente diferenciados. La morfogénesis comienza con la etapa de “coma”. En la última etapa de las tres etapas, el gusano puede moverse dentro del huevo de manera coordinada (rodando alrededor de su eje longitudinal formando pliegues), lo que indica un desarrollo avanzado del sistema motor. El embrión comienza el bombeo faríngeo las 12 h después de la primera división celular y eclosiona una hora después y al finalizar la etapa embrionaria, nace una larva 1 (L1) (19-22).

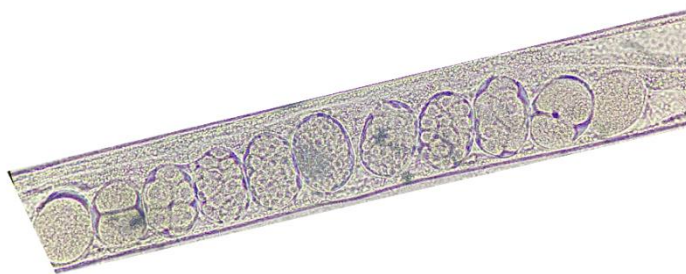


Figura 7. Gastrulación del embrión de *C. elegans*. Foto tomada del interior de una hermafrodita con el microscopio Motic BA-210 aumento 10X.

Al inicio del estadio L2, existe un punto de control del ciclo de vida en el cual *C. elegans* sensa las condiciones ambientales. Si las mismas son favorables, baja densidad de población, temperatura adecuada y abundante comida, *C. elegans* progresa al estadio

L3, posteriormente a L4 hasta llegar a un estadio de joven adulto y finalmente desarrollándose a una hembra hermafrodita. La ausencia de alimento, las temperaturas elevadas y la presencia de feromonas pueden desencadenar la formación de una larva L2 en etapa morfológicamente distinta, denominada L2d (un estado detenido llamado *predauer*). La larva L2d conserva el potencial de formar una larva *dauer* o una larva L3, dependiendo de la persistencia de los parámetros ambientales inductores de un estadio de diapausa denominado *dauer* (23). Si el ambiente continúa siendo desventajoso, la larva en etapa L2d evoluciona a un estadio denominado larva *dauer* (ver sección 1.10).

Como se mencionó anteriormente, si las condiciones ambientales son favorables, luego de atravesar el punto de control, *C. elegans* se desarrolla siguiendo un ciclo de vida reproductivo, finalizando el estadio L2 y avanzando al estadio L3 donde se forman las vainas gonadales anterior y posterior, la espermateca y el útero pudiéndose observar una especie de media luna refringente que lo hace característico de este estadio (17). En el estadio L4 se generan las células terminales vulvales, los brazos gonadales distales continúan su migración de forma centrípeta a lo largo de los músculos de la pared del cuerpo dorsal, y luego de la muda L4 / adulta, completan su trayectoria cerca de la línea media (17) se completa el sistema reproductivo desarrollándose un adulto joven.

Aproximadamente 45-50 horas después de la eclosión, un hermafrodita madurado deposita sus primeros huevos, completando así su ciclo de vida reproductivo de 3 días (18). El hermafrodita adulto produce ovocitos durante aproximadamente 4 días y después de un período fértil de 3 a 4 días, el adulto vive 10 a 15 días adicionales. Un hermafrodita puede producir alrededor de 300 huevos y estos vuelven a empezar el ciclo de vida reproductivo.

1.10 Larvas *dauer*

Como se explicó en la sección anterior, en respuesta a condiciones ambientales desfavorables, las larvas de *C. elegans* se diferencian a un estadio quiescente denominado de diapausa *dauer* (Fig. 8). Las larvas *dauer* poseen un comportamiento especializado para sobrevivir en condiciones extremas. Las mismas no se alimentan, ocluyen la cavidad bucal formándose un tapón constituido por una sustancia resistente, poseen una cutícula protectora gruesa que cubre todo el cuerpo para evitar la pérdida de agua y proteger al animal de daños ambientales, como toxinas y detergentes (21). Durante el remodelamiento de la larva *dauer*, los procesos de autofagia encogen las células al catabolizar los componentes celulares que no son necesarios durante la diapausa encerrando las estructuras celulares restantes dentro de un volumen más pequeño lo que genera la formación de la constricción radial, cuya presencia sirve para caracterizar morfológicamente

este estadio. (22,23). El cuerpo más delgado y rígido que adquiere como consecuencia de esta remodelación, presumiblemente, ayuda en el desempeño de comportamientos especializados de *dauer*, tales como movimientos de salto y de nictación, que consisten en un movimiento de convulsión o contracción muscular. Las larvas *dauer* poseen un metabolismo particularmente lento, esto les confiere resistencia al estrés y al envejecimiento, pudiendo sobrevivir en estas condiciones más de tres meses.

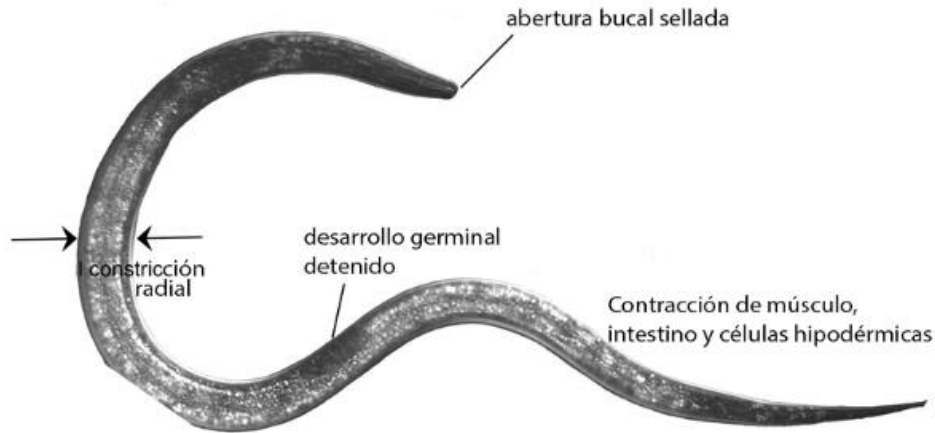


Figura 8. Adaptaciones de las larvas *dauer* que favorecen la supervivencia y la dispersión. Las larvas *dauer* exhiben una cutícula engrosada que cubre y sella la cavidad bucal, lo que impide la alimentación. Presentan constricción radial con tejidos encogidos y muestran comportamientos especializados que incluyen la nictación y los patrones locomotores característicos. El desarrollo de la línea germinal se encuentra detenido no observándose formación de las gónadas. Estas adaptaciones son importantes para la supervivencia y la dispersión de las larvas *dauer*.

1.11 Elección del ciclo de vida y transducción de las señales ambientales

Los primeros estudios realizados en los años 80 definieron un circuito genético que transmitía señales desde el medioambiente y que dirigían la elección entre el desarrollo reproductivo normal y la entrada del estadio de diapausa o de larva *dauer* (descrito en el punto anterior). Estos estudios se basaron en el análisis de mutantes defectuosos en su capacidad para formar larvas *dauer* (fenotipo Daf-d) o en mutantes que forman larvas *dauer* en forma constitutiva aún en condiciones favorables (fenotipo Daf-c).

Posteriormente el estudio detallado de dichas mutantes permitió desarrollar un modelo en el cual las señales del medio ambiente detectadas por las neuronas sensoriales en la cabeza y las señales fisiológicas, son transducidas a través de diversas vías de señalización que influyen a su vez sobre dos grandes vías endócrinas, la vía del TGF- β y la vía de la insulina/IGF (IIS), que regulan la actividad del RN DAF-12 (3). Estas dos vías

de señalización convergen dentro de tejidos esteroideogénicos para promover la síntesis de los ligandos de dicho receptor, denominados ácidos dafacrónicos (AD).

En ambientes favorables, se promueve síntesis de AD a partir de colesterol y en la cual participa la enzima DAF-9 que lleva a cabo la oxidación de la cadena lateral del mismo. El receptor DAF-12 ligado a los AD, se une al elemento de respuesta a hormona (ERH) y se ensamblan complejos co-activadores. La formación de estos complejos junto con la maquinaria transcripcional dirige la expresión de los genes involucrados en el desarrollo reproductivo, el avance del desarrollo, el metabolismo de las grasas y el envejecimiento (características del ciclo de vida normal). En ambientes desfavorables, se inhibe la síntesis de AD y DAF-12 no ligado junto con el co-represor DIN-1 se une a los (ERH) inhibiendo la expresión de los genes que promueven el ciclo de vida reproductivo y activando los programas que conducen a la formación de larvas *dauer* (Fig. 8).

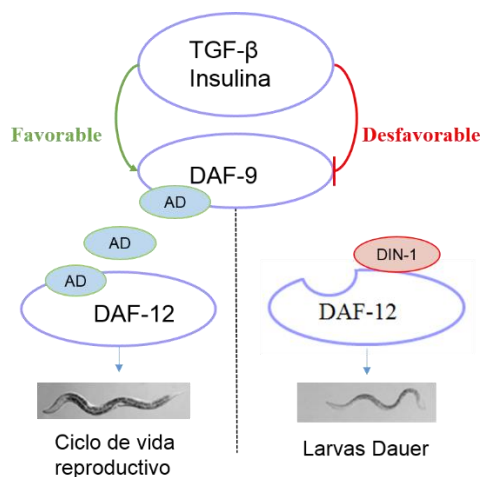


Figura 8. Regulación del ciclo de vida por DAF-12. En condiciones favorables el colesterol se une a la enzima DAF-9 y se sintetizan AD, los mismos se unen al receptor DAF-12 reclutando los co-activadores (CoAct) y permitiendo la expresión de los genes involucrados en el ciclo de vida reproductivo. En condiciones desfavorables, el DAF-12 se une al co-represor (CoR) DIN-1 induciendo la expresión de los genes necesarios para la formación de la larva *dauer* y reprimiéndose la de los genes involucrados en el ciclo de vida reproductivo. (HRE, por sus siglas en inglés, elemento de respuesta a hormonas) Adaptado de Antebi 2006 (19).

1.12 Ácidos dafacrónicos

En 2006, Motola y colaboradores identificaron dos compuestos similares a los ácidos biliares (a los cuales denominó ácidos dafacrónicos), como los ligandos endógenos de DAF-12 en *C. elegans* (10) (Fig. 9). Los dos compuestos identificados poseen un doble enlace en la posición 4 o 7 del esqueleto de esteroides respectivamente ($\Delta 4$ y $\Delta 7$ AD), los cuales

fueron capaces de activar a DAF-12 *in vitro* y de promover el desarrollo y la reproducción en cepas mutantes de gusanos incapaces de sintetizar endógenamente AD (10).

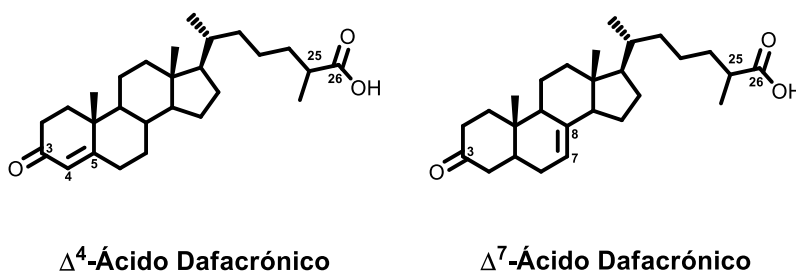


Figura 9. Estructura de los ácidos dafacrónicos

El gen *daf-9* codifica una 3-ceto-esterol-26-monooxigenasa (un citocromo P450) que oxida la cadena lateral del colesterol a un resto carboxílico, denominada DAF-9.

1.13 Vía biosintética de los Ácidos Dafacrónicos

Tanto la elección del ciclo de vida que llevará a cabo (según las condiciones ambientales) como la expectativa de vida de *C. elegans* se regulan según los niveles de AD. La incorporación de colesterol es necesaria, ya que carecen de la capacidad de sintetizarlo endógenamente. El primer paso en la ruta biosintética del Δ^7 -AD es la introducción del doble enlace Δ^7 por la oxigenasa DAF-36, convirtiendo el colesterol a 7-dehidrocolesterol (Fig. 10), luego, una Δ^5 reductasa desconocida, convierte el 7-dehidrocolesterol a lanosterol. En un paso siguiente la DHS-16, una 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, convierte el lanosterol a esteroide 3-ceto lanosterona. El último paso de la síntesis lleva a cabo la DAF-9, que oxida la cadena lateral del colesterol a un resto de ácido carboxílico, con una química similar a la que lleva a cabo la CYP27A1 de mamíferos, que también está implicada en las vías de biosíntesis de ácidos biliares (27,28).

Se propuso que HSD-1 estaría involucrada en la producción del Δ^4 -AD catalizando la oxidación de colesterol a 4-colesten-3-ona. Sin embargo, no se ha logrado comprobar este punto, posiblemente debido a que solo existen pequeñas cantidades de este ligando o que HSD-1 afecta otros aspectos de la biosíntesis. Por otro lado, evidencia reciente sugiere que puede haber otros AD, siendo las rutas biosintéticas más complejas de lo que se pensaba (27). Un trabajo anterior sugirió que HSD-1, un supuesto homólogo de 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD), puede introducir el grupo 3-ceto, aunque el papel preciso de esta enzima en la biosíntesis de AD no se ha determinado (21,22).

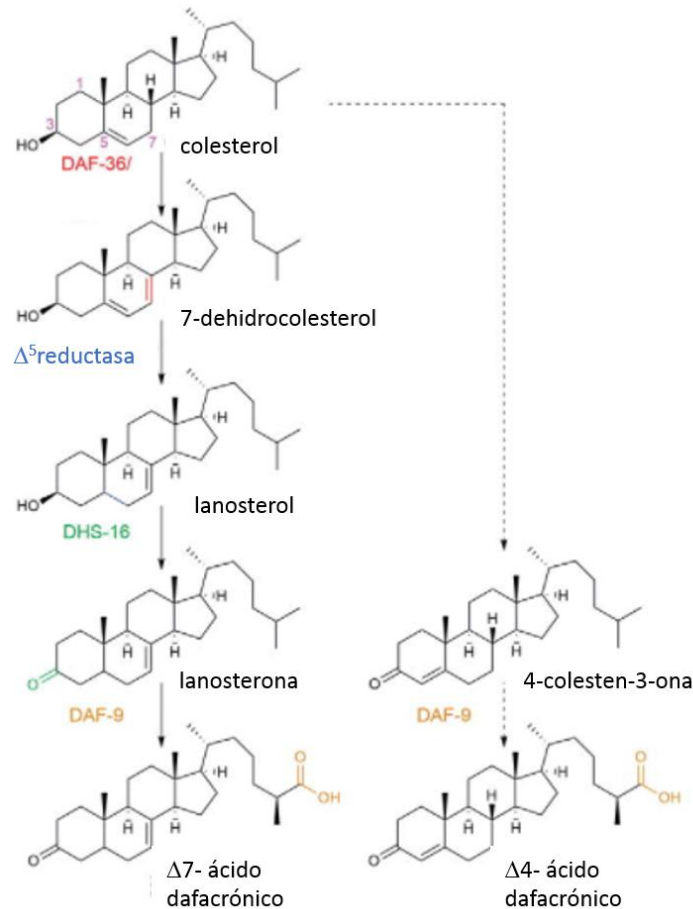


Figura 10. Biosíntesis de los ácidos dafacrónicos en *C. elegans*. Adaptado de Butcher (23) La figura muestra los pasos biosintéticos conocidos del ácido Δ^4 y Δ^7 -dafacrónico.

1.14 Sistema endócrino en el que participan los AD y DAF-12

El gen *daf-12* (que codifica el RN DAF-12) forma parte de un grupo de más de 30 genes que participan en la regulación de la entrada y salida de la diapausa o estadio *dauer*, denominados genes *daf* (**d**auer**f**ormation). DAF-12 actúa como un interruptor de activación/represión transcripcional y junto con los AD constituye un sistema endócrino que regula el pasaje a través de los distintos estadios larvales. DAF-12 regula el desarrollo larvario de *C. elegans* mediante la activación transcripcional de programas genéticos que regulan dos procesos básicos.

El primer proceso determina el destino celular durante el desarrollo larvario. Por ejemplo, el desarrollo de las llamadas *seam cells* o células de unión regulado por mir-84 y mir-241, dos microRNAs de la familia let-7. Específicamente, durante el desarrollo reproductivo, DAF-12 unido a los AD induce la expresión de los microRNAs mir-84 y mir-241, los cuales inhiben la expresión de un factor de transcripción, *hbl-1*, dirigiendo así las

células a un destino específico de L3 (28). Durante la formación de larvas *dauer*, el DAF-12 no unido a sus ligandos retiene las *seam cells* en un destino específico de L2, lo que retrasa el cambio al destino celular específico de L3 hasta que el desarrollo reproductivo se reanuda. En ambientes desfavorables, se inhibe la regulación de insulina /IGF-I (IIS) y el factor de crecimiento TGF- β , se suprime la producción de AD y DAF-12 sin el ligando junto con el co-represor DIN-1 reprime la expresión de microARNs en la mayoría de los tejidos y determina la detención del desarrollo. A la inversa, en entornos favorables, la estimulación de las vías de señalización IIS y TGF- β da lugar a la producción de AD. El DAF-12 ligado activa entonces a *let-7* e inhibe la expresión del factor *hbl-1* permitiendo la transición de L2 a L3 en la hipodermis (Fig. 11). La regulación que ejerce la unión de DAF-12 a los microRNAs es altamente específica de tejido y de etapa de desarrollo, implicando la participación de otros factores de transcripción, co-reguladores y factores de cromatina en el control de la expresión de microRNAs (29).

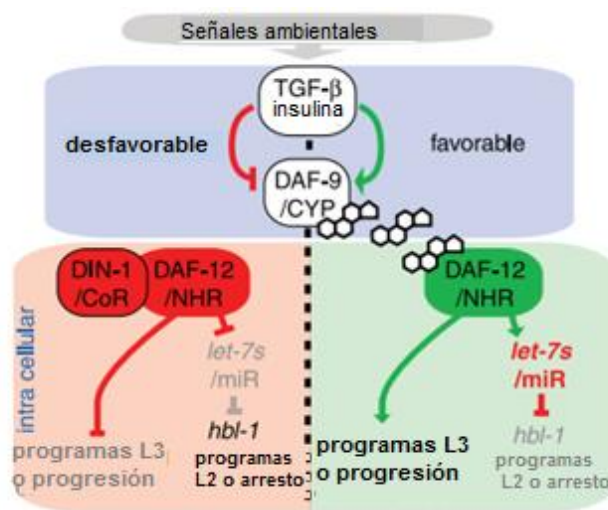


Figura 11. Modelo de cascada de señalización de RN-microRNA. En condiciones favorables DAF-12 unido al ligando activa los programas L3 y la expresión de *let-7s*, por lo tanto inhiben los factores de transcripción *hbl-1* y programas L2 de arresto, dando lugar a la progresión del desarrollo. En condiciones desfavorables, el DAF-12 sin el ligando, forma un complejo con DIN-1, reprime los programas que conducen a la transición a estadio L3 y la vía de *let-7s*, lo que permite la activación de factores *hbl-1* y programas L2 arrojando el desarrollo.

El segundo proceso regulado por DAF-12 es un cambio coordinado en el metabolismo aeróbico para cumplir las distintas necesidades energéticas durante el desarrollo larvario (30). En *C. elegans*, el DAF-12 ligado induce la expresión de una red de genes que promueve el metabolismo aeróbico de las grasas, permitiendo una producción de energía suficiente para sostener un rápido crecimiento reproductivo. Sin embargo, el DAF-12 no ligado, limita el consumo de grasa ya que este se realiza mediante un

metabolismo anaeróbico. Esto evita que las larvas *dauer* agoten prematuramente las reservas de energía y permite la supervivencia en condiciones desfavorables.

El grupo de investigación del Dr. Adam Antebi llevó a cabo un estudio sobre longevidad y la expectativa de vida de *C. elegans*. Los resultados obtenidos indicaron que gusanos mutantes *daf-9* vivían significativamente más tiempo que los salvajes. Además, pudieron determinar que el aumento en la expectativa de vida podía suprimirse mediante la administración del ácido Δ^4 dafacrónico (32). El grupo de la Dra. Cinthia Kenyon realizó estudios con gusanos a los que les anularon las células madre de la línea germinal, obteniendo un aumento de 50-60% de longevidad (33). En años posteriores, con la ayuda de estudios de marcación fluorescente pudieron concluir que la ausencia de la línea germinal causa una translocación de DAF-16 que inhibe la síntesis AD (34). Los resultados obtenidos sugieren que la expectativa de vida de los gusanos se encuentra regulada mediante una retroalimentación constante de los caminos de señalización que dan lugar al estadio *dauer* y señales provenientes de la línea germinal (35).

1.15 Ligandos sintéticos de DAF-12

El DAF-12 era considerado un receptor huérfano, ya que se desconocían sus ligandos. Hasta que, en el año 2006, como se mencionó anteriormente, Motola y colaboradores identificaron los AD (16). Ese mismo año Held y colaboradores sintetizaron al ácido (25S)-colestenoico (compuesto 3a, Fig. 12) y a pesar de que no pudieron identificarlo como ligando endógeno, observaron que poseía una actividad agonista con el DAF-12 (aunque significativamente menor a los AD identificados por Motola) en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Al mismo tiempo compararon estos resultados con los obtenidos con el ácido (25R)-colestenoico (compuesto 3b, Fig. 12), el cual no mostró actividad (36).

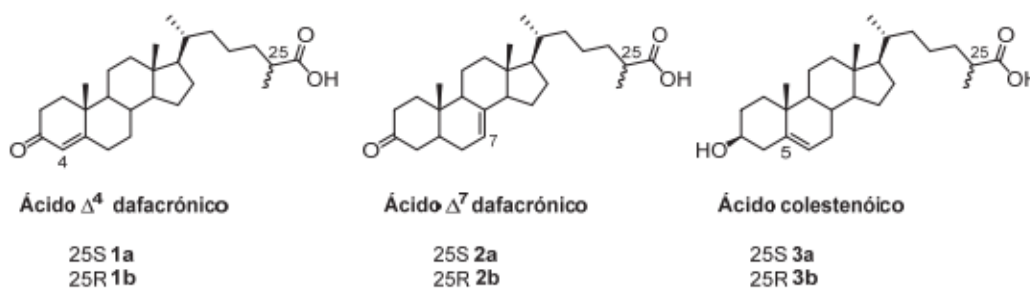


Figura 12. Estructuras de los ácidos dafacrónicos y los ácidos colestenoicos, evaluados como ligandos del receptor DAF-12.

Estos dos trabajos dieron el puntapié inicial en la búsqueda de ligandos endógenos y del estudio de su biosíntesis a partir de colesterol. Como se mostró en la Fig. 10, los AD $\Delta 7$ y $\Delta 4$ se obtienen de forma divergente y a pesar de que no se han encontrado todas las enzimas intervinientes, se identificaron muchas de ellas mediante estudios genéticos. El grupo del Dr. Antebi realizó estudios de metabolómica mediante RMN 2D sobre extractos de *C. elegans* con el objetivo de identificar y cuantificar los ligandos endógenos del DAF-12 y evaluaron la actividad *in vivo* de los mismos, ensayando su capacidad para rescatar a gusanos mutantes *daf-9(dh6)*. Los ligandos más potentes resultaron ser el ácido $\Delta 1,7$ -dafacrónico, y el ácido $\Delta 7$ –dafacrónico, seguido del ácido $\Delta 4$ –dafacrónico (37,38).

Por otro lado, a partir del hallazgo de los ligandos, surgió la iniciativa de llevar a cabo la semisíntesis tanto de los AD naturales como de análogos sintéticos, con el fin de estudiar el mecanismo de unión al DAF-12. La primer síntesis del ácido $\Delta 7$ (25S) dafacrónico (**2a**) (39) y su epímero 25R (**2b**) (Fig.12) fue realizada por Giroux y Corey (40). En 2009, de manera casi simultánea, el grupo de Auchus (41) y el grupo de Knölker (42) llevaron a cabo la síntesis de una serie de análogos de los AD y realizaron mediciones de su actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo*.

Con el transcurso de los años se han utilizado distintas estrategias sintéticas para la obtención de los AD. Martin y colaboradores realizaron un trabajo muy completo de revisión en el que además comparan los resultados de los ensayos de rescate de gusanos en estadio de diapausa *dauer* utilizando entre estereoisómeros (43). Nuevamente observan que la configuración de la cadena lateral del ligando es relevante para la unión en el LBD, siendo los compuestos con configuración 25S más potentes que los 25R. El análisis conjunto de estos resultados indica que la presencia de una funcionalidad 3-ceto, la fusión trans en los anillos A y B del esteroide y la configuración 25S favorecen la unión del ligando al receptor DAF-12.

1.16 Importancia de los RN en la química medicinal

Los ligandos de RN presentan una serie de aspectos atractivos y ventajas de como posibles fármacos para el tratamiento de enfermedades complejas. En primer lugar, los ligandos endógenos tienden a ser pequeños, poco cargados, lipofílicos (como esteroides y ácidos grasos) y existe una probabilidad inherentemente mayor de descubrir compuestos que funcionen como drogas específicas para los RN que para otros blancos terapéuticos. En segundo lugar, los efectos pleiotrópicos de los RN y su capacidad para regular una multitud de genes diferentes que participan en procesos biológicamente importantes,

permiten participar potencialmente en el tratamiento de enfermedades poligénicas a través de una sola droga específica. En tercer lugar, pueden ser diseñadas drogas aún más eficaces y potencialmente podrían reemplazar la generación actual de drogas basadas en RN que causan efectos secundarios. Estos efectos perjudiciales se observan cuando se suministran fármacos que son ligandos endógenos (generalmente agonistas completos) y dichos efectos podrían ser atenuados por cambios en la estructura de los ligando sintéticos, permitiendo la unión de un subconjunto de los moduladores que se unen a los ligandos endógenos y de esta manera activar o reprimir específicamente un grupo menor genes (44).

1.17 Estrategias de síntesis químicas de ligandos putativos del DAF-12

Desde sus comienzos, la química de esteroides y terpenoides, ha dado un especial énfasis a las modificaciones y funcionalización del núcleo esteroide al de anillos y a su síntesis. La cadena lateral de los esteroides y esteroides puede ser lineal, ramificada o contener ciclos; su construcción o modificación representa un desafío sintético y estuvo limitada principalmente por la disponibilidad de métodos sintéticos y de funcionalización que permitieran controlar la estereoquímica en sistemas no cíclicos.

Durante el desarrollo de esta tesis se probaron dos diferentes vías de síntesis de esteroides putativos ligandos de DAF-12. Por un lado, el grupo del Dr. Burton se especializa en el desarrollo de diversos caminos de síntesis para la construcción parcial o total de cadenas laterales con variado grado de complejidad y funcionalización, ya sea partiendo de precursores que contengan la cadena lateral y solo requieran reacciones de funcionalización para llegar al producto deseado, o siguiendo un camino sintético en el que la formación de nuevos enlaces carbono-carbono se realiza secuencialmente. Los productos naturales de origen esteroide como la diosgenina, son precursores útiles, en cuanto presentan cadenas laterales, usualmente con configuraciones específicas en los centros quirales que pueden aprovecharse para obtener cadenas laterales modificadas. La diosgenina es un precursor ampliamente utilizado en la síntesis de más del 60% de esteroides comerciales como cortisona, pregnenolona y progesterona entre otros (45). A partir de esta se aprovecha la configuración en C-17 donde se origina la cadena lateral, y posteriormente se ha aprovechado la configuración de los centros quirales de la cadena lateral de la diosgenina en la síntesis de diversos derivados sintéticos (ver anexo 1).

Por otro lado, en el laboratorio del Dr. Ramírez se sintetizaron una serie de compuestos mediante la reacción de cuatro componentes de Ugi (U-4CR). Este es un

método muy conocido para generar α -aminoacilamidas de isocianuros, aldehídos, aminas y ácidos carboxílicos en una síntesis en un solo recipiente (46).

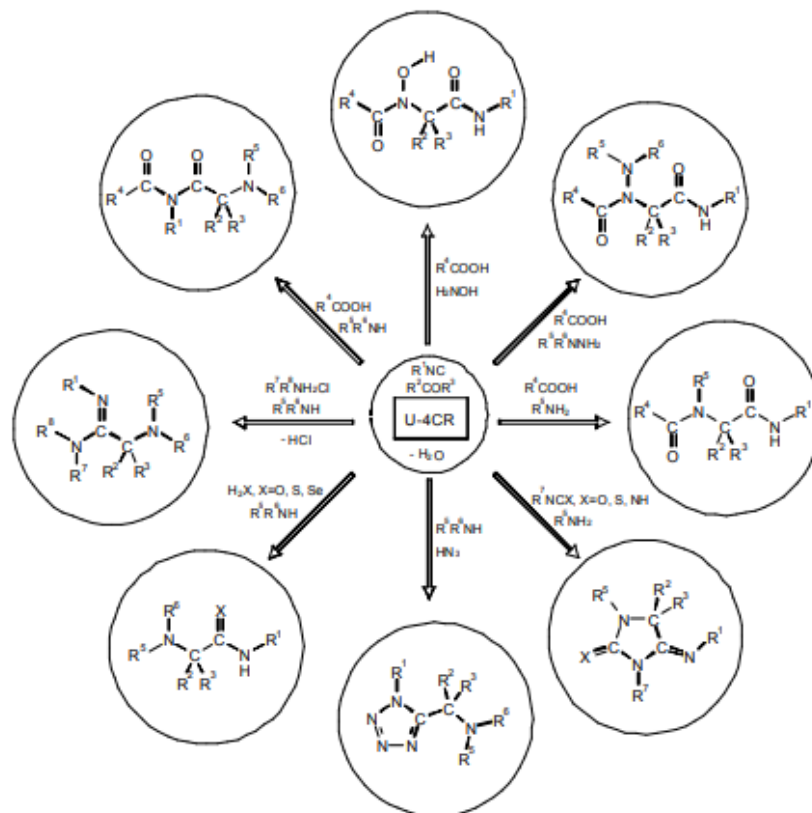


Figura 13. Variedad de productos obtenidos por U-4CR (48)

Debido a la gran diversidad de productos que se pueden obtener por esta reacción, la U-4CR es una herramienta importante que se utiliza para preparar bibliotecas de productos (Fig.13). La variedad de estructuras accesibles se expande continuamente a través del desarrollo de variaciones de la reacción multicomponente (47,48).

Generalmente las reacciones químicas tienen su "alcance y limitaciones" particulares, mientras que solo unas pocas combinaciones de precursores de U-4CR no reaccionan. Por lo general, los compuestos obtenidos por U-4CR avanzan particularmente bien, si las aminas y el carbonilo se condensan previamente antes de que se agreguen los otros componentes (48). La síntesis de los compuestos probados mediante esta técnica se muestra en la sección anexo 2.

1.18 DAF-12 en nematodos parásitos

En la mayoría de los nematodos parásitos animales existe un estadio que comparte características similares al estadio *dauer*, conocida como la “tercera etapa infecciosa” (33). Estos parásitos infectan a los humanos y otros animales cuando se encuentran en la etapa larvaria infecciosa L3 (iL3), que en las especies monoxenas (parásitos que cumplen su ciclo evolutivo en un único hospedador) a menudo se transmiten a través del contacto con el suelo contaminado (por ejemplo, anquilostomas) y en especies heteroxenas (especies que tienen un huésped intermedio) a menudo se transmiten por vectores de insectos que chupan sangre (por ejemplo, filarias).

Los homólogos de DAF-12 han sido aislados y caracterizados en varios parásitos transmitidos por el suelo, incluyendo anquilostomas (*Necator americanus*, *Ancylostoma caninum*) y *Strongyloides stercoralis*, un parásito incurable y con frecuencia fatal en personas mal alimentadas o con inmunodeficiencias (34). El análisis del genoma también ha revelado homólogos de DAF-12 en las principales especies de nematodos parasitarios filariales como *Brugia malayi* (elefantiasis), *Onchocerca volvulus* (ceguera del río) y *Loa loa* (gusano ocular). Al igual que sus contrapartes de vida libre, las larvas iL3 se encuentran detenidas en el desarrollo y necesitan entrar en un huésped definitivo para reanudar su crecimiento y seguir hasta la edad adulta reproductiva a través de la penetración de la piel. Esta llamada “tercera etapa infecciosa” es similar a la etapa de diapausa *dauer* de *C. elegans*. En el caso del parásito, la salida de iL3 se produce en condiciones favorables proporcionadas por el huésped y se ha demostrado que DAF-12 regula este proceso (Fig. 14) (30). En ausencia de ligando, DAF-12 permite la formación de larvas iL3, mientras que al entrar en el huésped (que presumiblemente estimula la síntesis de ligandos) la activación de DAF-12 induce desarrollo reproductivo. En *S. stercoralis*, el tratamiento de infecciones causadas por los gusanos iL3 fuera de sus huéspedes con agonistas de DAF-12 ha demostrado que logra iniciar la reanudación de la alimentación. Por otra parte, estudios preliminares en esta especie demostraron que la activación continua de DAF-12 mediante la administración farmacológica de AD a larvas preinfecciosas previene la etapa infecciosa induciendo el desarrollo reproductivo de larvas jóvenes que de otro modo detendrían su desarrollo como iL3s (49). Por lo tanto, el estado de DAF-12 parece ser esencial tanto para iniciar como para establecer la infección. La capacidad de interrumpir el ciclo de vida del parásito controlando la actividad de DAF-12 sugiere una emocionante estrategia terapéutica antihelmíntica, distinta a la de los fármacos actuales, que se dirigen a las tubulinas

(benzimidazoles), canales iónicos (ivermectina y dietilcarbamazina), o bacterias simbióticas de parásitos (doxiciclina) y que son incapaces de atacar las larvas autoinfectiosas latentes.

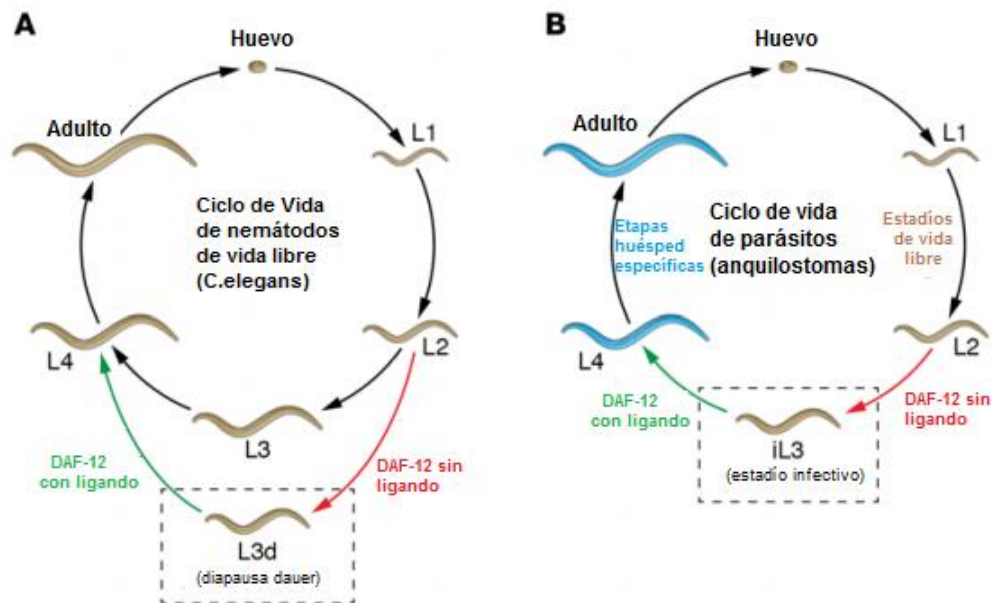


Figura 14. Regulación DAF-12 de la etapa iL3 como un nuevo objetivo terapéutico. (A) En nemátodos de vida libre, la decisión de entrar en la diapausa *dauer* ocurre en la segunda etapa larval, L2 produciendo la entrada a larva L3 *dauer* y está determinada por la presencia o ausencia de ligandos DAF-12, si hay ligandos, continúa hacia L4, caso contrario se estaciona en el estadio *dauer*. (B) En nemátodos parásitos, la etapa iL3 es equivalente a la L3d de los nemátodos de vida libre, y esta etapa puede ser regulada por ligandos DAF-12. Aunque todavía no se han sido identificado ligandos para los receptores DAF-12 de parásitos, se ha demostrado que la administración farmacológica de AD previene la formación de larvas iL3, interrumpiendo así el ciclo de vida del parásito. Adaptada de Wang, 2017.

La elección de DAF-12 como blanco para tratar enfermedades parasitarias se basa en el uso de ligandos exógenos que alteren la regulación endócrina y la fisiología de los parásitos. Las drogas ideales deben ser moduladores de DAF-12 que actúen en la entrada y salida de la etapa iL3. Una potencial droga es el $\Delta 7$ -ácido dafacrónico ($\Delta 7$ -AD), capaz de activar el DAF-12 de algunos parásitos, aunque con menos potencia y eficacia (49).

1.19 Nematodos parásitos de plantas

Las infecciones de las plantas por nemátodos parásitos de las plantas (NPP) continúan siendo una de las principales limitaciones en los sistemas agrícolas. Las pérdidas agrícolas a nivel mundial causadas por NPP se han estimado en \$100 mil millones USD anuales (50). Las diferentes especies de fitonematodos de raíz pertenecientes al género *Meloidogyne* constituyen uno de los grupos más importantes de NPP en todo el mundo. Su amplia gama de hospedadores, combinada con una presencia ubicua, continúa

presentando desafíos para su control y mejoramiento de la resistencia (51). Estos nematodos causan daños económicos significativos a una amplia variedad de cultivos. La infección por NPP reduce el rendimiento de la cosecha y la calidad del fruto, ya sea directamente causada por la alimentación de nematodos desde la raíz provocando su deformación o indirectamente por la predisposición a la infección por otros patógenos que resulta de la penetración de nematodos en las raíces.

1.20 Ciclo de Vida de *Meloidogyne*

El ciclo de vida de *M. incognita* toma de tres a seis semanas en completarse, dependiendo de la especie y las condiciones ambientales, y comprende cuatro etapas juveniles además de las etapas adultas, es decir, machos y hembras fértiles. Estas etapas están separadas por mudas, durante las cuales se reemplaza la cutícula (Fig.15).

El desarrollo del huevo se inicia unas pocas horas después de la ovoposición, llevándose a cabo divisiones celulares sucesivas hasta que se forma el primer estadio juvenil (J1) enrollado y con un estilete, el cual se puede mover dentro del huevo, aunque no es muy activo. Poco después, emerge el segundo estadio juvenil (J2) rompiendo la membrana flexible del huevo, por medio de pinchazos repetidos con el estilete. La eclosión de los huevos es influenciada por la temperatura y se lleva a cabo sin requerir ningún estímulo por parte de la raíz de la planta. Sin embargo, en algunos casos, los exudados radiculares estimulan la eclosión (52, 53). El J2 se mueve a través del suelo en busca de una raíz de la que pueda alimentarse. Su capacidad de supervivencia se ve reforzada por varias adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la quiescencia, la diapausa, y las reservas de lípidos que extienden su viabilidad hasta que llega y penetra la planta huésped (54). La búsqueda de la raíz es al azar hasta que se aproxima a unos cuantos centímetros. En seguida, son atraídos por los exudados radiculares, acumulándose y penetrando la raíz por la zona de elongación debajo del punto de crecimiento (55). Los gusanos juveniles de la segunda etapa (J2) invaden y perforan unas pocas células vegetales de la raíz con su estilete en forma de lanza en la zona de alargamiento o zona subapical donde la endodermis de la planta presenta escaso desarrollo y no constituye una barrera física para el ingreso hacia el interior. Se internan en la raíz del huésped y los pequeños juveniles (400 μ m largo y 15 μ m de ancho) siguen una ruta de migración compleja, sin causar daños evidentes. *M. incognita* continúa hasta el tejido cortical y avanza intercelularmente hasta llegar al cilindro vascular en diferenciación, que consiste en un conjunto de células grandes modificadas denominadas células gigantes, las cuales se caracterizan por la presencia de muchos núcleos de gran tamaño, con nucléolos prominentes, altamente lobulados, un alto número

de orgánulos, citoplasma denso con altas tasas metabólicas y paredes engrosadas e invaginadas. Esta estructura es conocida con el nombre de nódulo o agalla.

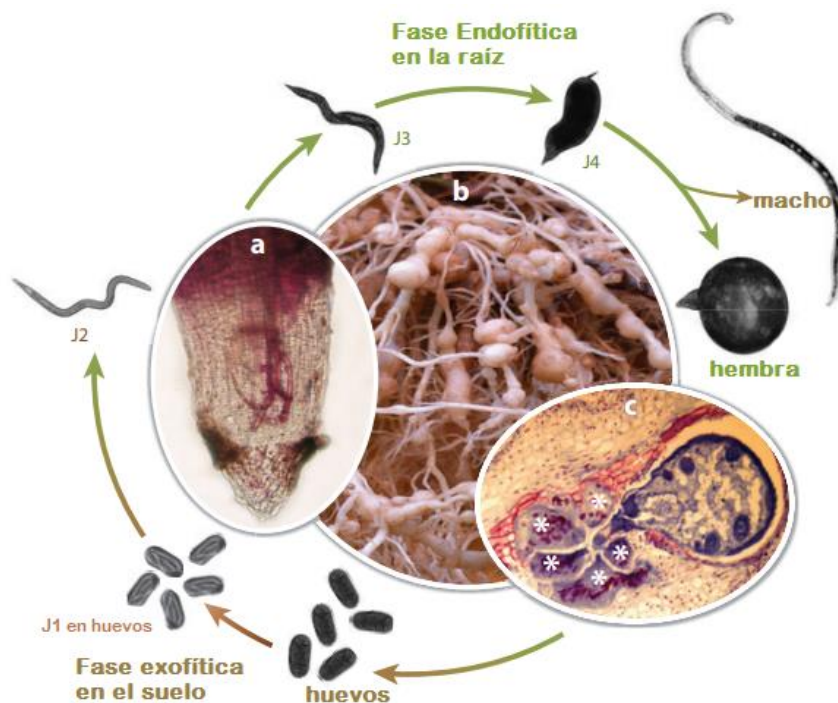


Figura 15: Ciclo de vida de *Meloidogyne*. (a) Sección longitudinal de una punta de raíz que muestra J2 (teñidos con Fucsina ácida) girando en el meristema de la raíz para migrar al cilindro vascular. (b) Nódulos en las raíces de plantas de tomate (c) Sección longitudinal de una raíz infectada que muestra una hembra madura y cinco células gigantes (*) que constituyen el sitio de alimentación del nematodo. La figura representa el ciclo de vida que lleva a cabo *Meloidogyne* desde su fase de huevos, J1-J4 hasta diferenciarse en hembra fértil o macho.

Los J2 entonces deben someterse a otras tres mudas para convertirse en adultos. Las hembras de forma redonda permanecen sedentarias, mientras que los machos se vuelven vermiformes y móviles de nuevo, y finalmente dejan la raíz de la planta. Las hembras ponen huevos que se encuentran embebidos en una masa gelatinosa, la misma que los mantiene juntos y los protege tanto de las condiciones ambientales extremas como de los depredadores. Habitualmente, la masa que contiene los huevos se encuentra en la superficie de los nódulos, pero algunas veces está depositada directamente sobre la superficie o dentro del tejido de la raíz de la planta huésped. La masa de huevos es inicialmente suave, pegajosa, hialina, pero se vuelve más firme y adquiere una coloración marrón oscuro con el transcurso del tiempo (53). Se pueden encontrar más de mil huevos en una masa, que puede ser más grande que el cuerpo de la hembra (56).

1.21 Reproducción de *Meloidogyne*

Una característica notable de los NPP es su extraordinaria diversidad en términos de reproducción y genoma. En efecto, las especies de este género pueden reproducirse sexualmente o a través de diferentes modos de partenogénesis (meiótica o mitótica), y algunas especies incluso se pueden reproducir tanto sexualmente (*amphimixis*) como a través de partenogénesis meiótica, dependiendo de la presencia o ausencia de machos. Según Blanc-Mathieu (57) las especies que producen mayor daño en la agricultura mundial son aquellas que se reproducen asexualmente, sin meiosis. El sorprendente éxito parasitario de la reproducción asexual de especies de *Meloidogyne* podría explicarse en parte porque su genoma está compuesto de un rico contenido de elementos transponibles, resultantes de eventos de aloploidización (proceso en el que dos o más conjuntos completos de cromosomas son derivados de diferentes especies), promoviendo la plasticidad y diferentes funciones entre copias genéticas en ausencia de sexo y meiosis. Esto puede explicar el éxito parasitario de estos nematodos mediante la capacidad para adaptarse e integrarse al huésped en condiciones extremas.

1.22 Métodos de Control de la infección por NPP

Hoy en día, los métodos utilizados con mayor frecuencia para manejar nematodos en agricultura incluyen cultivos rotativos con plantas que son no hospedadoras de NPP, utilizando plantas resistentes si están disponibles, y aplicando nematicidas químicos. Sin embargo, el uso de nematicidas está desapareciendo debido al potencial problema de contaminación ambiental, humano y animal causando problemas de salud. Por ejemplo, nematicidas efectivos tales como DBCP (dibromocloropropano) y EDB (dibromuro de etileno) se han retirado del mercado debido a sus posibles efectos nocivos en humanos y el medio ambiente. El bromuro de metilo, el fumigante más eficaz y ampliamente utilizado para el suelo con malezas y nematodos, ya ha sido prohibido en algunos países, y está prevista su retirada del mercado para la mayoría países por acuerdos internacionales. Se espera que el uso de los nematicidas no fumigantes basados en organofosforados y carbamatos aumenten después de la retirada del bromuro de metilo, provocando nuevos problemas medioambientales. El aldicarb altamente tóxico, que se usa para controlar insectos y nematodos, se ha detectado en aguas subterráneas. Estos nematicidas mencionados anteriormente están bajo revisión de la agencia de protección ambiental americana (58). Como la disponibilidad de nematicidas aprobados por entes regulatorios está siendo cada vez más limitada, se requiere urgentemente el desarrollo de estrategias

alternativas de manejo contra NPP con énfasis en opciones ecológicas (59). El concepto de manejo integrado de plagas, que combina estrategias de control convencionales y nuevas, tiene un rol fundamental. El progreso en biología molecular ha revelado la genética y biología de nematodos y las interacciones nematodos- huésped a niveles moleculares, en particular, los genes de resistencia de las plantas ante la infección por nematodos han sido ampliamente estudiados. Las plantas transgénicas que poseen genes “antinematodos” han tenido un amplio crecimiento últimamente en el control de infecciones por NPP y actualmente existen varios estudios de plantas transgénicas con genes de resistencia a *Meloidogyne* en tomates, en pepino, en garbanzo, en berenjena (60-63), entre otros. El control de infecciones por NPP cada vez es más novedoso y efectivo, brindando soluciones amigables con el medio ambiente.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS GENERALES

1- Caracterización funcional de ligandos sintéticos de DAF-12, su evaluación biológica y el establecimiento de las bases moleculares de acción.

2- Análisis del potencial uso de los ligandos sintéticos, en el control biológico de nematodos parásitos de plantas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluación de la actividad biológica de los ligandos sintéticos de DAF-12 utilizando *C. elegans* como modelo

1.1 Evaluar la actividad agonista de los compuestos mediante ensayos de recuperación del fenotipo Daf-c de las cepas nulas *daf-9(dh6)*.

1.2 Estudiar la actividad antagonista de los compuestos utilizando gusanos salvajes N2, observando el retraso en el desarrollo de los gusanos en su ciclo de vida reproductivo.

2. Identificación de los genes ortólogos de *daf-12* de *C. elegans* (CeDAF-12) en el fitonematodo *Meloidogyne incognita*.

2.1 Realizar la búsqueda e identificación de los genes ortólogos del gen *Cedaf-12* en *M. incognita* mediante análisis bioinformático.

3. Caracterización molecular de los putativos genes *daf-12* de *Meloidogyne incognita* (*midaf-12*) identificados *in silico*

3.1 Clonado del gen *midaf-12* fusionado a una etiqueta de c-Myc bajo el control de un promotor constitutivo fuerte en un vector de expresión de células eucariotas.

3.2 Desarrollar un sistema de genes reporteros en células de mamífero utilizando los plásmidos obtenidos en el punto anterior y el plásmido pGL3Luc, para evaluar la actividad (agonista y/o antagonista) de los ligandos sintéticos de *MIDAF-12*.

3.3 Evaluar la unión de los AD y los compuestos sintéticos empleando a los putativos receptores nucleares homólogos al CeDAF-12 (*MIDAF-12*) utilizando el sistema desarrollado en el punto anterior.

4. Analizar el potencial uso de compuestos sintéticos análogos de los AD en el control de los procesos infectivos de *Meloidogyne incognita*.

4.1 Elaborar protocolos de laboratorio que permitan la purificación, cuantificación y eclosión de huevos del fitonematodo de modo eficiente, económico y a gran escala.

4.2 Validación y determinación de la actividad nematocida específica de los esteroides sintéticos ligandos del CeDAF-12 sobre la eclosión de huevos y mortalidad sobre poblaciones purificadas de J2.

4.3 Evaluar el efecto de estos compuestos sobre la infección de *M. incognita* en plantas de tomate, mediante un sistema de crecimiento de plantas en papel y en maceta.

HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que diferentes compuestos esteroidales sintéticos, que comparten una estructura básica con los AD, podrían interactuar con el receptor DAF-12 de *C. elegans* (CeDAF-12) de varias maneras y promover diferentes respuestas biológicas (la modulación selectiva del receptor DAF-12 podría involucrar diferencias cuali y cuantitativas en la capacidad de interactuar con co-activadores y/o co-represores de la transcripción).

En esta tesis se caracterizarán compuestos esteroidales sintéticos utilizando ensayos en células eucariotas y estudios *in vivo* empleando tanto la cepa salvaje como cepas mutantes en genes que forman parte del sistema endócrino en el cual DAF12 es el elemento central. Posteriormente, se estudiará el potencial uso de dichos compuestos en el control del ciclo de vida de gusanos patógenos de plantas. Los compuestos estudiados fueron sintetizados en los laboratorios de química orgánica de los Dres. Gerardo Burton y Javier Ramírez del Departamento de Química Orgánica de la FCEN-UBA.

Al iniciar esta tesis, en el laboratorio del Dr. Burton se sintetizaron una nueva serie de compuestos esteroidales derivados del Δ^4 -AD diseñados a partir de modificaciones en la cadena lateral C-24, suponiendo que, el reemplazo del oxígeno del hidroxilo, por un átomo de flúor, podría conferir mayor afinidad de los compuestos por el receptor. Posteriormente, este grupo sintetizó también análogos que presentan menor flexibilidad de la cadena lateral. A su vez, el Dr. Ramírez y su grupo empleó la reacción multicomponente de Ugi para generar una biblioteca de compuestos esteroidales que conservaban los grupos funcionales y las características estructurales que se habían identificado previamente como necesarias para la actividad, pero permitiendo una mayor variabilidad al incorporar α -aminoacilamidas estructuralmente diversas como cadenas laterales.

En esta tesis se evaluarán la actividad de los compuestos tanto en ensayos en células eucariotas como *in vivo* en *C. elegans* a fin de analizar las respuestas biológicas producidas por la interacción de los compuestos sintetizados con el RN DAF-12, utilizando mutantes deficientes en la síntesis de AD incapaces de regular su ciclo de vida y metabolismo la cepa salvaje. Además, se estudiará si los compuestos caracterizados en esta tesis son capaces de regular el ciclo de vida de los fitonematodos del género *Meloidogyne* y si los mismos resultan útiles en el control biológico del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Caracterización *in vivo* de compuestos mediante ensayos de actividad biológica en *C. elegans*

4.1.1 Cepas utilizadas, condiciones de crecimiento y medios de cultivo

Cepa N2: La cepa *wild-type* de *C. elegans* utilizada es “N2” (la cepa original aislada en Bristol, Inglaterra, en 1940). La temperatura de incubación ideal es de entre 18 a 22° C.

Cepa mutante AA199: El alelo *daf-9(dh6)* presenta dos mutaciones puntuales en las posiciones 246 y 261 (C por T) que produce el reemplazo de una glutamina por un codón de terminación en ambos casos, lo que provoca que los fragmentos de proteína que se sintetizan carezcan completamente de actividad. Esta cepa presenta un fenotipo Daf-c con alta penetrancia y los gusanos homocigotas para este alelo se desarrollan pasando por las primeras etapas (L1 y L2) y finalmente se arrestan en L3 formando una larva *dauer* parcial. Un número muy pequeño de ellos retoma el ciclo de vida reproductivo y se desarrolla a L4, los nematodos que alcanzan este estadio presentan gonadogénesis arrestada y otros tejidos reproductivos como la vulva no se desarrollan correctamente, por lo cual son infértiles. En la realización de experimentos de actividad agonista se utilizó la cepa *daf-9(dh6)* X; *dhEx24* (T13C5; pTG96(*sur-5::NLS::gfp*)). la cual es una cepa homocigota *daf-9(dh6)* nula para la expresión de la proteína DAF-9, y que además contiene un plásmido que codifica el gen *daf-9* salvaje (que se expresa bajo el control de su propio promotor) y por otro lado el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) (bajo el control de promotor ubicuo *sur-5*). El gen salvaje codificado por el plásmido es el que le permite completar su desarrollo y tener descendencia, de no llevar este gen, los gusanos permanecerían en estadio *dauer* como se explicó anteriormente.

C. elegans se creció en placas conteniendo medio NGM sólido, sobre el cual se sembraron 100 µl de un cultivo de *E. coli* OP50 en fase estacionaria (las cuales son utilizadas como alimento). La preparación de *E. coli* OP50 como alimento se detalla en el punto 4.12

Medios y soluciones:

<u>NGM</u> (1 litro)	NaCl	3 g
	Peptona	2,5 g
	Agar	17 g

Llevar a volumen, autoclavar y luego adicionar

Colesterol (5mg/ml)	1 ml
MgSO ₄ 1M	1 ml
CaCl ₂ 1M	1 ml
Buffer KPO ₄ 1M	25 ml

Autoclavados previamente excepto el colesterol

LB (1 litro)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Ajustar el pH a 7, llevar a volumen y autoclavar

Buffer M9 (1 litro)

KH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
NaCl	5 g
MgSO ₄ 1M	1 ml

Llevar a volumen y esterilizar por autoclave

PBS 1X (1 litro)

NaCl	8 g
KCl	200 mg
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	240 mg

Llevar a volumen y esterilizar por autoclave

4.1.2 Preparación de *E. coli* como alimento para *C. elegans* y conservación de las cepa OP50.

Se inocularon bacterias *E. coli* OP50 en medio LB estéril a partir de una sola colonia de bacterias crecidas en placa de medio LB y se cultivaron las bacterias a 37 °C a 200 rpm por 16 h. Para la preparación de las bacterias como alimento, las mismas se cosecharon por centrifugación 5000 rpm x 15 min y el precipitado de células se resuspendió en el mismo medio a una OD₆₀₀=1. Las células se mantuvieron conservadas a 4 °C para su posterior utilización por un mes. Para su conservación a más largo plazo, se tomó 0,5 ml del cultivo en medio LB y se agregó a 0,5 ml de LB 30 % glicerol para llevar a una concentración final 15 % de glicerol. Las células se conservaron a -80 °C

4.1.3 Preparación de placas con los compuestos esteroidales sintéticos

Las placas de NGM conteniendo los esteroides indicados en cada caso o etanol como control se prepararon utilizando diluciones apropiadas de los mismos en etanol a partir de una solución madre 0,02 M en DMSO. Luego se siembran 100 µl del cultivo de bacterias *E. coli* OP50 sobre el medio NGM ya completamente seco. Las bacterias se extienden con un rastrillo de vidrio, sin dañar la superficie del agar, para evitar que los gusanos se introduzcan en su interior (lo que dificulta su posterior recuperación). Las placas con medio NGM ya sembradas con las bacterias se incuban a 37 °C por 18 h y se conservan a 4 °C hasta su utilización (64).

4.1.4 Transferencia de gusanos cultivados en placas NGM

Se utilizan varios métodos para transferir *C. elegans* de una placa de Petri a otra. Un método rápido y conveniente es el llamado "*chunk*", en el que se utiliza una espátula estéril para mover un trozo de agar conteniendo muchos gusanos que se desplazarán fuera del mismo y se distribuirán sobre el césped bacteriano de la nueva placa. Este método funciona bien para transferir gusanos que están dentro del agar o cuando se desea transferir un número grande de los mismos.

Otro método es escoger gusanos individualmente con un recolector de gusanos denominado "*pick*", el mismo se puede hacer uniendo una porción de un alambre de platino de calibre 32 a la punta de una pipeta Pasteur, el cual se calienta y enfría rápidamente. Se esteriliza el alambre entre transferencias, calentándolo en la llama de un mechero pequeño de alcohol, para evitar contaminar el gusano con bacterias o con un gusano de una cepa no deseada. Se necesita un poco de experiencia para trabajar con un *pick* a fin de evitar hacer agujeros en el agar, ya que los gusanos se mueven hacia ellos y posteriormente se dificulta verlos o recogerlos.

4.1.5 Descontaminación de *C. elegans*

Las placas de *C. elegans* pueden contaminarse con hongos u otras bacterias y en caso de ser necesario se descontaminan las placas de la siguiente manera: Se prepara una solución descontaminante (0,5 ml de NaOH 1M y 0,5 ml hipoclorito de sodio (NaOCl) 5 % cloro) en un tubo Eppendorf estéril. Se coloca sobre el borde de una placa de NGM limpia con bacterias OP50 una gota de solución descontaminante (10 μ l) y mediante el "*pick*" se toma una hembra hermafrodita con huevos y se la deposita sobre dicha gota. Luego se observa el desprendimiento de la cutícula de la hembra, la cual muere al igual que las bacterias y hongos, y la liberación de los huevos que están en su interior que resultan resistentes al tratamiento. Se deja la placa a 18 °C por 16 h. Al día siguiente se observaron gusanos en estadio L1 que se transfieren a una nueva placa. Para ciertos experimentos es necesario sincronizar la población de gusanos mediante el método de "*Bleaching*" que permite tener gran cantidad de gusanos en un mismo estadio. También se utiliza para eliminar contaminaciones.

Solución de NaOH/Cl ₂ (15ml):	
Cloro 5%	5,7 ml
NaOH 1N	7,5 ml
Agua	1,8 ml

Se lavan las placas de nematodos con 3 ml de M9 con micropipeta P1000. El producto lavado se coloca en un tubo Falcon de 15 ml, el cual se centrifuga a baja velocidad para concentrar los gusanos sin dañarlos. Luego de la centrifugación se

elimina el sobrenadante y se agregan 5 ml de la solución de NaOH/Cl₂ y se agita suavemente por 3 min. Al finalizar la incubación se agregan 2 volúmenes de medio M9 estéril para diluir la solución de lavado. Con este tratamiento se rompen los gusanos liberándose los huevos y se eliminan las contaminaciones.

Se centrifuga nuevamente a baja velocidad y se elimina el sobrenadante. Se realizan 2 lavados con el mismo volumen de M9 estéril. Los huevos se resuspenden en 5 ml de M9, se agregan 35 µl de una solución de antibióticos (penicilina 100 UI/ml, y estreptomicina 100 µg/ml) y se incuban en agitación durante 16-24 h. Bajo estas condiciones los huevos eclosionan y permanecen en el estadio larval L1 hasta que se les agrega bacterias para alimentarse.

4.1.6 Ensayo de actividad agonista de compuestos en la cepa *daf-9(dh6)*

Se transfirieron hembras hermafroditas a placas de NGM que contenían diferentes concentraciones de los ligandos esteroidales sintéticos a estudiar (según se indica en cada caso), se les permitió que pusieran huevos durante 4 h y al finalizar este período las mismas fueron removidas. Las placas se incubaron durante varias horas hasta que los huevos eclosionaran y se desarrollaran a un estadio L1. Utilizando una lupa de fluorescencia se identificaron los gusanos que no expresaron GFP y se los transfirió a las placas conteniendo diferentes compuestos (ver Fig. 16, Tabla 1). Como control se realizó el mismo procedimiento utilizando placas que contenían el mismo volumen de etanol que el utilizado en la preparación de las placas con compuestos. Se observaron las placas durante diez días y se determinó el porcentaje de gusanos que se encontraba en cada estadio de desarrollo y de los que permanecían en estadio *dauer*. Se consideró que los gusanos comenzaban a recuperarse cuando comenzaban a ingerir alimento (presentaban movimiento de la faringe) y presentaban una forma similar a los gusanos salvajes (perdían la constricción radial y aumentaban su diámetro). Para corroborar los resultados obtenidos se midieron los tamaños de los gusanos recuperados con la ayuda del programa Image J® (65). Los experimentos se realizaron por triplicado, con $n \geq 60$ en cada caso y con tres réplicas biológicas independientes.

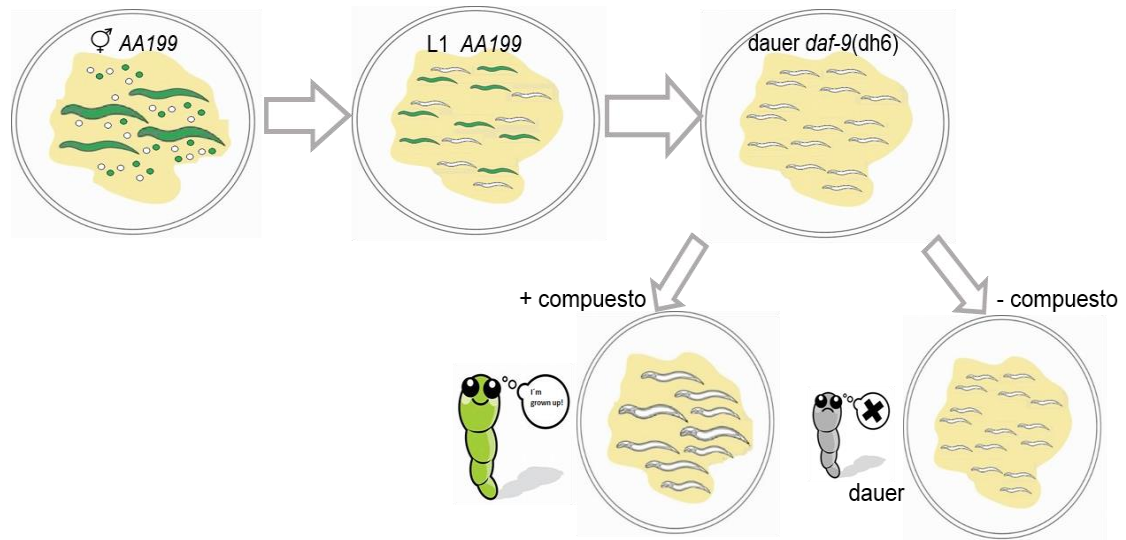


Figura. 16. Selección de gusanos *daf-9(dh6)*. Hembras hermafroditas *daf-9(dh6)dhEx24* (AA199) ponen huevos en placas sin compuesto y luego se las retira de la placa. Se dejan desarrollar en esas placas a los embriones hasta que alcancen el estadio L1 y se observan en una lupa de fluorescencia. Se seleccionan aquellos que perdieron el marcador extracromosomal y por lo tanto son GFP negativos. A los gusanos *daf-9(dh6)* se los transfirió a placas con los respectivos compuestos o en presencia de etanol como control.

<p>Compuesto 1</p>	<p>Compuesto 6</p>	<p>Compuesto 7</p>
<p>Compuesto 8</p>	<p>Compuesto 9</p>	<p>Compuesto 10</p>
<p>Compuesto 11</p>	<p>Compuesto 12</p>	<p>Compuesto 13</p>

Compuesto 14	Compuesto 15	Compuesto 16
Compuesto 17		

Tabla 1. Compuestos sintéticos ensayados en cepa mutante *in vivo*

4.1.7 Ensayo de actividad antagonista de los compuestos utilizando la cepa salvaje N2

Para analizar la actividad antagonista de los diferentes compuestos se prepararon placas de NGM conteniendo el respectivo esteroide como se describió en el apartado 4.1.3 (ver Tabla 2). Se transfirieron a las placas las hermafroditas grávidas de la cepa salvaje N2, se les permitió poner huevos durante un período de 4 h y luego de haber obtenido la cantidad de huevos necesarios se retiraron las hermafroditas de las placas. Después de un período de 8 h, las larvas de estadio L1 se transfirieron a placas que contenían concentraciones crecientes de los compuestos o etanol como control. Las placas se incubaron a 18 °C y el porcentaje de nematodos en cada etapa de desarrollo se determinó según el tamaño del gusano y la forma de la vulva cada 24 h durante 3 días (66). Además, nematodos desarrollados por 24 h en placas que contenían 100 µM de los compuestos 2, 3, 4 y 5 se transfirieron a placas NGM nuevas en ausencia de dichos compuestos. Se determinaron las etapas de desarrollo en las que se encontraban los mismos cada 24 h durante otros 2 días. La concentración final hace referencia a la masa de compuesto referida al volumen total de agar contenido en la placa (5 ml / placa).

Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4

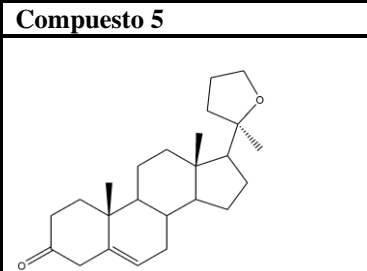
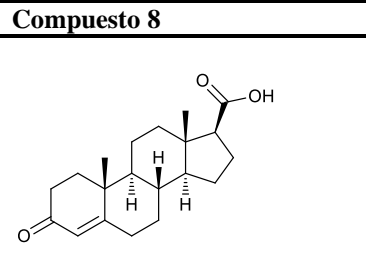
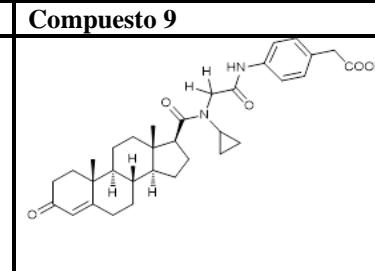
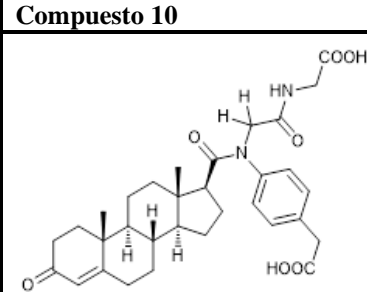
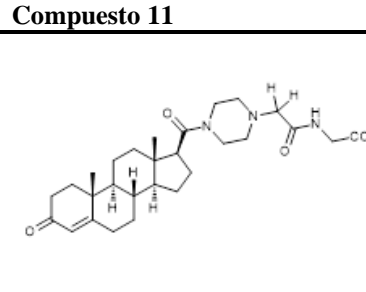
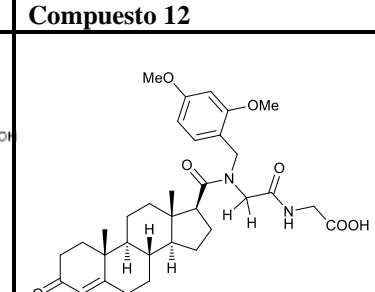
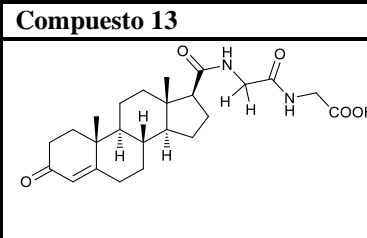
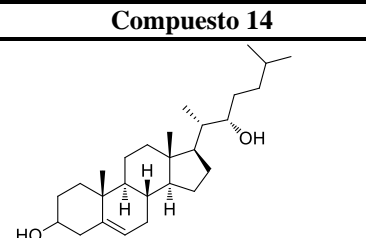
Compuesto 5	Compuesto 8	Compuesto 9
		
Compuesto 10	Compuesto 11	Compuesto 12
		
Compuesto 13	Compuesto 14	
		

Tabla 2. Compuestos sintéticos ensayados en cepa salvaje *in vivo*

4.1.8 Montaje de los gusanos para observación al microscopio

Se precalentó a 70° C agarosa 2% en agua, se colocó una gota de agar en el portaobjetos limpio, se cubrió con otro portaobjetos y se presionó suavemente para que la gota de agar se aplane a un círculo de aproximadamente 0,4 mm de espesor (formando una almohadilla sobre el cual se colocarán los gusanos y así no serán dañados al colocar el cubreobjetos encima). Cuando el agar se solidificó se extrajo suavemente el portaobjetos superior deslizando lateralmente el vidrio. Para el montaje, se colocaron los gusanos sobre una gota de azida sódica 10 mM en M9 en el centro de la almohadilla de agar y se colocó suavemente un cubreobjetos. La azida sódica anestesia a los gusanos y se pueden observar fácilmente al microscopio.

4.1.9 Tinción de Lípidos con Oil Red (ORO)

Se preparó una solución madre de ORO disolviendo 500 mg de ORO en polvo (Aldrich, cat #1320-06-5) en 100 ml de isopropanol al 100%. Una vez preparada, se almacenó la solución madre bien sellada sin exposición a la luz. Se preparó una dilución (3:2) en agua a partir de la solución madre la cual se filtró (utilizando de acetato de celulosa estéril de 0,2 µm) y se agitó 2 h antes de usarlo en oscuridad (67)

Los gusanos crecidos en placas con los respectivos compuestos sintéticos durante 8 días, se recuperaron agregando 1 ml de PBST (PBS 1x + 0,01% Tritón X-100)

a la placa. La suspensión de gusanos se tomó con cuidado y se la transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml que se centrifugaron a 8.000 rpm por 2 min. El sobrenadante se descartó quedando los gusanos concentrados en el fondo del tubo, las bacterias remanentes fueron removidas lavando los gusanos por tres veces con PBST. Luego, se agregaron 500 µl de isopropanol 40% al concentrado de gusanos y se los trató por 3 min a temperatura ambiente con agitación. Transcurrido este tiempo se centrifugaron los tubos conteniendo los gusanos a 8.000 rpm por 2 min, se descartó el sobrenadante y se agregaron a cada tubo 500 µl de la dilución de ORO. Los tubos con los gusanos se incubaron con el colorante a temperatura ambiente por 6 h con agitación (rotación a 30 rpm). Al finalizar la incubación, se centrifugaron los tubos a 8.000 rpm por 2 min, se hizo un primer lavado de los gusanos con 500 µl de isopropanol 60% mezclando por inversión y para eliminar el exceso de colorante los gusanos se lavaron nuevamente con 500 µl de una solución buffer PBST en agitación por 15 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 8.000 rpm por 2 min, se eliminó el sobrenadante dejando 50 µl de medio para la resuspensión de los gusanos y se colocaron 5 µl sobre un portaobjetos para ser observados en el microscopio Motic BA-210 y se fotografiaron con un aumento 10X.

4.2 Caracterización de los compuestos mediante ensayos de genes reporteros en células HEK 293T

4.2.1 Soluciones utilizadas en ensayos reporteros en células de mamífero:

Buffer BBL

Na ₂ HPO ₄	2, 37 g
KH ₂ PO ₄	2, 27 g

Llevar a 500 ml con H₂O destilada, ajustar el pH a 6,8

Buffer Z

Na ₂ HPO ₄	4, 25 g
NaH ₂ PO ₄	2, 79 g
KCl	0, 375 g
MgSO ₄	0, 06 g

Llevar a 500 ml con H₂O destilada

ONPG 4 mg/ml (50 ml)

ONPG	0, 2 g
Buffer Z	50 ml

4.2.2 Soluciones de esteroides

Los esteroides se disolvieron en DMSO a una concentración 10 mM y las soluciones se conservaron a - 20 °C. Para la preparación de las diluciones seriadas se utilizó medio DMEM con 2% DMSO hasta llegar a la concentración indicada

4.2.3 Plásmidos utilizados

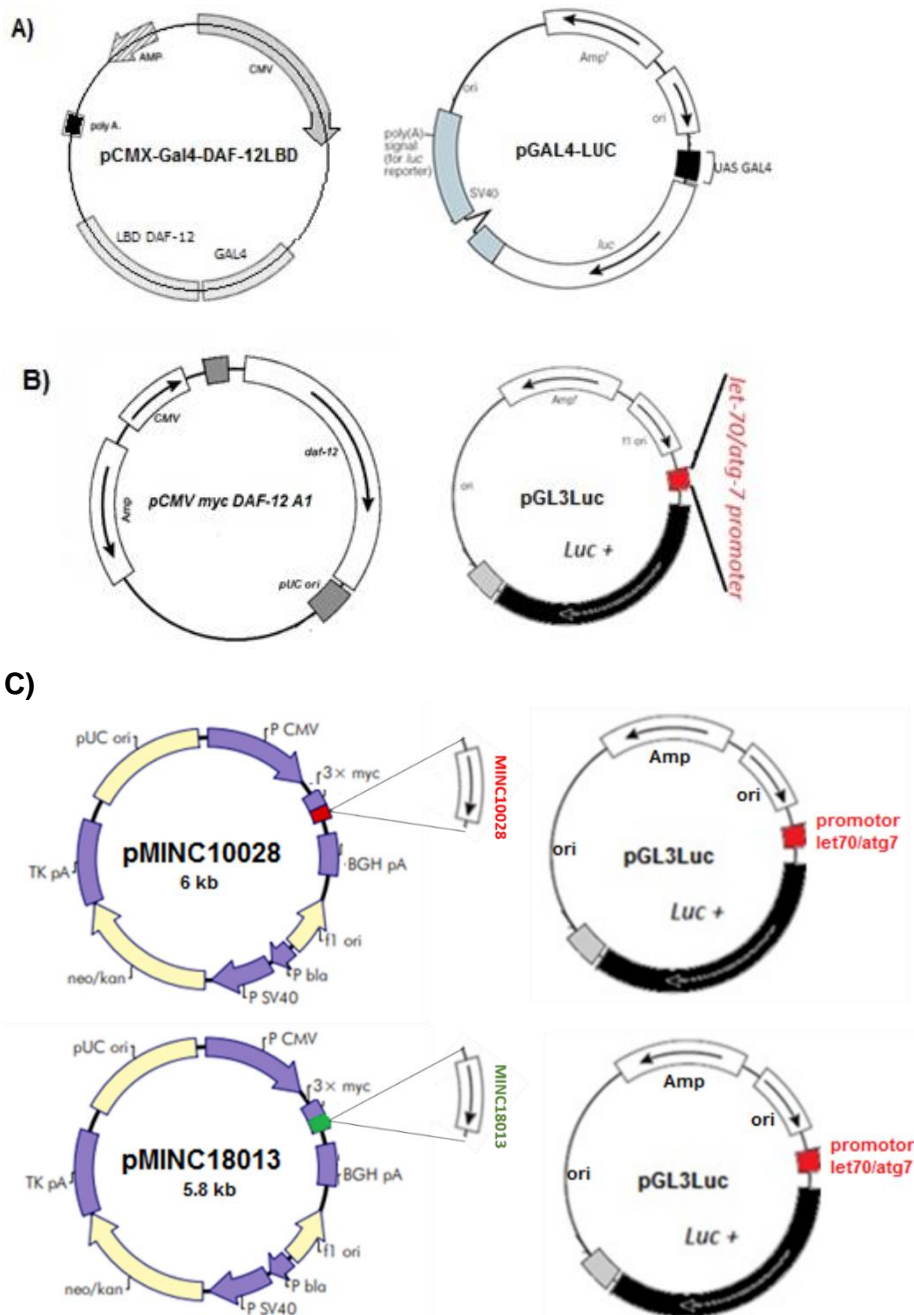


Figura 17. Plásmidos utilizados en los ensayos de transactivación de genes reporteros en células **A)** Plásmido pCMX-Gal4-DAF-12LBD (pGAL4-DAF-12LBD) que codifica una proteína quimera que contiene el dominio de unión a ADN de la proteína GAL4 fusionada al dominio de unión al ligando del receptor DAF-12 y plásmido pGAL4-Luc que codifica el gen reportero de luciferasa bajo el control de un promotor que contiene la secuencia reguladora UAS/Gal4. **B)** plásmido pCMVmycDAF-12A1 (pDAF-12A1) que codifica la proteína DAF-12 fusionada a una etiqueta c-Myc y el plásmido pGL3Luc que codifica la luciferasa bajo el control del promotor *let-70/atg7*. **C)** plásmidos pMINC10028 y pMINC18013 que codifican los dos putativos genes homólogos del *Cedaf-12* en *Meloidogyne* y el plásmido pGL3Luc que codifica la luciferasa bajo el control del promotor *let-70/atg7* fuertemente regulado por DAF-12.

4.2.4 Líneas celulares

La línea celular HEK 293T (células de riñón de embrión humano) fueron cultivadas a 37 °C bajo atmósfera húmeda con 5 % CO₂ en medio DMEM suplementado con 10 % suero bovino fetal, penicilina 100 UI/ml, y estreptomycin 100 µg/ml.

4.2.5 Preparación de la solución madre de polietilenimina

La solución de polietilenimina (Aldrich, cat # 408727) 10 mg / ml se preparó en agua bidestilada y se esterilizó con un filtro de 0,2 µm. Se prepararon alícuotas de 1,3 ml que se conservaron a -80°C.

4.2.6 Ensayo de genes reporteros

A fin de estudiar la actividad de los ligandos sintéticos al CeDAF-12, las células HEK293T fueron transfectadas, por un lado, con el plásmido pGal4-DAF-12LBD cedido por el Dr. David Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute and Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX, U.S.A.) y el plásmido pGal4-Luc cedido por el Dr. Omar Coso (IFIBYNE-CONICET and Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina) (Fig. 17 A). En otro ensayo, las células HEK293T fueron transfectadas con el plásmido pDAF-12-A1 y con el reportero pGL3Luc (Fig. 17 B) cedidos por el Dr. Daniel Hochbaum (Department of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, U.S.A.).

Por otro lado, para caracterizar la actividad de las 2 putativas proteínas homólogas a CeDAF-12 de *M.incognita*, las células HEK293T fueron transfectadas con los plásmidos pMINC10028 y pMINC18013, que codifican cada uno de ellos, uno de los dos putativos genes homólogos de *Cedaf-12* en *M. incognita* fusionados a una etiqueta c-Myc (esta tesis, sintetizados por GeneScript) y por el reportero pGL3Luc (Fig. 17 C).

En todos los casos las células se co-transfectaron con un plásmido que expresa la enzima β-galactosidasa de manera constitutiva (pCMX-β-Gal) como control de transfección. Se plaquearon 15×10⁴ células HEK293T por pocillo en placas P24 y se cultivaron por 24 h. Al cabo de este tiempo, se removió el medio por aspiración y se agregaron 170 µl de medio DMEM sin antibiótico con 5% SFB a cada pocillo.

Para transfectar las células se preparó un tubo conteniendo los plásmidos a utilizar en cada una de ellas (tubo 2), cuyo volumen total se adicionó gota a gota en el tubo 1 que contenía PEI más OPTIMEM® según se indica en la Tabla 3. El tubo 1 conteniendo la mezcla de transfección se incubó por 20 min a temperatura ambiente para permitir la formación de liposomas.

Una vez transcurridos los 20 min se agitó suavemente la mezcla de transfección contenida en el tubo 1 y se agregaron 15 µl de la misma a cada pocillo (se mezcló suavemente con movimientos en cruz para homogenizar el contenido). Las placas se

incubaron a 37°C durante 5 horas y posteriormente, se reemplazó el medio de las placas por medio DMEM fresco con antibióticos conteniendo 10 % de suero deslipidizado y se agregaron los esteroides a estudiar en las concentraciones indicadas. Las células fueron incubadas en presencia de los mismos durante 18 h y el ensayo se detuvo aspirando el medio de cultivo. Las células se lavaron con PBS 1X y a cada pocillo se agregaron 200 µl de buffer BBL frío. Las células se despegaron utilizando una espátula plástica y se transfirieron a tubos Eppendorf, las mismas se cosecharon por centrifugación (4 min X 8000 rpm a 4°C) y los sobrenadantes fueron utilizados en los ensayos de actividades de luciferasa y de β-galactosidasa.

		Concentración µg/µl	µg/well	µl/well
Tubo 1	Optimem			22,50
	Pei			2,1
A) Tubo 2	β-gal:	4,16	0,171	0,02
	Gal-4-Luc:	2,80	0,168	0,03
	DAF-Gal4:	3,95	1,477	0,19
	NaCl 0,15N			1,06
		Concentración µg/µl	µg/well	µl/well
B) Tubo2	β-gal:	4,16	0,171	0,02
	pDAF-12A1:	2,50	0,450	0,09
	LET-Luc:	0,005	0,00125	0,13
	NaCl 0,15N			1,06
		Concentración µg/µl	µg/well	µl/well
C) Tubo2	β-gal:	4,16	0,171	0,02
	pMINC10028:	0,515	0,450	0,44
	pMINC18013:	0,836	0,450	0,27
	LET-Luc:	0,005	0,00125	0,13
	NaCl 0,15N			1,06

Tabla 3. Composición de las mezclas de transfección utilizadas en los ensayos de genes reporteros. A y B) determinación de la actividad de los ligandos sintéticos al CeDAF-12. **C)** caracterización de la actividad de las 2 putativas proteínas homólogas a CeDAF-12 de *M.incognita*

Una vez transcurridos los 20 min se agitó suavemente la mezcla de transfección contenida en el tubo 1 y se agregaron 15 µl de la misma a cada pocillo (se mezcló suavemente con movimientos en cruz para homogenizar el contenido). Las placas se incubaron a 37°C durante 5 horas y posteriormente, se reemplazó el medio de las placas por medio DMEM fresco con antibióticos conteniendo 10 % de suero deslipidizado y se

agregaron los esteroides a estudiar en las concentraciones indicadas. Las células fueron incubadas en presencia de los mismos durante 18 h y el ensayo se detuvo aspirando el medio de cultivo. Las células se lavaron con PBS 1X y a cada pocillo se agregaron 200 μ l de buffer BBL frío. Las células se despegaron utilizando una espátula plástica y se transfirieron a tubos Eppendorf, las mismas se cosecharon por centrifugación (4 min X 8000 rpm a 4°C) y los sobrenadantes fueron utilizados en los ensayos de actividades de luciferasa y de β -galactosidasa.

4.2.7 Medición Actividad β -galactosidasa

En un tubo Falcon de 15 ml se preparó una mezcla que contiene 0,7 mg/ml de ONPG en Buffer Z a partir de una solución madre 4 mg/ml de ONPG. Se agregaron 130 μ l de esta mezcla y 20 μ l de las muestras a ensayar, por duplicado, en una placa multipocillos transparente. Las placas se incubaron a 37°C por 15min hasta que desarrolló el color amarillo. La reacción enzimática se detuvo agregando 60 μ l NaCO₃ 1M por pocillo y se midió la absorbancia a 415 nm.

4.2.8 Medición Actividad Luciferasa

La actividad luciferasa se midió agregando 15 μ l de luciferina (Promega®) a 40 μ l de la muestra y se determinó la intensidad de bioluminiscencia en un luminómetro GloMax Multi Detection System Promega para microplacas de 96 pocillos.

4.3 Métodos computacionales y análisis in silico para identificación de genes ortólogos de *Cedaf-12* en *M. incognita*

4.3.1 Identificación de receptores hormonales en el proteoma de *M. incognita*

Abad y colaboradores, analizaron el transcriptoma de *M. incognita* y encontraron un total de 20,365 proteínas (9). Se realizó la asignación por familias de proteínas para cada uno de los dominios presentes en ellas con el programa HMMER (68). Luego, fueron seleccionadas solo las que contienen un dominio de unión a ligando presentes en los RN (PF00104) y un dominio de dedos de zinc tipo C4 (PF00105).

4.3.2 Identificación de homólogos de CeDAF-12 en *M. incognita*

A partir de los receptores hormonales identificados en *M. incognita*, se procedió a la búsqueda de homólogos en el proteoma de *C. elegans* mediante el empleo del programa HHblits (69) de MPI Bioinformatic Toolkit (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/>) (70). Con el fin de asociar las proteínas predichas como homologas a DAF-12 con regiones del genoma de *M. incognita* se utilizó el programa tblastn sobre la biblioteca de *scaffolds* (CNS 2007-10), ambos disponibles en el sitio web del INRA (página web que brinda acceso a información sobre nematodos fitoparasitos entre los cuales podemos

encontrar: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne javanica*). (<http://meloidogyne.toulouse.inra.fr/blast/blast.html>).

4.3.3 Modelo de homología

El modelado por homología de las putativas proteínas homólogas se llevó a cabo con la herramienta HHpred del MPI Bioinformatic Toolkit, la cual combina una búsqueda de secuencias homologas con Hhblits (69) sobre bases de datos de estructuras con un modelado por homología con el programa MODELLER (71).

4.4 Ensayos de Actividad de los compuestos en plantas infectadas con *Meloidogyne*

4.4.1 Extracción de huevos de *Meloidogyne* y obtención del estadio J2 infectivo

En primera instancia, se recolectaron huevos a partir de raíces de zapallitos de verano infectados (*Cucurbita maxima*) que crecen en invernaderos ubicados en el campo experimental de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional del Litoral, ciudad de Esperanza, Provincia de Santa Fe, Argentina (Latitud 31° 26 '31' 'S y longitud 60° 56' 27 " O). Se realizaron exámenes microscópicos de luz del patrón perianal de los fitonematodos hembras de acuerdo con el procedimiento de Hartman & Sasser (56) y se confirmó la presencia exclusiva de *M. incognita*. Poblaciones de esta especie de fitonematodo fueron recogidas a partir de raíces de plantas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill (solanáceas) infectadas con el aislamiento original de *M. incognita* aisladas de las plantas de zapallitos de verano descritas anteriormente. Las plantas de tomate se cultivaron en una cámara invernadero en el Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales, Facultad de Agronomía de la UBA.

Las raíces de tomate con agallas que contenían masas de huevos maduros se lavaron suavemente con agua destilada para eliminar la tierra adherida. Posteriormente, mismas se enjuagaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5%, se agitaron durante 4 min para disolver la matriz gelatinosa. A partir de entonces, los huevos se lavaron tres veces en agua destilada en un tamiz de malla (26 mm), para luego ser filtrados nuevamente con un filtro de 22 mm. Los huevos se recuperan del filtro con agua destilada y para la obtención de J2 infectivos, mismos se incuban a 28°C hasta la emergencia del J2.

4.4.2 Ensayos de Eclosión de huevos de *Meloidogyne*

Se obtuvieron huevos como se indica en 4.4.1. Para evaluar el efecto que tienen los compuestos sobre la eclosión de los huevos, se incubaron 100 huevos en presencia de concentraciones crecientes de los esteroides a analizar (50, 100 y 200 µM) en DMSO al 0,2% o 0,2% DMSO solo como control en una placa P24 a 28 °C durante 96 h. Los

experimentos se realizaron por triplicado y el porcentaje de eclosión se calculó como $J2 / (J2 + \text{huevos}) \times 100$.

4.4.3 Ensayo de mortalidad de J2

Para evaluar el efecto que tienen los compuestos sobre la viabilidad de los J2 se incubaron 100 J2 en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos sintéticos a analizar (50, 100 y 200 μM) en DMSO al 0,2% o DMSO al 0,2% como control en una placa P96 a 28 ° C durante 48 h en un volumen final de 250 μl . La mortalidad de J2 se determinó agregando 5 μl de NaOH 1 N a la solución, y los J2s que cambiaron de forma recta a rizada o en forma de gancho dentro de 1 minuto se consideraron viables y si permanecen inmóviles se consideran muertos. Cada tratamiento se realizó por triplicado y los valores que se muestran en los gráficos son la media de dos réplicas biológicas diferentes.

4.4.4 Infección de plantas de tomate

Las semillas de tomate, *L. esculentum* se esterilizaron superficialmente con 0,1% de NaOCl durante 1 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se sembraron en placas de Petri que contenían agar al 8% en agua, (aproximadamente diez semillas por placa), y se incuban en una cámara de invernadero a 27 ° C por 7 días y ciclo 16 h luz/ 8 h oscuridad.

Las plántulas de tomate se transfirieron individualmente a un papel de filtro de 3 MM que posteriormente fue colocado en una bolsa de plástico de 10 x 20 cm, las cuales fueron dispuestas en posición vertical y fueron incubadas por 48 h a 27 ° C con ciclo 16 h luz/ 8 h oscuridad. Se distribuyeron 300 μl de los compuestos a ensayar en las concentraciones indicadas en cada caso en DMSO al 0,2% o 300 μl DMSO al 0,2% solo como control sobre las raíces de las plántulas de tomate. Luego de 24 h de incubación se infectaron con 100 μl de agua conteniendo 500 J2 o 100 μl de agua como control. Las plántulas se mantuvieron en una cámara de invernadero a 27 ° C con un ciclo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad durante 4 días más y luego se transfirieron a macetas que contenían una mezcla autoclavada (80:20) de arena y vermiculita. Las plantas se regaron dos veces a la semana con 5 ml de solución Hoagland (72), una solución nutritiva hidropónica, y día por medio, con agua destilada. Los experimentos se realizaron por triplicado y utilizando 10 plantas para cada tratamiento.

Después de 35 días de la infección las plantas se recuperaron, se lavaron las raíces con agua destilada y se contabilizaron las agallas por sistema radicular. Además, las raíces de las plantas de tomate fueron tratadas con Floxina B (0,15 g/ l) durante 30 min, el cual tiñe específicamente las masas de huevos permitiendo estimar el número de las mismas por sistema radicular. Para evaluar el estado general de la planta, se

analizaron diferentes parámetros de crecimiento, como la longitud de la raíz y el tallo, el peso fresco de la planta y el número de hojas.

Por otro lado, para evaluar el efecto del tratamiento de los compuestos sobre la eclosión de la progenie (los J2 nacidos a partir de huevos extraídos de los nódulos de las plantas tratadas) se incubaron en una placa P24 100 huevos obtenidos de nódulos de plantas de tomate infectadas tratadas 100 μM de los compuestos sintéticos a 28 °C durante 8 días. Al finalizar la incubación, se determinó el porcentaje de huevos eclosionados en cada pocillo

4.4.5 Ensayos de Migración con J2 tratados

Para analizar el efecto de los compuestos sintéticos sobre la migración de los fitonematodos se colocaron cinco raíces de tomate de 5 días de edad de 1,5 cm de longitud que presentaban con pocos pelos radiculares sobre un vidrio. Los gusanos se cosecharon como se indica en la sección 4.4.1 y los mismos fueron tratados con los compuestos 2 y 3 a 100 μM en DMSO al 0,02% o DMSO al 0,02% solo como control, por 1 h en un pocillo conteniendo 60 μl de agarosa al 0,1% a 20 °C. Se colocaron 40 J2 a una distancia de 2 mm de la punta de la raíz y se los dejó migrar durante 4 h. Las raíces se fotografiaron cada hora y se determinó el porcentaje de gusanos encontrados a una distancia menor que 0,5 mm de la misma. En este experimento, las imágenes se tomaron con una lupa binocular estereoscópica ZTX-E Numak con un aumento de 10X.

4.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.02 para Microsoft Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los valores de probabilidad de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4.5 Extracción de DNA plasmídico (miniprep)

Solución 1: glucosa 40 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM (pH 8,0). **Solución 2:** NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v). **Solución 3:** KAc 3M + HAc, pH 4,8. Mantener a 4 °C.

Se cosecharon las células de *E. coli* de 3 ml de cultivo líquido por centrifugación a 5000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 300 μl de Solución 1, y se agregaron 300 μl de Solución 2, se mezcló suavemente por inversión y los tubos se incubaron a temperatura ambiente por no más de 5 min. Luego se adicionaron 300 μl de Solución 3 a cada uno de los tubos y se mezclaron por inversión y se centrifugaron 15 min a 14.000 rpm. Se transfirieron los sobrenadantes a otros tubos Eppendorf, sin tomar la interfase formada y se precipitó el ADN agregando 0,6 ml de isopropanol, el cual se recuperó por centrifugación a 14.000 rpm. El precipitado se lavó

agregando 500 µl de etanol 70%, se dejó secar el precipitado de ADN a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de H₂O destilada. Los plásmidos se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000®, se analizaron mediante digestión con enzimas de restricción BamH1/Xho1 y por PCR con cebadores específicos como se muestra a continuación.

4.6 Amplificación por PCR de fragmentos diagnósticos para la identificación de los genes de *M. incognita*

Componente [Concentración final]	Volumen (ul)
Buffer 5x	10
dNTPS [10 mM]	2
MgCl ₂ [2 mM]	2
Taq Polimerasa	0,5
<i>Primer Forward</i> (10 µm)*	1
<i>Primer Reverse</i> (10 µm)	1
templado [1/10]	5
H ₂ O	csp 50ul

*Se probaron dos cebadores *forward*

MicFWD1: 5´ ATGGAAACATCAACCAAGGGTCGA 3´

MicFWD2: 5´ GGAACAGAAACCCTCCATATCG 3´

MicREV1: 5´ TTATTCCGTTCCAATAGTCGGTGC 3´

El ciclado de la PCR se realizó con gradientes de temperatura según se indica

Ciclo	Temperatura °C	Tiempo
1	98°	2 min
2 desnaturalización	94°	1 min
3 <i>annealing</i>	55°, 58°, 60°	30 seg
4 extensión	72°	1 min

5 (ciclo de 2 a 5) 30 veces	72°	10 min
6 terminación	4°	∞

Fragmento largo: MicFdw1- MicRev1: 1.800 pb

MicFdw2- MicRev1: 500 pb

Fragmento corto: MicFdw1- MicRev1: 1.600 pb

MicFdw2- MicRev1: 500 pb

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I

5. 1 Evaluación de la actividad biológica de los análogos sintéticos de los ácidos dafacrónicos en ensayos de genes reporteros e *in vivo*.

El laboratorio del Dr. Gerardo Burton es un laboratorio de química medicinal interesado en la síntesis de compuestos con actividad biológica. Previamente al inicio de esta tesis y como parte de mi tesina de maestría, pusimos a punto el diseño experimental necesario para la evaluación de la actividad biológica de una serie de análogos sintéticos de los AD utilizando ensayos de genes reporteros en células de mamífero e *in vivo* utilizando tanto gusanos salvajes como mutantes *daf-9(dh6)* de *C. elegans* incapaces de sintetizar endógenamente estos compuestos. Los resultados obtenidos contribuyeron a una publicación anterior de nuestro grupo (73). El objetivo central de este estudio fue evaluar la importancia de la longitud y la configuración de la cadena lateral de los AD en la unión al DAF-12. Los resultados encontrados más destacados fueron que la introducción de un doble enlace en la cadena lateral del Δ 4-AD denominado en esta tesis compuesto **1** le confiere actividad agonista fuerte, mientras que la reducción de la cadena lateral del carboxilo al correspondiente alcohol resultó en un compuesto denominado compuesto **2**, con actividad antagonista y casi desprovisto totalmente de actividad agonista. Por otro lado, el compuesto **2** produjo importantes retrasos en el desarrollo *in vivo* en la cepa salvaje de *C. elegans* aunque finalmente todos los nematodos se desarrollaron a adultos de menor tamaño.

Los resultados obtenidos llevaron a que el grupo del Dr. Burton sintetizara nuevos compuestos en los cuales se modula la acidez, la capacidad de formar puentes de hidrógeno, y la lipofilicidad del compuesto **2**. Según los resultados recientes de Zafrani y colaboradores, que han investigado las propiedades del grupo difluorometilo (CF₂H) como un posible bioisómero hidrofóbico o grupo químico sustituyente del hidroxilo (74) se hipotetizó que un análogo más lipofílico y menos ácido que el compuesto **2** resultaría ser un compuesto con mayor afinidad por el receptor. Es por esta razón, que al comenzar esta tesis en el laboratorio del Dr. Burton se sintetizó una nueva serie de compuestos esteroidales derivados del Δ 4-AD diseñados a partir de modificaciones en la cadena lateral C-24, suponiendo que, como se mencionó anteriormente, el reemplazo del oxígeno del hidroxilo, por un átomo de flúor, podría conferir una mayor afinidad de los compuestos por los receptores. Por otro lado, se sintetizó una epoxi-cetona (compuesto **5**) que a la luz de los resultados anteriores también podría presentar actividad antagonista (Fig.17).

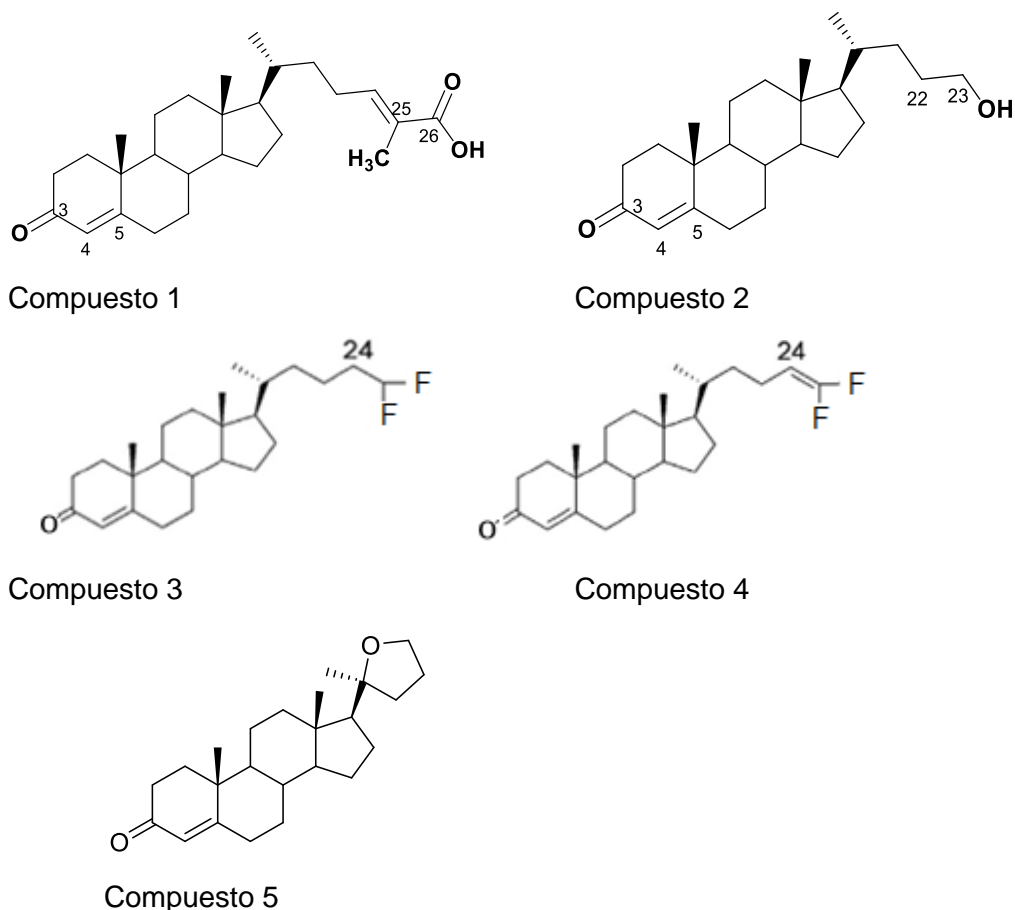


Figura 17. Estructuras de los análogos del $\Delta 4$ ácido dafacrónico. Los compuestos 1 y 2 previamente analizados con actividad agonista y antagonista respectivamente, los compuestos 3 y 4 oxisteroles fluorados y el compuesto 5 la epoxi-cetona (nomenclatura mencionada en la sección de Abreviaturas).

En esta tesis evaluamos la actividad de los dos análogos fluorados sintetizados, el compuesto 3 lleva el reemplazo bioisostérico del hidroxilo C-24 por un grupo difluorometilo, y el compuesto 4 que sólo conserva la capacidad de aceptor de enlace de hidrógeno incorporando un doble enlace en C-24 (25) que le confiere mayor rigidez (Fig. 17). Además, caracterizamos la epoxi-cetona denominada compuesto 5, la cual posteriormente sirvió como intermediario de la síntesis de análogos con puentes 20 β , 24-oximetileno. Como control y a fines comparativos utilizamos el compuesto 2 analizado previamente en el desarrollo de mi tesis de maestría. Comenzamos la caracterización de la actividad antagonista comenzando por los ensayos *in vivo*.

Ensayos *in vivo*

5.1.1 Los compuestos 3, 4 y 5 muestran actividad antagonista *in vivo*

Para analizar el efecto antagonista de los compuestos 3-5 *in vivo*, gusanos salvajes N2 se desarrollaron en presencia de concentraciones crecientes (1, 10 y 100 μ M) de dichos compuestos o etanol como control. Este ensayo mide la capacidad que

poseen los diferentes compuestos para interferir con la unión de los AD al DAF-12 reflejándose como un retraso en alcanzar las etapas larvales progresivas y la edad adulta de los gusanos tratados con respecto a los gusanos de control (34). El porcentaje de nematodos en cada uno de los estadios de desarrollo se determinó a intervalos de 24 h durante 3 días y se graficó el porcentaje de gusanos que se encontraban en la etapa de desarrollo más avanzada (Fig. 18, A, B y C).

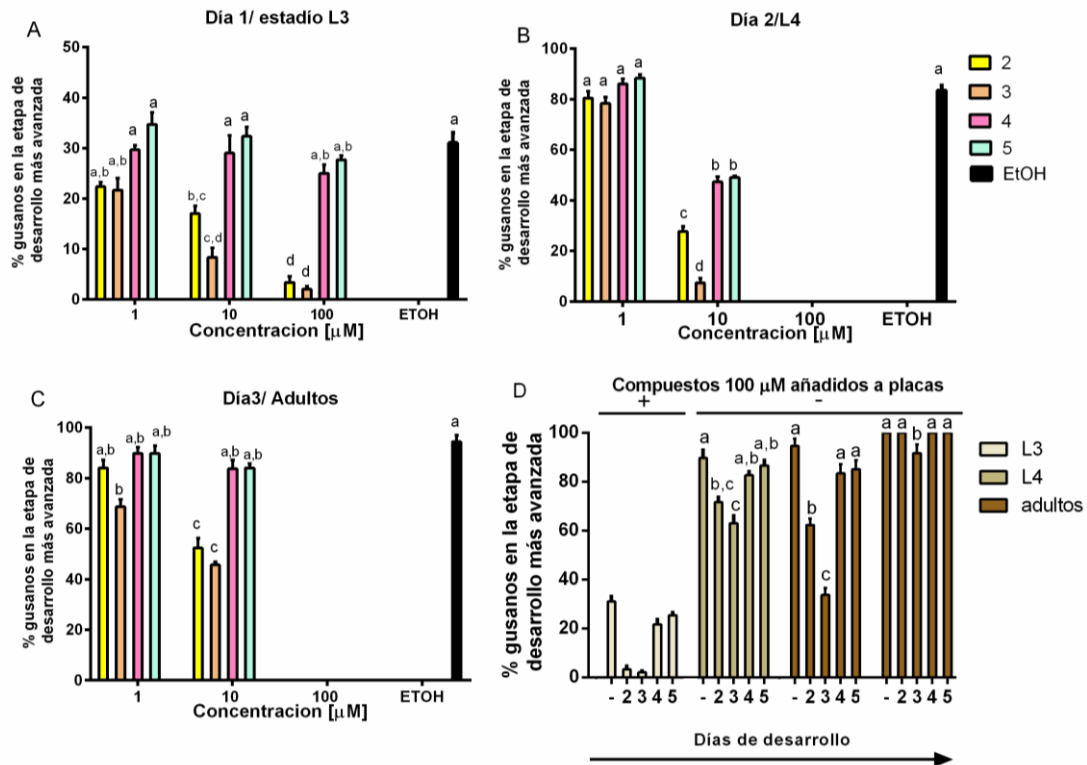


Figura 18: Los compuestos 2-5 muestran actividad antagonista en gusanos salvajes. *C. elegans* N2 fueron desarrollados en presencia de concentraciones crecientes (1, 10 y 100 μ M) de compuestos 2-5 o etanol como control. Se determinaron los porcentajes de gusanos en cada estadio de desarrollo (huevos, L1 / L2, L3, L4 y adultos) cada 24 h durante 3 días. Se muestra el porcentaje de gusanos en el estadio más avanzado de desarrollo para cada día, L3 para el día 1 (A), L4 para el día 2 (B), y adultos para el día 3 (C). Además, los gusanos N2 desarrollados por dos días en presencia de 100 μ M de los compuestos 2-5, se transfirieron a placas frescas en ausencia de los mismos (D). Los estudios se realizaron utilizando tres cohortes independientes (n=100) y los valores representan las medias de tres experimentos. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias (P <0.05).

El primer día, los gusanos desarrollados presencia de los compuestos 4 y 5, a 1, 10 y 100 μ M alcanzaron la etapa L3 en porcentajes similares a los gusanos en presencia de EtOH. Se observó un retraso más notable en los gusanos desarrollados en presencia de los compuestos 2 y 3, los cuales a una concentración de 1 μ M maduraron a la etapa L3 en un 22% mientras que solo un 17 y 8% de los gusanos que se desarrollaron en presencia de 10 μ M de los compuestos 2 y 3 progresaron a la misma etapa

respectivamente. Por otro lado, solo una pequeña cantidad (2%) de los crecidos en presencia de 100 μM de los compuestos **2** y **3** llegaron al mismo estadio.

Para el día 2, más del 80% de los gusanos control alcanzaron la etapa L4 y porcentajes similares de gusanos crecidos en presencia de 1 μM de los compuestos **2**, **3**, **4** y **5** también se desarrollaron en la misma etapa. El retraso en el desarrollo de los gusanos que crecieron en presencia de concentraciones a 10 μM de los compuestos **2**, **3**, **4** y **5** se hizo más evidente, solo el 28, 7, 47 y el 50% alcanzaron el estadio L4, respectivamente y ninguno de ellos se desarrolló en la etapa L4 a 100 μM .

Después de 3 días, solo el 67% de los gusanos desarrollados en presencia del compuesto **3** a 1 μM alcanzaron la edad adulta, mientras que 84, 90 y 95% de aquellos desarrollados en presencia de los compuestos **2**, **4** y **5** respectivamente y el 94% de los gusanos control progresaron al mismo estadio. A 10 μM , el porcentaje de gusanos que alcanzaron la edad adulta en presencia del compuesto **4** fue bastante similar al encontrado en 1 μM (84%), pero solo 52 y 46% de los gusanos desarrollados en presencia de los compuestos **2** y **3** a esta concentración se desarrollaron hasta adultos. Por otro lado, ninguno de los gusanos desarrollados en presencia de 100 μM de los compuestos **2-5** alcanzó el estadio de adulto. La mayoría de los gusanos de la placa de control se desarrollaron a hermafroditas y comenzaron a poner huevos, mientras que ninguno de los adultos cultivados en presencia de los compuestos lo hizo. Sin embargo, después de 5 días, todos los nematodos se convirtieron en hermafroditas grávidas lo que sugiere la falta de toxicidad de estos compuestos y que el retraso producido puede ser revertido cuando la concentración endógena de AD alcanza los valores más altos (200 nM) (34).

El número de gusanos desarrollados en presencia de los compuestos **2- 5** que alcanzaron la etapa más avanzada en cada concentración probada para cada uno de los compuestos se analizó usando la prueba de ANOVA. Este análisis mostró un retraso dependiente de la dosis en la maduración en estadios larvales progresivos para gusanos desarrollados en presencia de los compuestos **2- 5** (valor $P < 0, 05$). Posteriormente, se analizó la diferencia entre las medias de los gusanos que maduraron a la etapa más avanzada para cada concentración de los compuestos estudiados utilizando la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número de gusanos que alcanzaron la etapa L4 o maduraron a los adultos en los gusanos control y los desarrollados en presencia de 10 y 100 μM de los compuestos **2** y **3** en el día 2 ($p < 0.05$). El mismo análisis mostró que no había diferencias significativas con los desarrollados en presencia del compuesto **4** y **5** en ninguna de las concentraciones ensayadas para todos los días de desarrollo. Con estos resultados podemos afirmar que el compuesto **3** presenta mayor actividad antagonista que el

compuesto **2**, y ambos compuestos a su vez presentan mayor actividad que los compuestos **4** y **5**. Además, los gusanos desarrollados en presencia de estos compuestos a 100 μM (la concentración más alta probada) se transfirieron a placas frescas sin ningún compuesto añadido durante 2 días y en el día 5 más del 90% de los gusanos alcanzaron la adultez y se convirtieron en hermafroditas fértiles, lo que refuerza el concepto mencionado anteriormente de la ausencia de toxicidad de estos compuestos.

Para comprobar que efectivamente el blanco donde se une el compuesto **3** es el mismo al que se unen lo AD al DAF-12, y que el efecto observado se debe a esa unión, se realizó un ensayo, en el cual se desarrollaron los gusanos en presencia del compuesto **3** a 100 μM y de concentraciones crecientes de un agonista fuerte ya caracterizado (compuesto **1**). (Fig.19).

En el panel A se muestran los porcentajes de gusanos en cada estadio de desarrollo en presencia del compuesto **3** durante 4 días, y en los paneles B, C y D en presencia del compuesto **3** y cantidades crecientes del compuesto **1**. A fines comparativos se muestran en el panel E los resultados correspondientes a los gusanos crecidos en presencia del compuesto **2** (antagonista fuerte), y en el panel F en ausencia de ligandos agregados. El primer día todos los gusanos desarrollados en presencia de todos los compuestos permanecieron en el estadio L1-L2. A partir del segundo día, mientras que todos los gusanos crecidos en las placas con los compuestos **2** y **3** aún permanecían en el estadio L1-L2, ya se observan diferencias entre los gusanos crecidos en las placas del compuesto **3** más concentraciones crecientes del compuesto **1**, encontrándose un 25% de L3 a 1 μM , un 28% a 10 μM y un 52% con 100 μM respectivamente. Para el día 3, en la placa que contenía 1 μM de compuesto **1**, un 47% de gusanos se encontraban en la etapa adulta, a 10 μM un 52% eran adultos y a 100 μM ya un 24% se convirtieron en hermafroditas, en tanto que los gusanos crecidos en las placas con los compuestos **2** y **3** alcanzaron apenas un 10 y 7% de adultos. Al día 4 presentan un retraso muy similar entre estos dos compuestos llegando a tener un 30% de gusanos hermafroditas en el compuesto **3** y un 40% en el compuesto **2**, mientras que el control alcanzó el 100% e inclusive desde el día 3 presentaba gusanos hermafroditas. Este retraso con los compuestos **3** y **2** ya se habían observado anteriormente, y fueron utilizados como control. En las placas de compuesto **3** más agregado del compuesto **1** a 1 μM el 42% de los gusanos desarrollados llegaron a hermafroditas, mientras que el 52 y 55% de aquellos desarrollados a 10 y 100 μM respectivamente progresaron al mismo estadio.

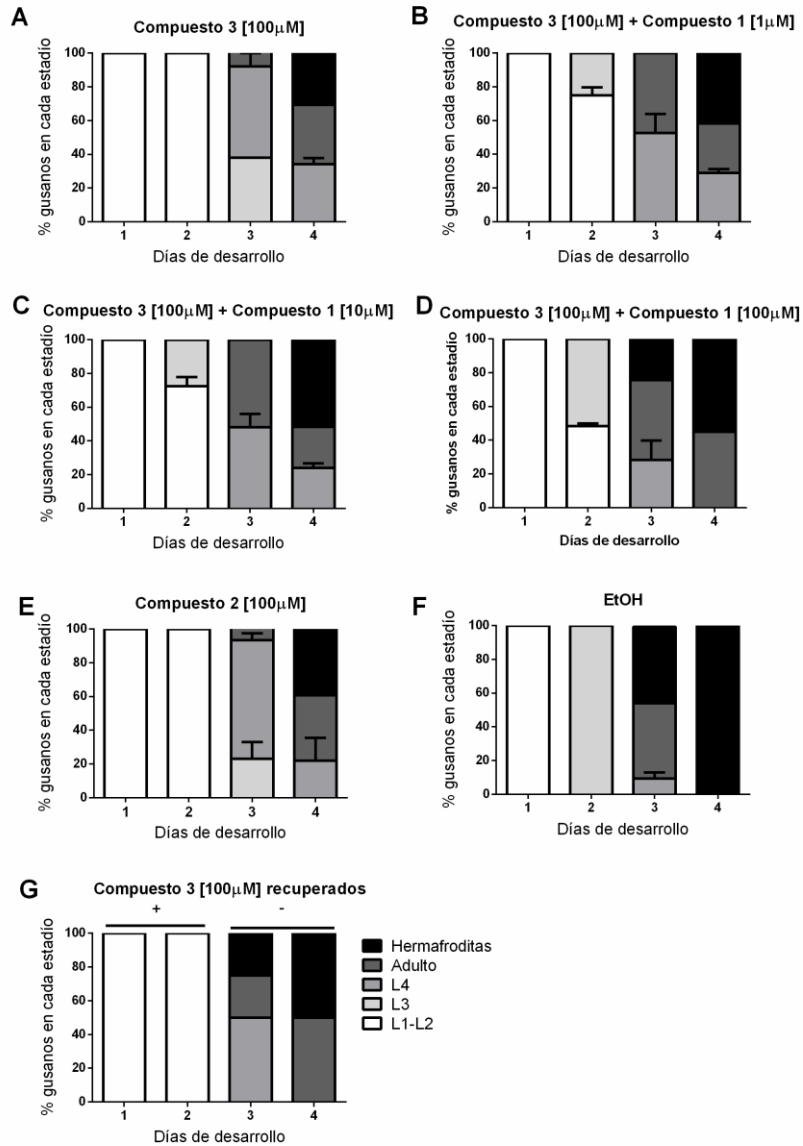


Figura 19. El compuesto 3 se une al receptor DAF-12. *C. elegans* salvajes fueron desarrollados en presencia de 100 μ M de compuestos en las concentraciones indicadas o etanol como control. Se determinaron los porcentajes de gusanos en cada etapa de desarrollo (huevos, L1 / L2, L3, L4 y adultos) cada 24 h durante 4 días. Se muestra el porcentaje de gusanos en cada estadio para cada día. Compuesto 3 (A), compuesto 3 en competencia con concentraciones crecientes del compuesto 1 (B, C, D). Además, los gusanos N2 se desarrollaron en presencia de 100 μ M del compuesto 2 un antagonista control (E), y etanol (F). El panel G muestra los gusanos crecidos durante dos días en el compuesto 3 a 100 μ M y luego se transfirieron a placas frescas en ausencia del mismo. Los estudios se realizaron utilizando tres cohortes independientes ($n = 100$) y los valores obtenidos son las medias de tres experimentos. Las barras de error representan desviaciones estándar.

En el panel G observamos que la totalidad de los gusanos crecidos en la placa con el compuesto 3 permanecieron retrasados en el estadio L1-L2 durante los dos primeros días, posterior a esto se los transfirió a una placa sin compuesto y los mismos comenzaron a recuperarse y avanzaron a estadios sucesivos de desarrollo hasta convertirse en hermafroditas grávidas y poner huevos desde el día 4. Se observó que el

retraso observado en el desarrollo de los gusanos en presencia del compuesto **3** a 100 μM y concentraciones crecientes del compuesto agonista **1** fue cada vez menor. Estos resultados sugieren que ambos compuestos compiten por el mismo sitio de unión.

Con la evidencia obtenida en ensayos *in vivo*, decidimos estudiar la actividad de los compuestos mediante ensayos de transactivación de genes reporteros en células de mamífero. La base de dicho análisis consiste en transfectar células de mamífero con un plásmido que exprese el RN que se desea estudiar y un plásmido que codifique un gen reportero bajo el control de un promotor que contenga los elementos de respuesta de dicho RN. Este ensayo permite cuantificar la unión de un determinado ligando sobre un RN particular. La eficiencia del proceso de transfección se controla introduciendo además un plásmido que codifica β -galactosidasa.

Ensayos de genes reporteros en células de mamífero

5.1.2 El compuesto 3 presenta actividad antagonista en ensayos de genes reporteros (En colaboración con la Dra. Virginia Dansey).

La actividad antagonista de los compuestos **3** y **4** se evaluó utilizando los plásmidos pGal4-DAF-12LBD y pGal4-luc en células HEK293T tal como lo indica la sección 4.2.6 de materiales y métodos (Fig. 20).

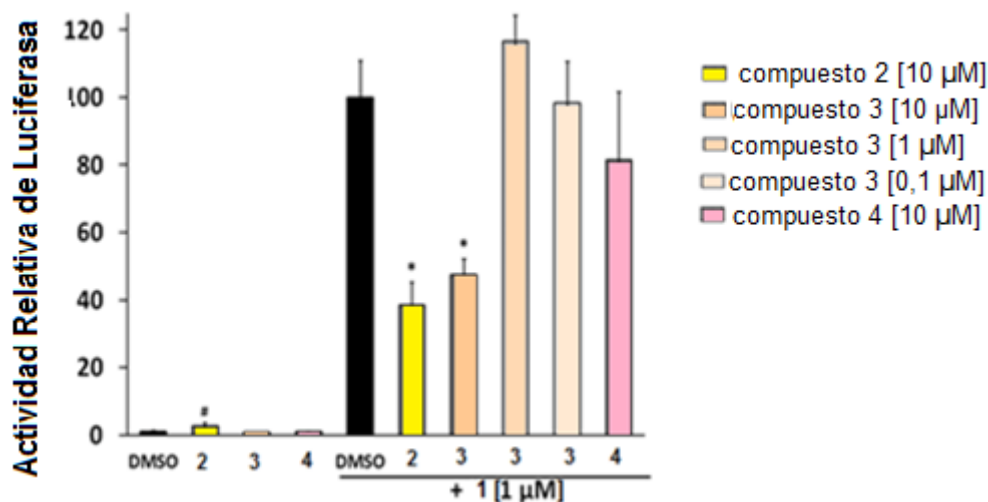


Figura 20: Los compuestos 2-4 presentan actividad antagonista en ensayos de genes reporteros. Células HEK-293T se co-transfectaron con el reportero pGal4-luc y el vector de expresión pGal4-DAF-12LBD. Las células se trataron con los compuestos **2-4**, a las concentraciones indicadas en ausencia o presencia de 1 μM del compuesto **1**. Las veces de inducción de luciferasa se expresa en relación a 1 μM del compuesto **1** utilizado como control (100%). Los resultados son las medias \pm SEM (n = 4). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de un factor seguido de la prueba de Dunnett. # significa diferencias significativas ($p < 0,05$) frente a DMSO y * significa diferencias significativas ($p < 0,05$) frente a DMSO + compuesto **2** a 1 μM .

La figura 20 muestra que a 10 μM , los análogos de difluoro **3** y **4** no inducen la expresión de luciferasa, mientras que el compuesto **2** muestra una actividad agonista baja pero estadísticamente significativa. Luego, se evaluó el efecto antagonista de los compuestos **3** y **4** en presencia del agonista puro **1** y con fines comparativos se evaluó el compuesto **2**. Las células se incubaron en presencia de 1 μM del compuesto **1** y de concentraciones crecientes del compuesto **3** por un lado y a 10 μM de los compuestos **2** y **4**. Además se puede observar que a 10 μM el análogo de difluorometilo **3** disminuyó significativamente la actividad luciferasa, mientras que el compuesto **4** solo mostró una tendencia al comportamiento antagonista a 10 μM , que no fue estadísticamente significativo. La actividad antagonista del compuesto **3** fue similar a la observada para el compuesto **2** a la misma concentración, por lo que el reemplazo bioisotérico no produjo cambio en el perfil de actividad ni en la potencia.

Las simulaciones de dinámica molecular del complejo DAF-12/compuesto **2** que se presentan en el trabajo publicado por nuestro grupo y el del Dr. Burton han demostrado que se establece un fuerte enlace de hidrógeno entre el 24-hidroxilo del compuesto **2** y la Thr613; la falta de un donante de enlace de hidrógeno capaz de esa interacción en la cadena lateral del compuesto **4**, explicaría la mayor pérdida de actividad antagonista (75).

Una particularidad de los receptores DAF-12 es la baja afinidad que presentan por sus ligandos, con la concentración efectiva cincuenta (CE_{50}) generalmente en el rango micromolar. Un factor que contribuye desfavorablemente a la afinidad de los ligandos esteroideos, es la alta flexibilidad de la cadena lateral de los derivados oxidados del colesterol que genera una contribución entrópica desfavorable cuando el ligando es inmovilizado dentro del receptor. Teniendo en cuenta que la disminución de los grados de libertad rotacional de esta cadena debería incrementar la afinidad de los ligandos por el receptor, el grupo del Dr. Burton sintetizó oxiesteroles análogos de los ligandos naturales, que presenten una menor flexibilidad de la cadena lateral e incorporen modificaciones en su orientación (Fig. 21). Para lograr estas modificaciones se introdujeron ciclos adicionales mediante puentes entre átomos seleccionados de la cadena lateral y del núcleo esteroideo, fijando de esta manera conformaciones específicas. La estrecha relación estructural entre los AD, ligandos de los receptores DAF-12, les permitió plantear análogos basados en las cadenas laterales de esos ligandos y un diseño común de secuencias de síntesis para ambos receptores, con la finalidad de evaluar si la curvatura opuesta, adquirida por esos ligandos en el bolsillo de unión al ligando, era un requisito para la unión a los respectivos receptores. Aquí entonces aportamos con la caracterización mediante la evaluación de la actividad biológica en *C. elegans* y en células de mamífero.

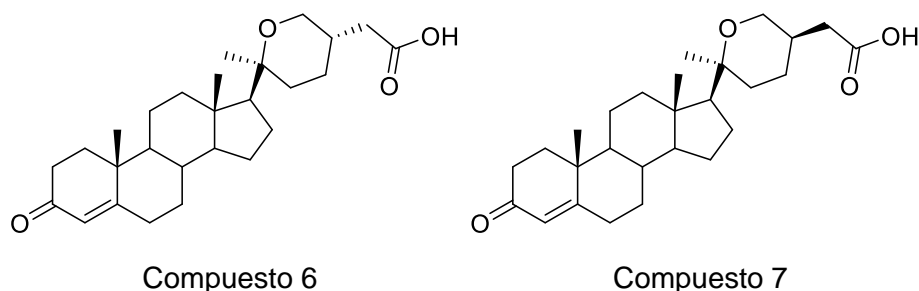


Figura 21. Estructuras de los análogos con puentes 20β,24-oximetileno.

Para la síntesis de la cadena lateral de un compuesto esteroidal se puede partir de un precursor que ya contenga una cadena lateral con el número de carbonos necesarios que solo requiere modificaciones funcionales, o de precursores con cadena lateral más corta o sin ella, mediante la formación de nuevos enlaces carbono-carbono. Dependiendo del centro en el que se planea comenzar la elongación de la cadena carbonada se han desarrollado diversas estrategias sintéticas con el objetivo de optimizar la síntesis, la usada para la obtención de los compuestos **6** y **7** fue la oxidación de los dioles en la posición 24. A continuación su caracterización *in vivo* y en células de mamífero.

Ensayos *in vivo*

5.1.3 El compuesto **6** es un agonista fuerte capaz de rescatar el fenotipo Daf-c del alelo nulo *daf-9*

Siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 4.1.6 de materiales y métodos, se realizó el ensayo de recuperación de la cepa de fenotipo Daf-c (Fig. 22).

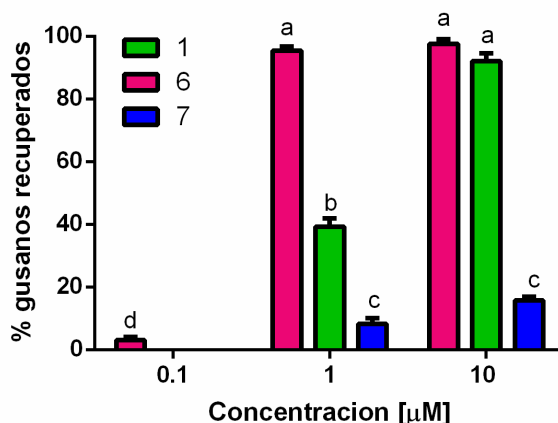


Figura 22. El compuesto **6 promueve la recuperación de gusanos mutantes** Nematodos *daf-9(dh6)* fueron cultivados en presencia de las concentraciones indicadas de los compuestos sintéticos **6**, **7** y **1** como control. Se determinó el porcentaje de recuperación mediante la sensibilidad al tratamiento con SDS al 1% después de 8 días de haber permanecido en las placas con los compuestos. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0.05$).

La Fig. 22 muestra que el compuesto **1** promovió la recuperación de un porcentaje significativo de nematodos *daf-9(dh6)*, el 39 y 92% a una concentración de 1 y 10 μM respectivamente. Por otro lado, el compuesto sintético **7**, que tiene su ciclo hexano con conformación de bote torcido, lo cual lo vuelve inestable, también fue capaz de rescatar el fenotipo, aunque en menor medida que el ligando sintético **1** utilizado como control, tan solo un 8 y 16% de recuperación se observó para 1 y 10 μM respectivamente.

Para nuestro asombro, el compuesto **6**, que tiene el ciclohexano en conformación de silla y el esteroide en la zona ecuatorial, lo que le confiere mayor estabilidad, presentó actividad agonista fuerte, incluso mayor a la del **1**, rescatando el fenotipo *dauer* inclusive a 0,1 μM , en un 95 y 98% para 1 y 10 μM respectivamente. Para evaluar la toxicidad de estos compuestos sintéticos, se cultivaron gusanos salvajes N2 en presencia de 10 μM de los compuestos y etanol como control. No se encontraron diferencias significativas en el desarrollo entre los gusanos tratados y el control, indicando la ausencia de toxicidad de los compuestos.

Para comparar en forma más detallada la actividad agonista de estos compuestos, se crecieron los nematodos *daf-9(dh6)* crecidos en presencia de 10 μM de los compuestos sintéticos **1**, **6** y **7** se incluyeron gusanos N2 incubados en ausencia de cualquier compuesto agregado como control (Fig. 22).

En la Fig. 23 observa que a partir del segundo día los nematodos *daf-9(dh6)* crecidos en presencia de 10 μM de nematodos comenzaron a abandonar el estadio de diapausa *dauer*, mostrando los primeros signos de recuperación (movimiento de la faringe y aumento de tamaño), a excepción de los gusanos crecidos en la placa con el compuesto **7** los cuales permanecían en L1-L2-L3 *dauer*. Los gusanos crecidos en las placas con el compuesto **1** utilizado como control (agonista fuerte), presentaban un 57% de larvas en estadio L3 al día 2, mientras que los gusanos crecidos en las placas con el compuesto **6** se desarrollaron hasta el estadio L4 en un 24% y los gusanos salvajes crecidos en las placas sin compuestos habían desarrollado un 18% de L4 para el mismo día. En el día 3, tanto los gusanos crecidos en el compuesto **6** como en el compuesto **1** se habían desarrollado hasta la etapa adulta en un 21 y 47% respectivamente, los gusanos salvajes ya presentaban un 54% de hembras hermafroditas y los gusanos crecidos en el compuesto **7** solamente llegaron al estadio L3 en un 62%. Para el día 4, mientras que el 45% de los gusanos crecidos en presencia del compuesto **6** alcanzaron el estadio de hembra hermafrodita, los desarrollados en presencia del compuesto **1** presentaron un 28% y con el compuesto **7** apenas un 2% llegaron al estadio L4. Los gusanos salvajes N2 en este día ya presentaban un 100% de hermafroditas grávidas. Dos días después, todos los gusanos desarrollados en presencia de **6** y **1** eran

hermafroditas, en tanto que solo un 72% de gusanos crecidos con el compuesto 7 alcanzaron la etapa L4.

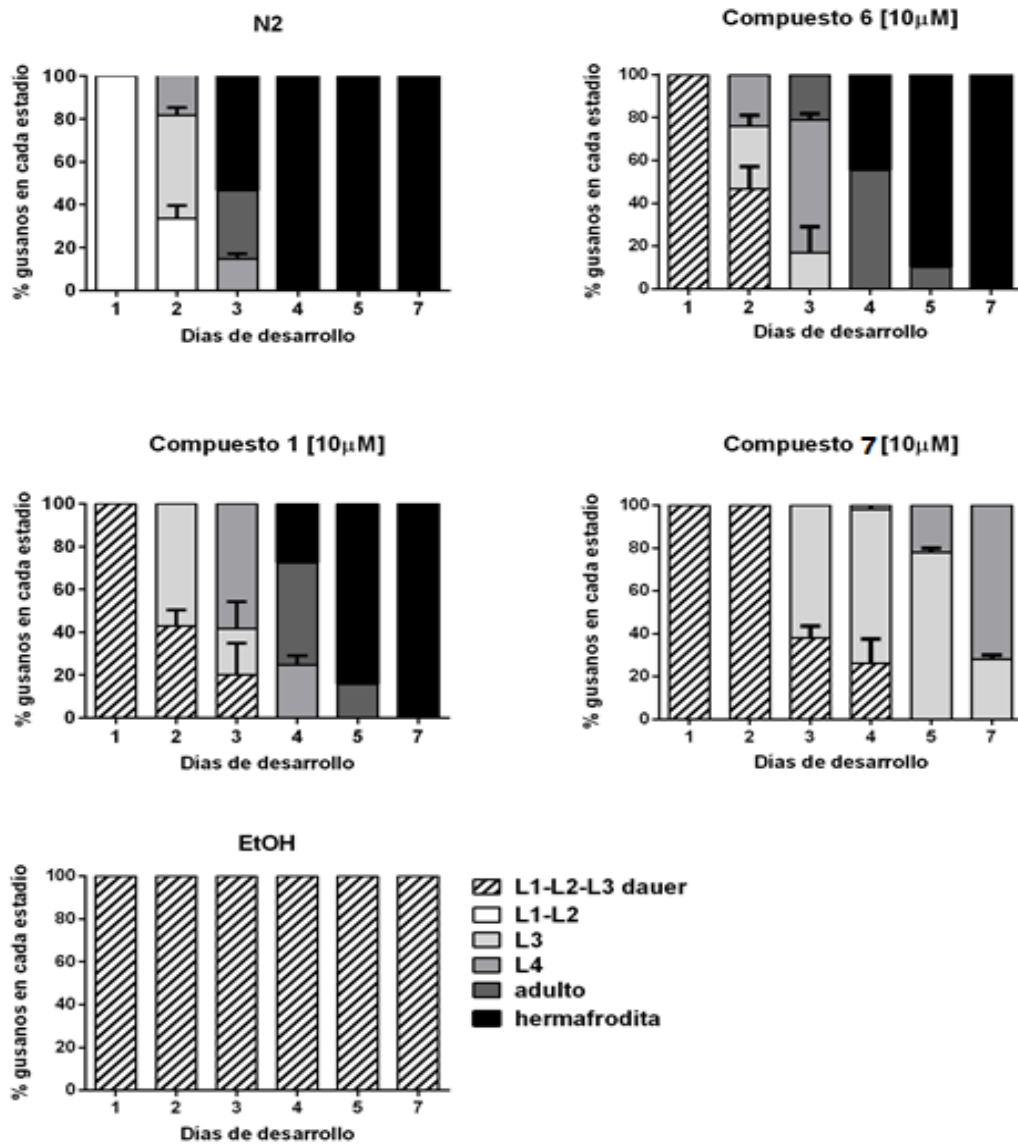


Figura 23. Nematodos *daf-9(dh6)* crecidos en presencia del compuesto 6 alcanzan los estadios progresivos de desarrollo simultáneamente con los gusanos salvajes. Los gusanos *daf-9(dh6)* se desarrollaron en presencia de 10 µM de los compuestos mencionados y etanol como control. Los gusanos N2 se cultivaron en ausencia de compuestos. Se analizaron los estadios de desarrollo en los que se encontraban los nematodos a intervalos de tiempo regulares (24 y 48 h) y se determinó el porcentaje de gusanos en cada etapa. Los estudios se realizaron utilizando 3 cohortes independientes (n = 200) y los resultados representan las medias para los 3 experimentos. Las barras representan las desviaciones estándar.

Estos resultados indican que los compuestos 6 y 1 se comportaron como agonistas *in vivo* y permitieron la expresión de genes blanco de DAF-12 involucrados en los programas de desarrollo que gobiernan tanto las transiciones de los diferentes estadios larvales de L4 a adultos como el desarrollo a hembras hermafroditas, mientras

que el compuesto **7** se comportó como un agonista que solo fue capaz de promover la transición a la etapa L4 de aproximadamente el 80% de los gusanos.

La determinación de los diferentes parámetros fue realizada mediante fotografías tomadas a cada gusano (n=> 60) las cuales fueron posteriormente procesadas utilizando el programa Image J® (Tabla 4)

Cepa	Compuesto	Área (µm) ²	Significancia área	Perímetro (µm)	Significancia perí	Longitud (µm)	Significancia longitud	Estadio más avanzado	Recuperados %
N2	EtOH	97742		2.871,89		1.143,95		hermafrodita	100
daf-9 (dh6)	6	97080	****	2.271,24	***	1.135,62	****	hermafrodita	100
	1	95020	****	1.954,14	***	977,07	****	hermafrodita	100
	7	55890	****	1.730,64	***	865,32	****	adulto joven	70
	EtOH	24653		924,74		462,37		L2d	0

Tabla 4. Dimensiones de gusanos recuperados en presencia de los compuestos 6 y 7. Se muestran los valores promedio del área, perímetro y longitud de 20 gusanos, el estadio más avanzado que alcanzan y el % de recuperados. La significancia estadística se realizó mediante un ANOVA con el test de múltiple comparación de Dunnett tomando como control EtOH *daf-9(dh6)*. ****=muy significativo, ***= significativo, n.s.= no significativo.

Estos resultados muestran que los gusanos recuperados en presencia de los compuestos **1** y **6** alcanzaron el estadio hermafrodita, sin embargo, ninguno de ellos alcanzó el tamaño de los gusanos salvajes. Los desarrollados en presencia del compuesto **6** presentaron un tamaño en promedio 16 % mayor que los crecidos en presencia del compuesto **1** (control). Los gusanos desarrollados en presencia del compuesto **7** resultaron en promedio un 30% menor que los desarrollados en presencia del compuesto **1**, alcanzando solamente el estadio L4.

La Fig. 24 muestra imágenes de los gusanos recuperados crecidos en presencia de los compuestos sintéticos **6** y **7** y como control el compuesto **1**.

Además, los gusanos recuperados presentaron un desarrollo notable en la zona de la vulva de la hembra hermafrodita (fenotipo de “vulva protruyente”) recuperada al ser tratada con el compuesto **6** (Fig. 25 A), así como también la apertura de la boca y movimiento faríngeo en los gusanos tratados con el compuesto **6** y **7** como señal de recuperación del estadio *dauer*, en donde las larvas mantienen sellada su boca por un tapón de glicano para resistir a las condiciones extremas de hambruna (Fig. 25 B).

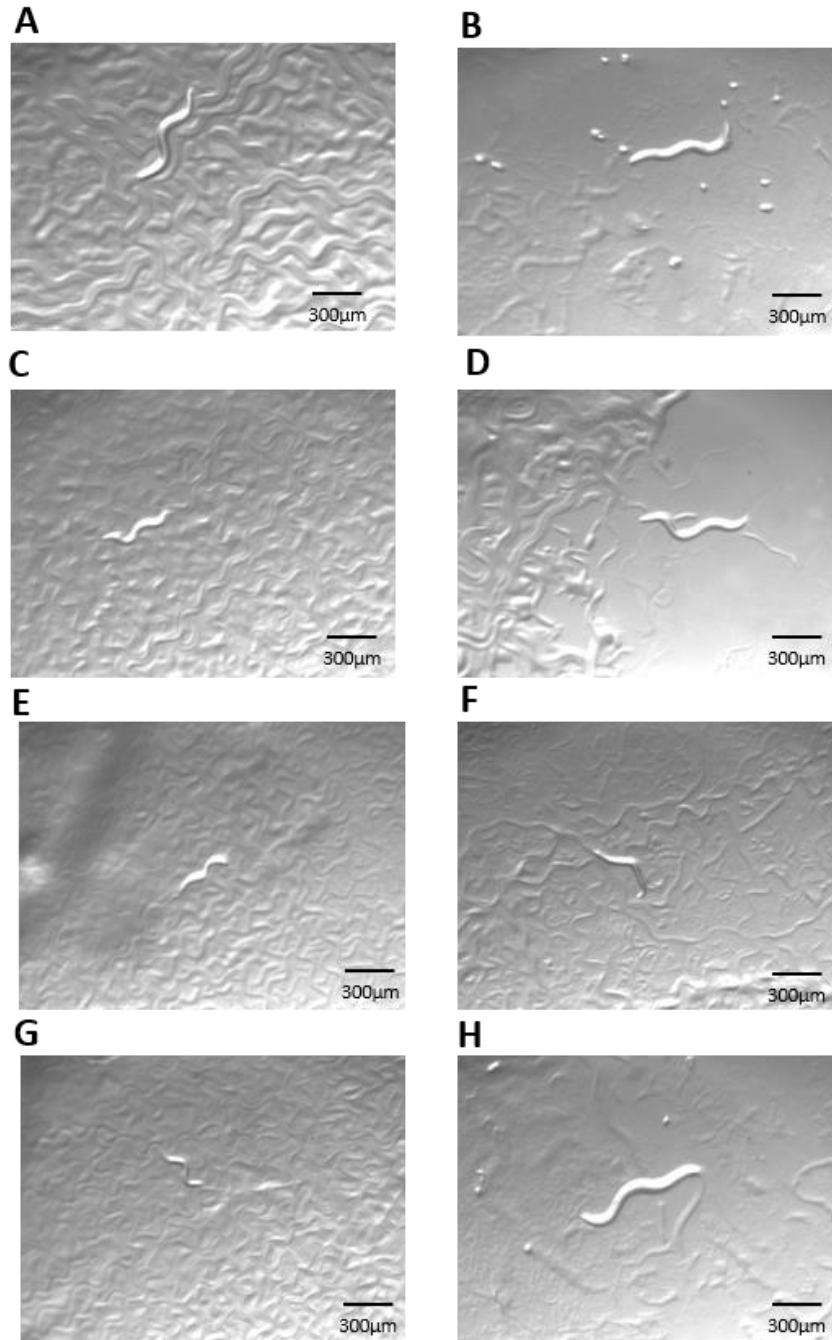


Figura 24. Recuperación de nematodos *daf-9* (dh6) al día 3 y 5. Los gusanos se desarrollaron en presencia de 10 µM de los respectivos compuestos. **A y B)** compuesto **6** a los días 3 y 5 respectivamente. **C y D)** compuesto **1** al día 3 a los mismos días que el panel anterior. **E y F)** compuesto **7** al igual número de días y como control en **G)** se muestra la cepa *daf-9* (dh6) y en **H)** gusanos N2 salvajes en etanol. Las fotografías muestran los gusanos más representativos de un n=60.

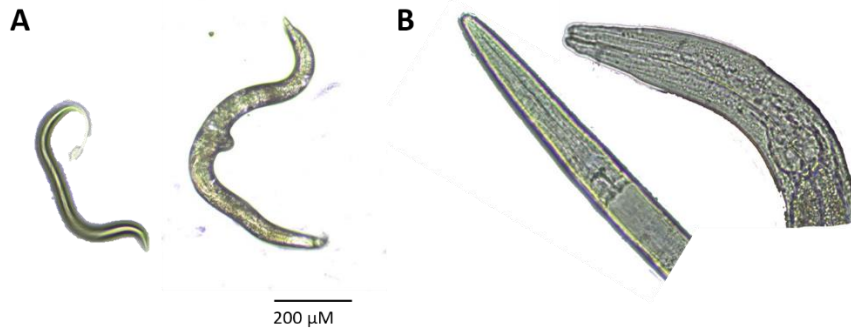


Figura 25. Los nematodos crecidos en presencia del compuesto 6 presentan señales importantes de recuperación. A) a la izquierda se muestra un gusano *daf-9(dh6)* tratado con EtOH sin señales evidentes de recuperación. A la derecha se muestra un gusano tratado con el compuesto 6 con importante desarrollo de la zona vulvar (vulva protruyente) y tamaño equivalente a una hembra hermafrodita. **B)** a la izquierda se muestra una foto de la boca sellada correspondiente al gusano mutante tratado con EtOH, mientras que a la derecha se observa la apertura de la boca y el movimiento de faringe en gusanos recuperados al ser tratados con los compuestos 6 y 7. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento 40X en el Microscopio Motic BA-210.

Además de gobernar los cambios de estadios en el gusano, DAF-12 también regula el metabolismo de lípidos y la longevidad (32). Por esta razón decidimos estudiar el efecto del compuesto que mostró mayor actividad agonista (compuesto 6) sobre la fertilidad y la supervivencia como se muestran a continuación.

5.1.4 Gusanos salvajes crecidos en presencia del compuesto 6 pusieron un número de huevos mayor que el control

Para analizar el efecto del compuesto 6 con potente actividad agonista sobre la fertilidad, se realizó un ensayo en el que se evaluó la puesta de huevos (Fig. 26).

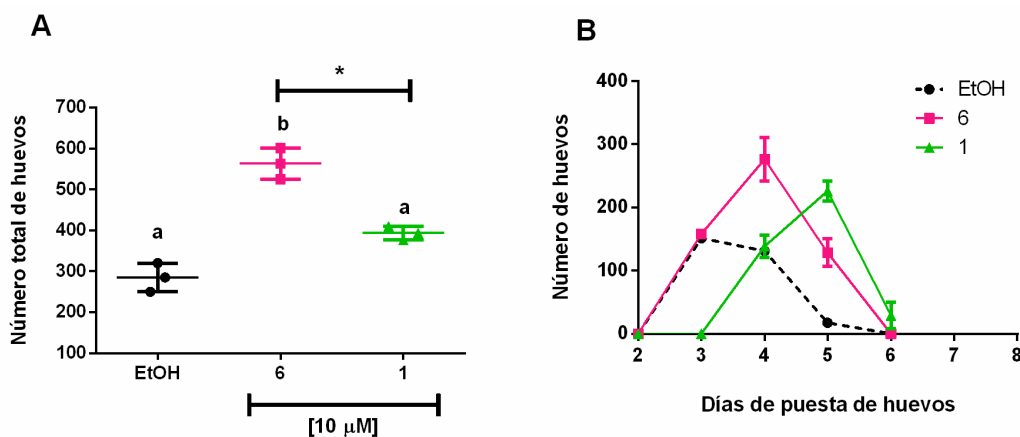


Figura 26. El compuesto 6 aumenta la fertilidad en la cepa salvaje de *C. elegans*. Gusanos salvajes fueron crecidos en presencia de 10 µM del compuesto 6 y 1 o en ausencia de compuestos (EtOH) por 8 días y se determinó la cantidad de huevos puestos cada 24 h (n = 20). **(A)** Se grafica el número total huevos puestos/ hermafrodita. Las barras de error indican SEM. Los datos fueron analizados utilizando el test de Tukey y letras distintas indican diferencias significativas. El asterisco indica una diferencia significativa (p=0.03 por la prueba t de Student). **(B)** Se determinó el número de huevos puestos en función del tiempo El día 2 representa el segundo día en el estadio hermafrodita y se muestra la media de 3 experimentos.

Se observó que el número total de huevos producidos aumentó significativamente en las hermafroditas que fueron tratadas con el compuesto **6** las cuales pusieron un promedio de 563 huevos, un 97% más que la cepa control que puso 285 huevos. Por otro lado, en presencia del compuesto **1**, los gusanos pusieron 394 huevos, es decir un 38% más que los gusanos control. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el test de Tukey encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el número de huevos puestos en presencia del compuesto **6** (** $p = 0.0222$) y el control, pero no así entre el número de huevos puestos en presencia compuesto **1** y el control. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los compuestos **6** y **1** determinada mediante la prueba t de Student $p < 0,05$ obteniéndose (* $p = 0,0328$) (Fig. 26A). Se determinó, además la distribución de la puesta de huevos en función del tiempo (Fig. 26B) y se observó que los gusanos crecidos en presencia de los compuesto **6** y los gusanos control comenzaron a poner huevos el día 3 y finalizaron el día 5, mientras que los tratados con el compuesto **1** lo hicieron desde el día 4 hasta el día 6. Los resultados obtenidos en este experimento muestran que los gusanos tratados con el compuesto **6** pusieron un mayor número de huevos que los gusanos control y si bien los gusanos crecidos en presencia del compuesto **1** pusieron un número mayor de huevos que el control, no fue estadísticamente significativo y por otro lado comenzó a hacerlo 24 h después.

A fin de completar el análisis del efecto de los compuestos **1** y **6** sobre los gusanos realizamos curvas de supervivencia utilizando 60 gusanos salvajes crecidos en presencia de 10 μM de los compuestos **1** y **6** desde huevos a 23°C (Fig. 27).

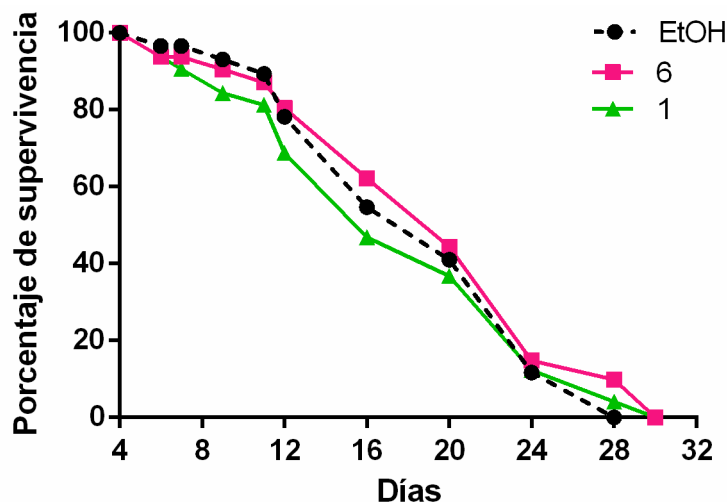


Figura 27. Efecto de los compuestos 1 y 6 sobre la expectativa de vida La curva de supervivencia se realizó utilizando 60 huevos de gusanos salvajes, los gusanos fueron transferidos a placas frescas con compuestos cada 72 h y se determinó el porcentaje de gusanos vivos cada 24 h por 30 días El análisis de supervivencia se realizó utilizando el test estadístico de Log-rank (Mantel-Cox) con un valor de $P=0,7076$. El análisis se realizó con 3 cohortes independientes con una $n > 60$ gusanos.

Los resultados mostraron que la esperanza de vida media para los gusanos crecidos en el compuesto **1** a [10 μM] fue de 16 días y tanto para los gusanos crecidos en presencia del compuesto **6** a la misma concentración y los crecidos en EtOH fue de 20 días. Los gusanos crecidos con el compuesto **1** presentaron una disminución de un 25% en la esperanza de vida media respecto del control. El análisis estadístico realizado con el test Log-rank (Mantel-Cox) mostró que no existen diferencias significativas entre las curvas realizadas en presencia de los 3 compuestos ($p=0,7076$).

Ensayos de genes reporteros

5.1.5 El compuesto 6 presenta actividad agonista fuerte en ensayos de genes reporteros (en colaboración con la Dra. Celeste del Fueyo)

La actividad agonista/ antagonista de los compuestos **6** y **7** se evaluó utilizando el plásmido pGal4-DAF-12LBD y el plásmido reportero pGal4-luc en células HEK293T tal como lo indica la sección 4.2.6 de materiales y métodos. Las células fueron tratadas con 10 μM de los compuestos **6** y **7** durante 16 h y como control positivo se realizó el ensayo en presencia del compuesto agonista **1** (Fig. 28).

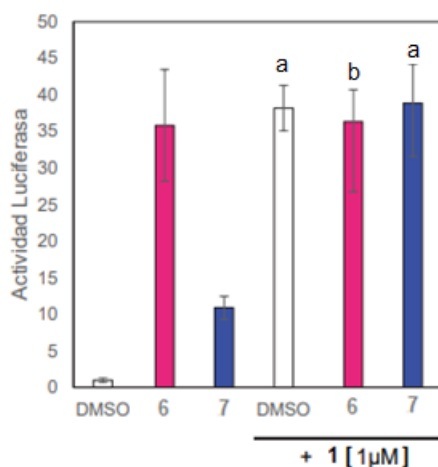


Figura 28. Los compuestos 6 y 7 presentan actividad agonista en ensayos de genes reporteros. Células HEK-293T se co-transfectaron con el reportero pGal4-luc y el vector de expresión pGal4-DAF-12LBD. Después las células se trataron con los compuestos **6** y **7**, a 10 μM en ausencia o presencia de 1 μM del compuesto **1**. La actividad relativa de luciferasa se expresa en relación a 1 μM del compuesto **1** (100%). Los resultados son las medias \pm SEM ($n = 3$). La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de un factor seguido de la prueba de Tukey, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0.05$).

En la figura 28 se muestran los gráficos de actividad de la luciferasa para los compuestos **6** y **7**, los cuales presentan actividad agonista, siendo el primero considerablemente más activo. Para evaluar la posible capacidad antagonista de los compuestos, se llevaron a cabo incubaciones con el agregado simultáneo del

compuesto agonista **1**. Como se puede observar, ninguno de los compuestos sintetizados se comportó como antagonista.

Se analizó la actividad agonista en función de la concentración para los compuestos **6** y **7** (Fig.29).

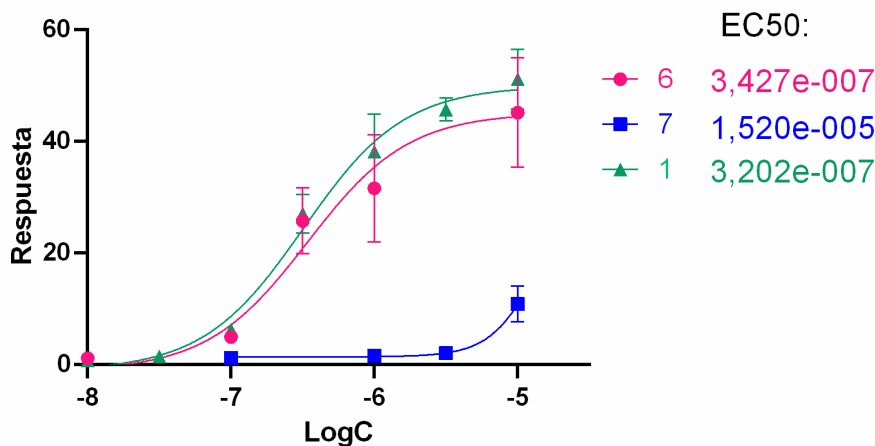


Figura 29. El compuesto **6** presenta mayor potencia que el compuesto **7** en la curva de respuesta en función de la concentración. Las células HEK-293T se trataron con diferentes concentraciones de los compuestos **6** y **7**, usando como control el compuesto agonista **1** a [1 μ M]. Los resultados son las medias \pm SEM (n=3).

El compuesto **6** resultó ser el agonista más fuerte de todos los compuestos ensayados y con una potencia equivalente al compuesto **1** (CE₅₀ de 0,34 μ M y 0,32 μ M respectivamente). También se observó la misma eficacia entre los compuestos **1** y **6** ya que ambos alcanzaron respuestas máximas muy similares. En contraposición, el compuesto **7** resultó mucho menos potente que el compuesto **6** con una CE₅₀ mayor a 10 μ M, siendo la única diferencia entre estos compuestos la configuración en C-24.

CAPITULO II

5.2 Nuevo repertorio de ligandos del receptor DAF-12. Evaluación de la actividad biológica de compuestos con α -aminoacilamidas estructuralmente diversas como cadenas laterales.

Los compuestos esteroidales poseen una larga historia en farmacología humana y animal, siendo utilizados actualmente numerosos análogos sintéticos son en diferentes terapias médicas (76). Sin embargo, solo en las últimas décadas, se ha reconocido el papel central que juegan los esteroides en la fisiología animal más allá de los vertebrados (77). El hallazgo de que el ciclo de vida de los nematodos se encontraba controlado por un sistema endócrino en el que participaban esteroides, permitió proponer la utilización de los componentes de este sistema como nuevos blancos terapéuticos y en particular, el uso de compuestos sintéticos análogos los AD en el tratamiento de una serie de enfermedades parasitarias tanto en humanos como en animales (3-5). La falta de la estructura cristalina de DAF-12 de *C. elegans* (CeDAF-12) ha dificultado la realización de un diseño completamente racional de nuevos compuestos biológicamente activos que puedan ejercer efecto en parásitos. La estrategia utilizada previamente para sintetizar análogos biológicamente activos se centró en la síntesis de compuestos que presentaban pequeñas modificaciones sobre la estructura original de los AD (evaluación de los mismos en el capítulo I). Sin embargo, con la información disponible sobre la unión de los AD al receptor DAF-12 la diversidad de ligandos biológicamente activos que se podrían sintetizar era muy limitada.

Con el objetivo de expandir el repertorio de ligandos del CeDAF-12, en el laboratorio del Dr. Javier Ramírez se sintetizaron nuevos compuestos esteroidales que conservaban los grupos funcionales y las características estructurales que se habían identificado previamente como necesarias para la actividad, pero permitiendo una mayor variabilidad al incorporar α -aminoacilamidas estructuralmente diversas como cadenas laterales. Estos compuestos se obtuvieron mediante una estrategia de síntesis basada en la reacción de cuatro componentes de Ugi (U-4CR), que permite una mayor optimización estructural de los mismos, ofreciendo la ventaja de permitir la combinación de cuatro componentes en un procedimiento sencillo. Además, la variación de los bloques de construcción precursores crea moléculas diversas con mínimo esfuerzo sintético (78).

Como se mencionó anteriormente, se ha sintetizado un número limitado de ligandos de DAF-12, y la mayoría de ellos han sufrido pequeñas, aunque sintéticamente desafiantes, modificaciones en las hormonas naturales (79, 80), como las que se muestran en la Fig. 30. Por ejemplo la modificación de la cadena lateral (como en **2a** y **2b**) o el patrón de doble enlace del sistema de anillo esteroideo (como en **2c** y **2d**) (49).

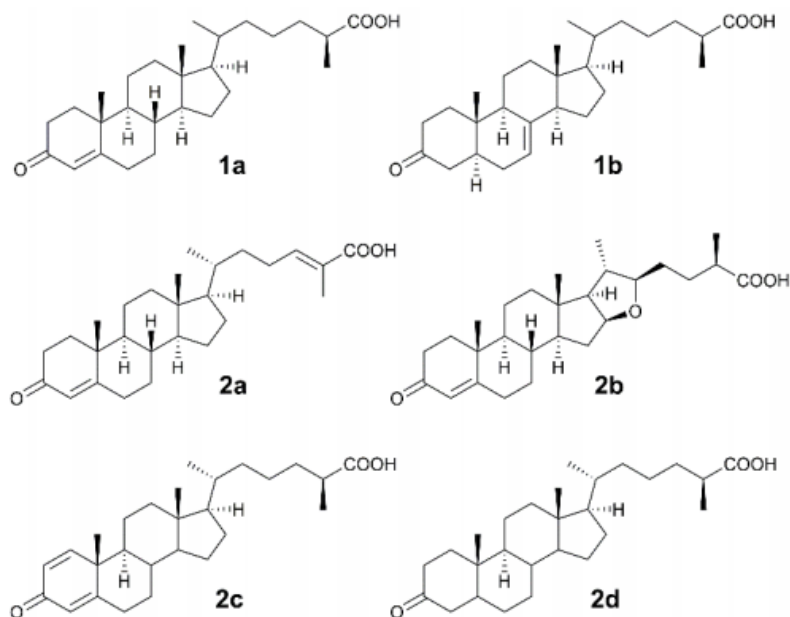


Figura 30. Estructuras de los ácidos dafacrónicos (AD). (1a) Δ 4-AD y (1b) Δ 7-AD, (2a-2d) ligandos endógenos del receptor nuclear DAF-12 que controlan el ciclo de vida de los nematodos y algunos análogos sintéticos sintetizados por el grupo de Wang, 2009 (49).

Aunque estos resultados han mejorado la comprensión de las relaciones estructura-actividad de los potenciales ligandos, estos han cubierto un espacio químico limitado. Las moléculas sintetizadas por Ugi proporcionan una diversidad estructural mucho mayor que la reportada previamente. La Fig. 31 muestra los compuestos sintetizados con la reacción U-4CR.

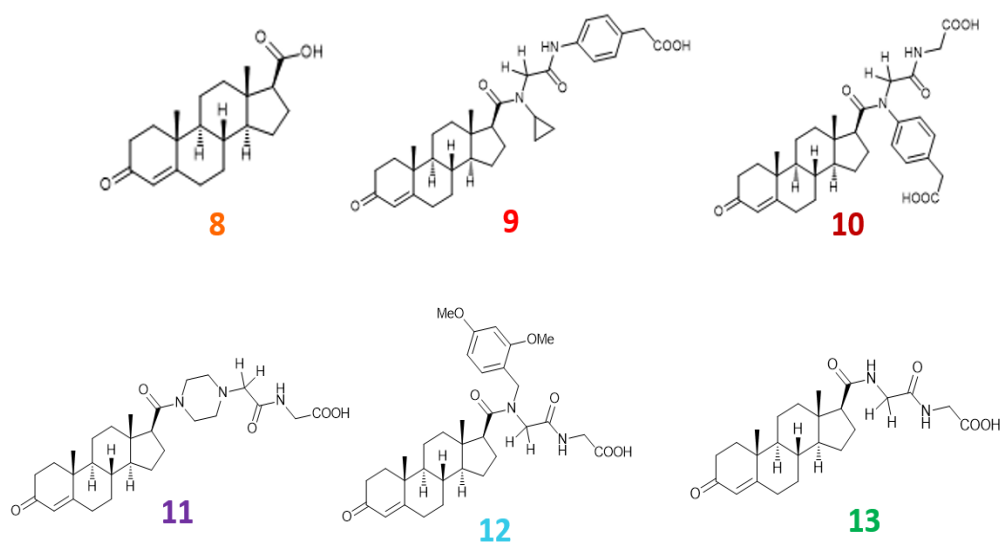


Figura 31. Estructuras de los ligandos análogos a AD sintetizados mediante la reacción de Ugi.

El compuesto **8** fue obtenido a partir de pregnenolona en cuatro pasos mediante la reacción U-4CR (81). Este reaccionó con formaldehído y adecuadas aminas e isocianuros que contienen ácidos carboxílicos protegidos adicionales para dar una serie de aductos que, después de una etapa de desprotección adicional, produjo los compuestos finales **9** y **10** que contienen uno o más restos carboxílicos en sus cadenas laterales. De la misma manera, el compuesto **8** se usó como componente en una variante de la reacción de Ugi conocida como la reacción de N-split-Ugi, donde la amina primaria es reemplazada por una diamina secundaria (82). El uso de piperazina como componente en lugar de la amina produjo aductos que se transformaron en los compuestos finales **11**, **12** y **13**.

5.2.1 Ensayos *In vivo*

Actividad Agonista

5.2.1.1 Los compuestos 8-10 rescatan el fenotipo Daf-c en la cepa nula para el gen *daf-9*.

Siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 4.1.6 de materiales y métodos, se realizó el ensayo de recuperación de la cepa de fenotipo Daf-c. Se crecieron nematodos *daf-9(dh6)* en placas de NGM conteniendo cantidades crecientes de cada uno de los esteroides indicados y etanol como control. La salida de los nematodos de la diapausa se evaluó mediante la observación del bombeo faríngeo y aumento de tamaño. El porcentaje de nematodos que reinician el ciclo de vida reproductivo se determinó 8 días después de la eclosión (2). El porcentaje de nematodos rescatados se confirmó determinando el número de gusanos que se hicieron sensibles al tratamiento con SDS al 1% al día 8. Este número se determinó como la diferencia entre el número total de gusanos en el ensayo menos el número de gusanos resistentes al tratamiento (*dauer*) X 100 (Fig. 32). Los gusanos que no pueden desarrollarse a estadios larvales progresivos permanecieron como larvas *dauer* y se mantienen intactos en presencia de SDS 1% (2).

La Figura 32 muestra que el compuesto **1** promovió la recuperación de un porcentaje significativo de nematodos *daf-9(dh6)*, incluso en la concentración más baja probada 38, 54 y 100% a 1, 10 y 100 μ M. Por otro lado, dos de los compuestos sintéticos (**8** y **9**) también fueron capaces de rescatar el fenotipo Daf-c. Los nematodos crecidos en presencia del compuesto **8** abandonaron el estadio *dauer* en un 23, 37, 84 y 86% a 1, 10, 100 y 200 μ M respectivamente y los crecidos en presencia del compuesto **9**, en un 19, 29, 81 y 84% a 1, 10, 100 y 200 μ M respectivamente. Sorprendentemente, el esteroide **8**, que carece de una cadena lateral que se creía esencial para que un esteroide tuviera una acción similar al AD, también resultó más activo *in vivo* que el

compuesto **10** cuyos porcentajes de recuperación fueron los más bajos con un 5, 15, 43 y 54% a 1, 10, 100 y 200 μM respectivamente. Por otro lado, los compuestos **11-17** no promovieron la recuperación de nematodos *daf-9(dh6)* en ninguna de las concentraciones ensayadas (datos no mostrados).

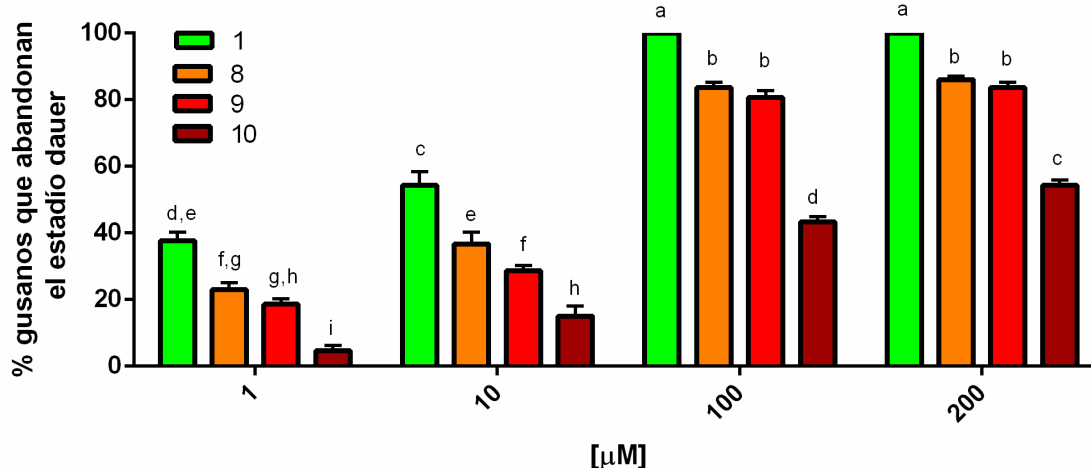


Figura 32. Los compuestos 8-10 logran recuperar el fenotipo dauer de los gusanos mutantes. Nematodos *daf-9(dh6)* fueron cultivados en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos sintéticos (**8-10**) y **1** como control durante 8 días. Al finalizar el ensayo los gusanos fueron sometidos al ensayo de resistencia al SDS al 1% (18), determinándose el número de gusanos que permanecían en estadio *dauer*. Se grafica la media del porcentaje de gusanos que retomaron el ciclo de vida reproductivo \pm SEM. La significancia estadística para cada concentración ensayada de compuesto se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0.05$).

Para caracterizar más detalladamente la actividad de estos compuestos, los nematodos *daf-9(dh6)* fueron crecidos en presencia de 100 μM de los compuestos sintéticos **8-10** y **1**. Se determinaron las etapas de desarrollo en las que se encontraban a intervalos regulares durante 8 días. Se incluyeron gusanos de tipo salvaje N2 incubados en ausencia de cualquier compuesto agregado como control (Fig. 33).

La Fig. 33 muestra que en presencia de 100 μM de los compuestos, los nematodos *daf-9(dh6)* comenzaron a salir del estadio *dauer* 48 h después de la eclosión, mostrando los primeros signos de recuperación. Los gusanos crecidos en presencia del compuesto **1** alcanzaron en un 86% el estadio L3, con el compuesto **9** un 14% y con el compuesto **10** un 8% de L3 al mismo día. Para el día 4, mientras que más del 85% de los gusanos crecidos en presencia del compuesto **1** alcanzaron la edad adulta, los desarrollados en presencia de los compuestos **8**, **9** y **10** solo progresaron a la etapa L3 (14, 11 y 8% respectivamente). Dos días después, todos los gusanos desarrollados en presencia del compuesto **1** eran adultos, el 19 y 47% de los desarrollados en presencia de los compuestos **8** y **9** respectivamente alcanzaron la etapa L4, mientras que en

presencia del compuesto **10** solo se pudo observar un aumento en el porcentaje de gusanos en etapa L3 (23%).

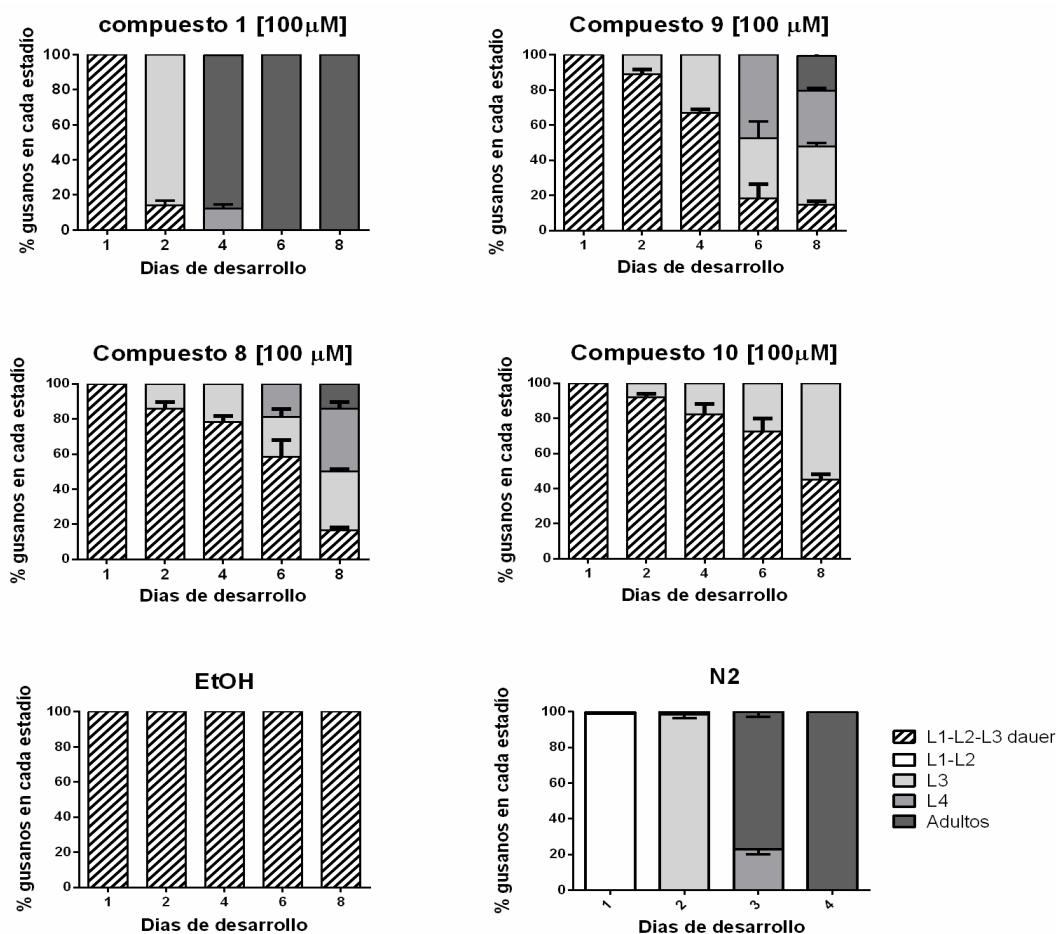


Figura 33. Los compuestos 8-10 muestran actividad agonista *in vivo*. Los gusanos se desarrollaron en presencia de 100 μM de compuesto **1**, en los compuestos sintéticos **8-10** y etanol como control. Gusanos N2 se cultivaron en ausencia de compuestos como control. Las etapas de desarrollo se analizaron en períodos de tiempo regulares (24 y 48 h) y se determinó el porcentaje de gusanos en cada etapa. Los estudios se realizaron utilizando 3 cohortes independientes (n = 200) y los resultados corresponden a las medias para los 3 experimentos. Las barras representan las desviaciones estándar.

Finalmente, al día 8 el 14 y 21% de los gusanos que se desarrollaron en presencia de los compuestos **8** y **9** respectivamente maduraron hasta convertirse en adultos, mientras que la mitad de los gusanos desarrollados en presencia del compuesto **10** permanecieron en la etapa L3.

Estos resultados muestran que mientras los compuestos **8** y **9** se comportaron como ligandos de DAF-12 *in vivo* y permitieron la expresión de los genes blanco de DAF-12 involucrados en los programas de desarrollo que gobiernan las transiciones de los diferentes estadios larvales y de L4 a adultos, el compuesto **10** se comportó como un ligando DAF-12 que solo fue capaz de promover la transición a la etapa L3 de

aproximadamente el 50% de los gusanos. Los estadios alcanzados fueron determinados mediante fotografías tomadas a los gusanos ($n > 60$) con el programa Image J®. En la Fig. 34 se muestran las fotos más representativas para cada compuesto al día 6 y 8.

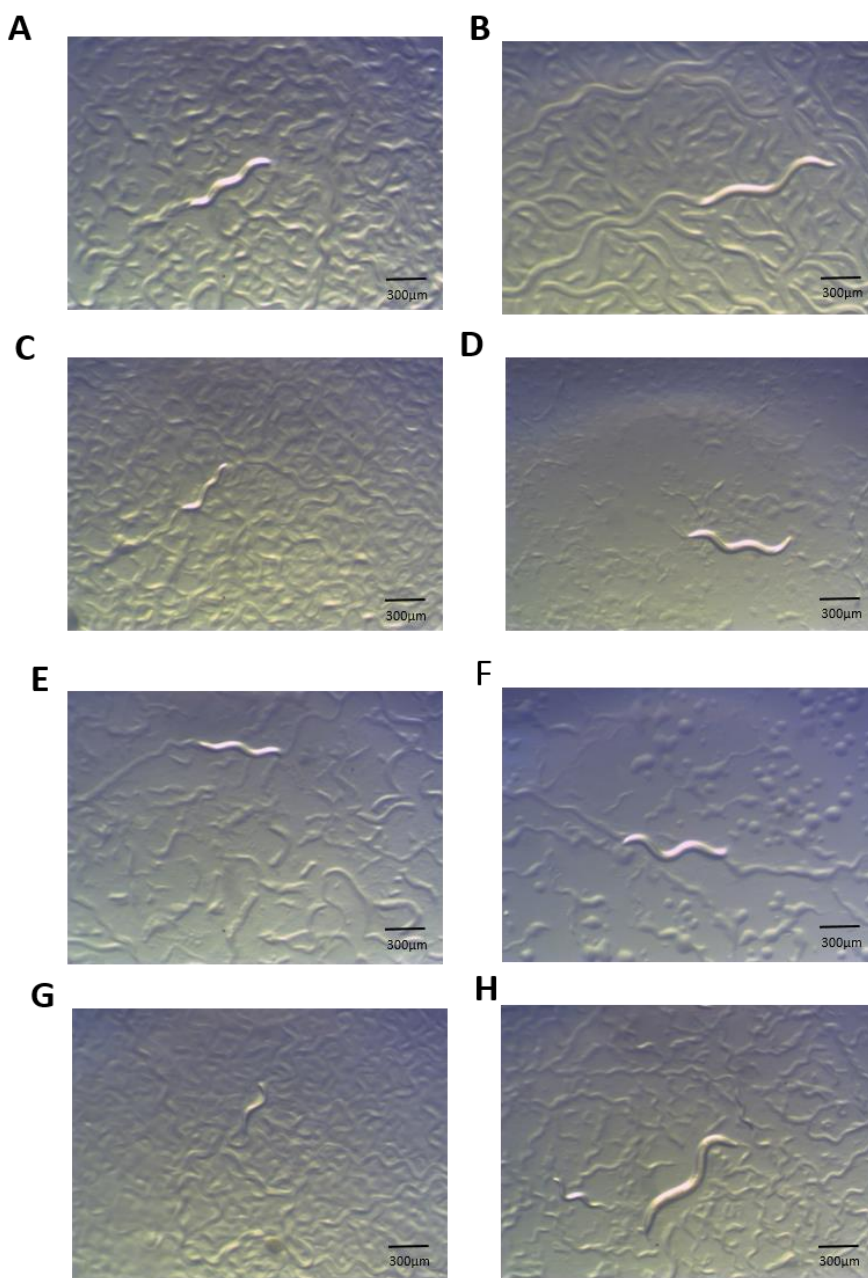


Figura 34. Desarrollo de los nematodos *daf-9(dh6)* al día 6 y 8. Los gusanos mutantes se desarrollaron en presencia de 100 μ M de los compuestos indicados **A y B)** compuesto **8** en los días 6 y 8 de desarrollo respectivamente. **C y D)** compuesto **9** a los días mismos días. **E y F)** compuesto **10** a los mismos días y como control en **G)** se muestra la cepa *daf-9(dh6)* y en **H)** gusanos N2 salvajes en etanol. Las fotografías muestran los gusanos más representativos de un $n=60$.

En la tabla 5 se muestran las medidas del área, perímetro y longitud tomadas con el programa Image J®.

Cepa	Compuesto	Área (μm) ²	Significancia área	Perímetro (μm)	Significancia perímetro	Longitud (μm)	Significancia longitud	Estadio más avanzado	Recuperados %
N2	EtOH	98772		2335,89		1.167,95		hermafrodita	100
daf-9 (dh6)	8	57080	****	1907,12	**	953,56	****	adulto joven	84
	9	56020	****	1754,13	**	877,07	****	adulto joven	81
	10	25748	n.s	1349,34	n.s	674,67	****	L3	43
	11	25690	n.s	1335,85	n.s	667,93	****	L3	26
	12	25075	n.s	1001,67	n.s	500,84	n.s	L2	19
	13	24852	n.s	984,32	n.s	492,16	n.s	L2	17
	EtOH	24774		977,54		488,77		L2d	0

Tabla 5. Dimensiones de gusanos recuperados con compuestos agonistas al día 8. Se muestran los valores promedio de 60 gusanos medidos en cada placa, el estadio más avanzado que alcanzan y el % de gusanos recuperados. La significancia estadística se realizó mediante un ANOVA con el test de múltiple comparación de Dunnett tomando como control EtOH. ****=muy significativo, **= significativo, n.s= no significativo.

En la tabla 5, se muestra que los gusanos recuperados tratados con los compuestos **8** y **9** alcanzaron un estadio de adulto joven y presentan mayor tamaño que los tratados con los compuestos **10** y **11** los cuales solamente se desarrollaron hasta L3, mientras que los gusanos crecidos en presencia de los compuestos **12** y **13** mantuvieron el tamaño semejante al que presentan los nematodos control mostrando así su escasa actividad agonista. Los gusanos recuperados en presencia de los compuestos **8-11** no lograron alcanzar las dimensiones de los gusanos salvajes.

Los resultados obtenidos permiten concluir que los compuestos **8-11** son capaces de desencadenar la expresión de los genes regulados por DAF-12 necesarios para promover la transición del estadio L2 a L3 y los compuestos **8** y **9** la transición a adultos, mientras que los compuestos **12** y **13** no logran recuperar el fenotipo *dauer* en una manera significativa respecto al control. Estos hallazgos pueden explicarse a la luz de los resultados descritos por Schaedel y colaboradores (25) en los que mostraron que los gusanos tienen un mecanismo que les permite evaluar e integrar los niveles hormonales en cada momento y determinar si se ha alcanzado el umbral para tomar la decisión de entrar en estadio *dauer* o comenzar el ciclo de vida reproductivo. Esta determinación podría tomarse al alcanzarse una cierta concentración de AD que resulta capaz de promover el intercambio de DAF-12/DIN-1 u otros complejos represores para formar complejos DAF-12/co-activadores (aún no han sido identificados). También se requieren concentraciones crecientes de AD para avanzar a estadios larvales de desarrollo progresivos (L2-L3-L4), a adulto y hembra hermafrodita. Por ejemplo, la adición de 10 nM AD en un cultivo líquido de mutantes *daf-9* es suficiente para superar el umbral de la entrada a la diapausa *dauer*, por lo que los gusanos inician el desarrollo de los programas genéticos del estadio L3. Sin embargo, estos animales requieren 30

nM de AD adicionales para promover la gonadogénesis normal y la formación de cutículas, por lo que se convierten en adultos normales (3).

Actividad Antagonista

5.2.1.2 Los compuestos 8-13 producen un retraso en la eclosión de los huevos en gusanos salvajes.

A fin de analizar si los compuestos **8-13**, presentaban actividad antagonista, se realizó un ensayo de la eclosión de huevos y de desarrollo a estadios progresivos en gusanos salvajes crecidos en presencia de los compuestos. (Fig. 35).

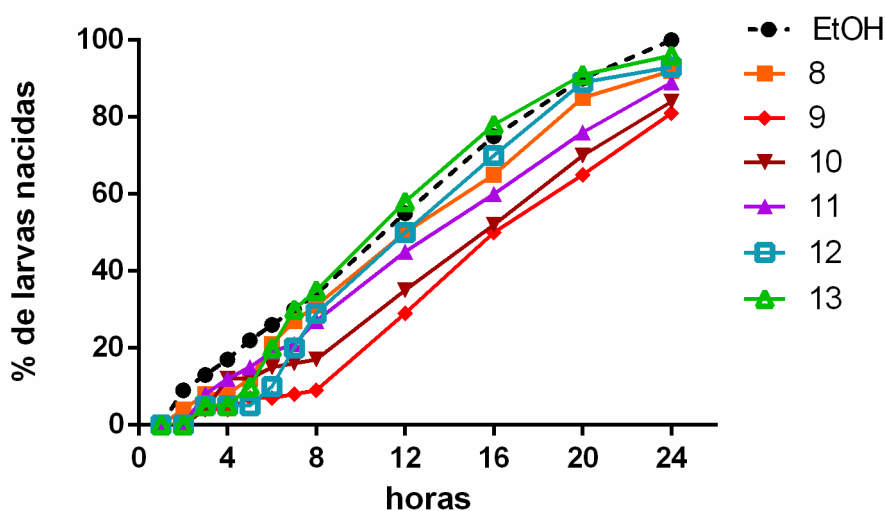


Figura 35. Retraso en la eclosión de los huevos tratados con los compuestos 8-13 Se colocaron hembras hermafroditas en placas conteniendo los compuestos indicados a 100 μ M para poner huevos (20/placa) a 16°C y luego fueron removidas. Se determinó el porcentaje de gusanos en estadio L1 cada 60 min por 8 h y luego cada 4 h hasta completar 1 día. EtOH corresponde al análisis de L1 nacidas placas en ausencia de compuestos. Se realizaron 2 experimentos, se muestra el más representativo. La significancia estadística se realizó mediante la prueba de ANOVA de un factor.

Se pudo observar un retraso en la eclosión de los huevos que fueron incubados en presencia de 100 μ M de los compuestos **8-13**, siendo los compuestos **9** y **10** los que mayor retraso presentaron, con un 15% de larvas menos nacidas a las 24 h que el control. Las curvas obtenidas se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA de un factor, el cual mostró que no existen diferencias significativas entre las curvas comparadas con el ETOH con una $p=0,8835$.

Para confirmar la actividad antagonista de los compuestos sintéticos **8-11**, gusanos salvajes fueron crecidos en presencia de 100 μ M de los mismos y se determinó el porcentaje de gusanos en cada una de las etapas de desarrollo cada 24 h durante 8

días. También se incluyeron gusanos de tipo salvaje N2 incubados en ausencia de cualquier compuesto agregado como control (Fig. 36).

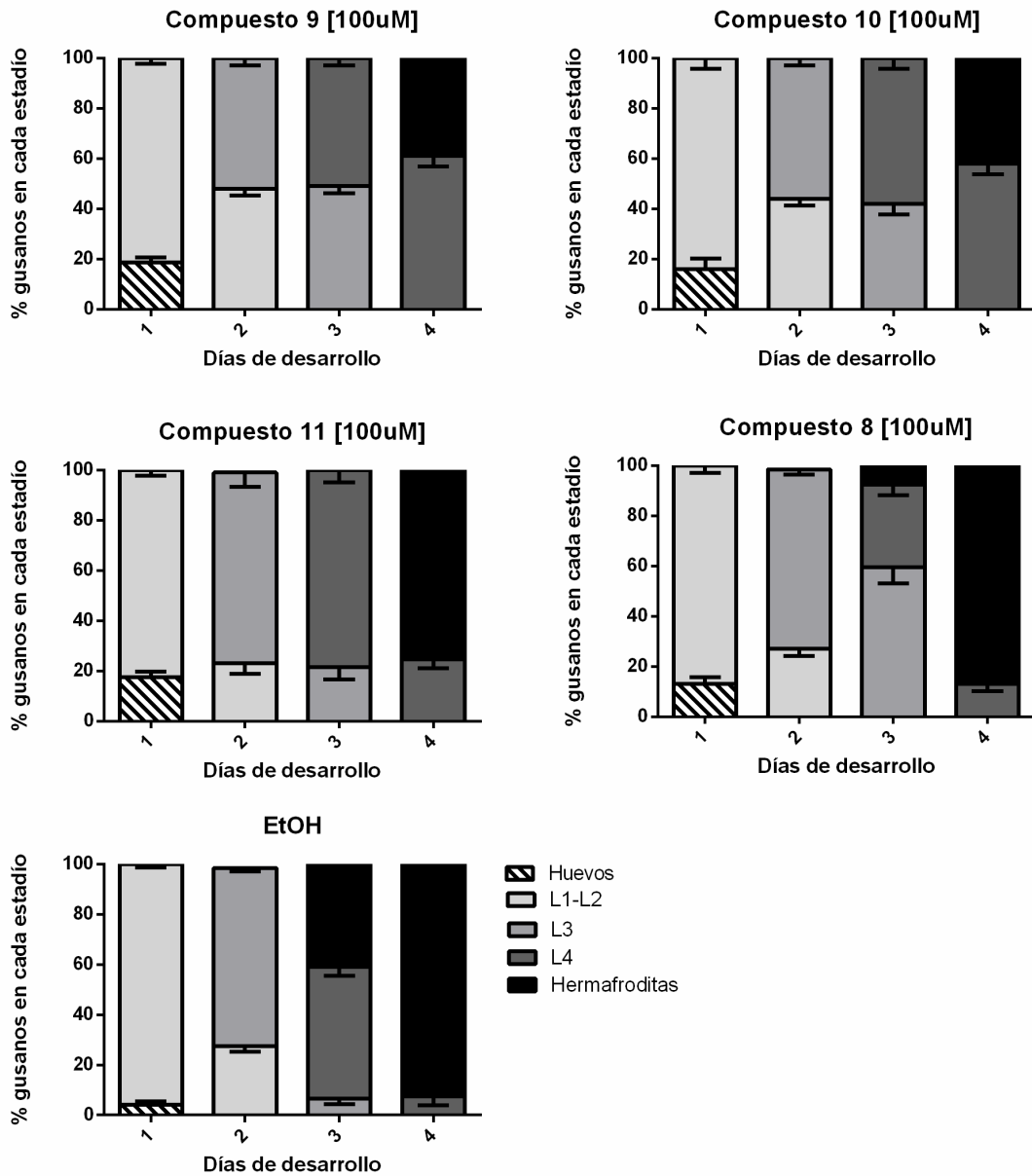


Figura 36. Los compuestos 8-11 presentan actividad antagonista in vivo. Nematodos salvajes se desarrollaron en presencia de 100 μ M de los compuestos sintéticos (8-11) y etanol como control. Las etapas de desarrollo se analizaron en períodos de tiempo regulares (24h) y se determinó el porcentaje de gusanos en cada etapa del desarrollo. Los estudios se realizaron utilizando 3 cohortes independientes (n = 200) y los resultados son las medias para los 3 experimentos. Las barras representan las desviaciones estándar.

La Figura 36 muestra que al día 1 se encontraron huevos que todavía no eclosionaron, siendo el compuesto 9 el que presentaba un porcentaje mayor de huevos (20%), mientras que los compuestos 10 y 11 presentaban un 18%, y 16% de huevos

respectivamente, por otro lado el compuesto **8** y el control presentaban un 13% y un 4% respectivamente. Al día 2 todos los huevos habían eclosionado, los gusanos crecidos en presencia de los compuestos **9** y **10** habían avanzado a L3 en un 77 y 56% respectivamente, mientras que en presencia de los compuestos **11** y **8** avanzaron a ese estadio un 50 %. Al día 3 se observó un retraso más evidente en el desarrollo, ya que un 40% de gusanos control habían alcanzado el estadio hermafrodita, mientras que solo el 8% de los tratados con el compuesto **8** habían alcanzado ese estadio y los tratados con los compuestos **9**, **10** y **11** habían alcanzado solo el estadio de adulto joven en un 51, 58 y 78% respectivamente. Al cuarto y último día, los gusanos crecidos en los compuestos **9** y **10** presentaron mayor retraso alcanzando el estadio hermafrodita solo un 39 y 42% de los gusanos, mientras que un 75% de los crecidos en presencia del compuesto **11** y un 87% con el compuesto **8** alcanzaron dicho estadio (mientras que el control presentó un 95% de hermafroditas). Los retrasos que mostraron los nematodos en alcanzar los estadios sucesivos de desarrollo presentaron el mismo patrón que el observado sobre la eclosión de los huevos (Fig. 35), siendo los antagonistas más potentes los compuestos **9** y **10**, mientras que los compuestos **11** y **8** presentaron una menor actividad antagonista. Por otro lado, nematodos de la cepa salvaje se crecieron en presencia de los compuestos sintéticos **12- 17**, pero no se observó ninguna diferencia significativa en su desarrollo con respecto al control crecido en presencia del EtOH (datos no mostrados), sugiriendo que los esteroides carecen de actividad antagonista en las dosis probadas. Una observación importante realizada sobre la cepa salvaje tratada con los compuestos **8-13** es que los gusanos al día 10 son más grandes ya que presentan un área, un perímetro y una longitud mayor que los gusanos crecidos en ausencia de compuestos (Tabla 6)

Compuesto	Área (μm^2)	Significancia área	Perímetro (μm)	Significancia perímetro	Longitud (μm)	Significancia longitud	Estadio más avanzado
8	100381,8	n.s	2.684	n.s	1341,85	n.s	hermafrodita
9	93612,1	n.s	2.581	n.s	1290,37	n.s	hermafrodita
10	98056,0	n.s	2.524	**	1262,13	n.s	hermafrodita
11	96517,0	n.s	2.607	n.s	1303,63	n.s	hermafrodita
12	101389,2	n.s	2.727	n.s	1363,56	n.s	hermafrodita
13	97901,6	n.s	2.801	*	1400,50	**	hermafrodita
EtOH	88897,6		2.575		1287,59		hermafrodita

Tabla 6. Parámetros de los gusanos salvajes tratados con los compuestos sintéticos 8-13. Se muestra el promedio de 20 gusanos medidos en cada placa al día 10. La significancia estadística se realizó mediante un ANOVA con el test de múltiple comparación de Dunnett tomando como control EtOH. ****=muy significativo, **= significativo, n.s= no significativo.

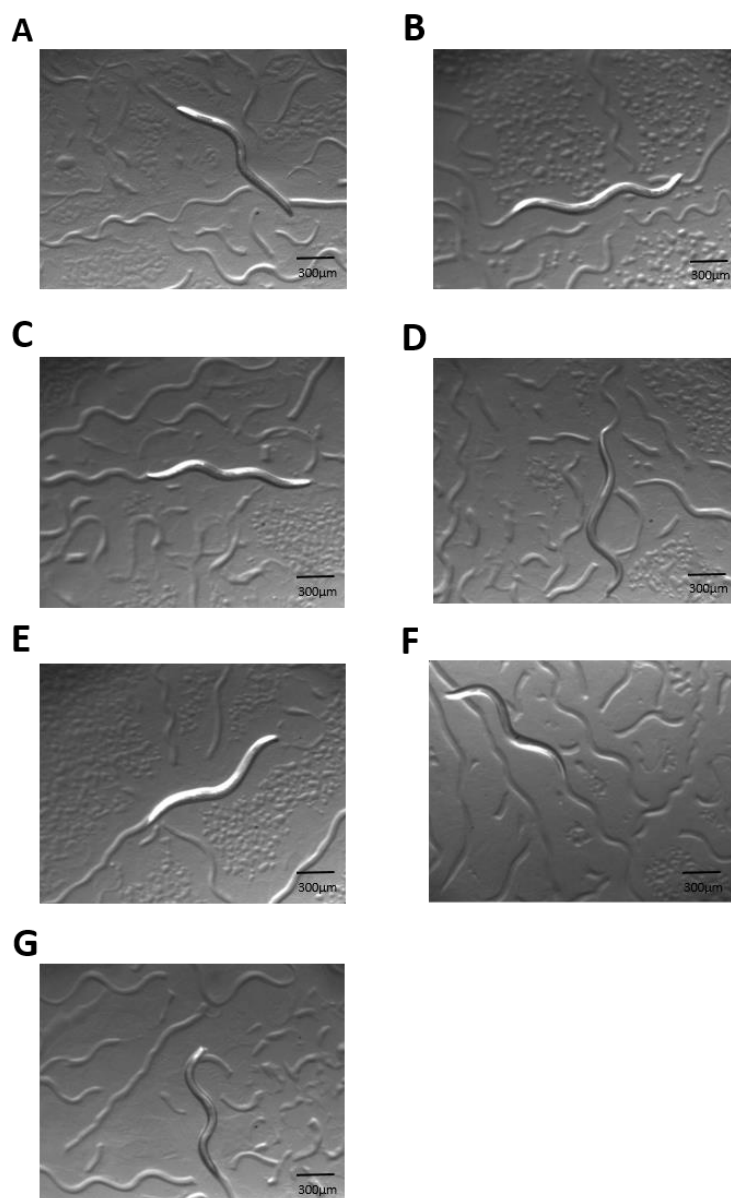


Figura 37. Los nematodos crecidos en presencia de los compuestos presentan diferencias en sus tamaños al día 10. Imágenes de los nematodos salvajes desarrollados en presencia de 100 μM de los compuestos 12 (A), 8 (B), 10 (C), 13 (D), 11 (E), 9 (F) y etanol (G). Se muestran imágenes representativas.

Como se muestra en la Tabla 6, los gusanos tratados con los compuestos **8-13** llegan al estadio hermafrodita, presentando además, un mayor tamaño que los gusanos control. Como se había reportado previamente, el receptor nuclear DAF-12 funcionaba como un regulador global del metabolismo en el estadio adulto y en particular de la utilización de los lípidos (32). Basados en dicha información se hipotetizamos que las diferencias encontradas en el tamaño de los gusanos tratados con los compuestos sintéticos se podría deber a la acumulación de lípidos. Con la finalidad de comprobar este punto se realizó una tinción con Oil Red (ORO) específica para teñir lípidos tal como se indica en materiales y métodos (Fig. 38) (83, 67).

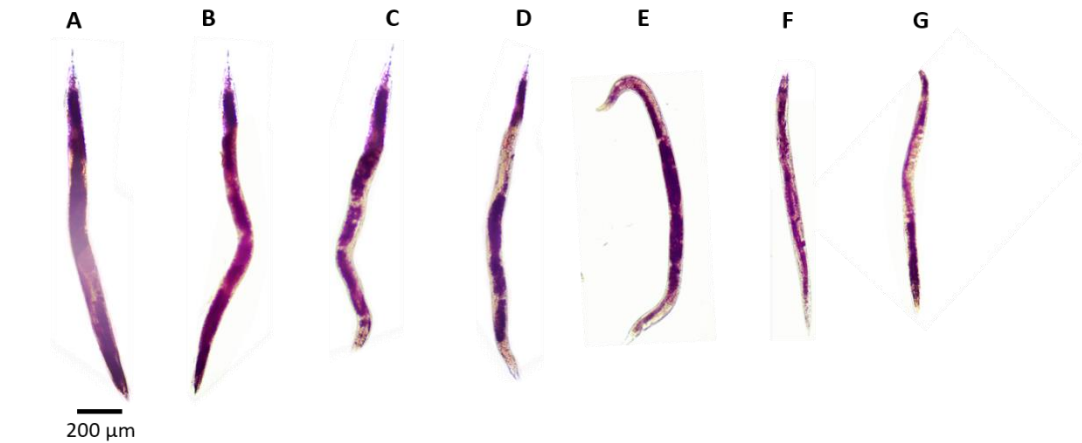


Figura 38. Los gusanos tratados con los compuestos 8-13 acumulan lípidos. Gusanos salvajes fueron teñidos con el colorante Oil Red. La figura muestra la tinción de lípidos en gusanos desarrollados durante 8 días en presencia de los compuestos 12 (A), 9 (B), 10 (C), 13 (D), 11 (E), 8 (F), y EtOH (G). Los gusanos A-D fueron reconstruidos a partir de dos fotos debido al gran tamaño de los mismos. La acumulación de lípidos acompaña al mayor tamaño en los gusanos tratados con los compuestos.

En la Fig. 38 se muestran imágenes representativas de los gusanos crecidos en presencia de los diferentes compuestos por 8 días teñidos con ORO. Se observa al aumento del tamaño mostrado anteriormente y la acumulación de lípidos en el intestino y en la membrana externa.

5.2.1.3 Los compuestos 8-11 reducen la fertilidad en gusanos salvajes.

Con el propósito de determinar si los compuestos 8-11 afectaban la fertilidad, se crecieron gusanos salvajes en presencia de los mismos y etanol como control hasta el estadio de hembras hermafroditas a 16°C y se determinó el número de huevos puestos en función del tiempo (Fig. 39A)

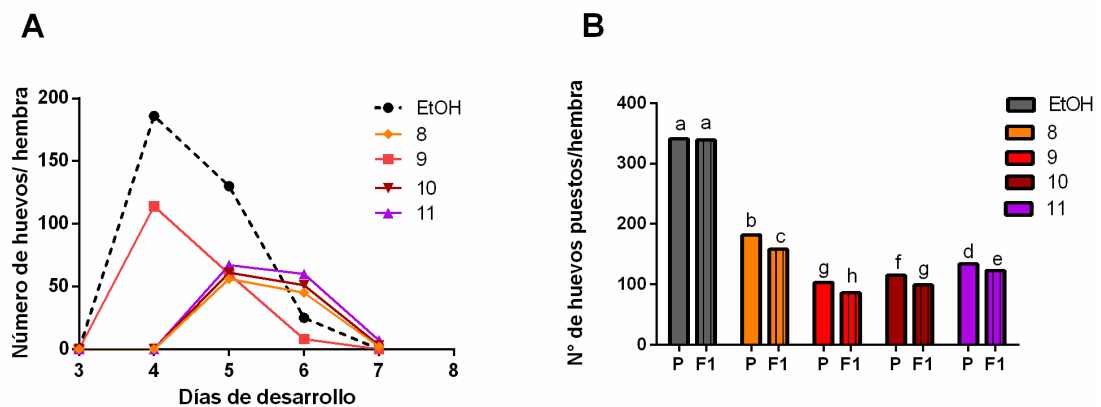


Figura 39. Efecto de los compuestos 8-11 en la fertilidad. A) Número de huevos/hembra hermafrodita desarrollada en presencia de los compuestos 8-11 o etanol como control en función del tiempo B) Los huevos obtenidos en el panel A se transfirieron a placas en ausencia de compuestos, parental (P), y se desarrollaron hasta hermafroditas (F1) y se determinó el número de huevos puestos/hembra. Los resultados se analizaron usando el test de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas entre las medias ($p > 0,05$).

La Figura 39A muestra el número de huevos puestos en función del tiempo, al día 4, tanto los gusanos crecidos en presencia del compuesto **9** como los gusanos del control comenzaron a poner huevos, mientras que los gusanos crecidos en las placas con los compuestos **8**, **10** y **11** comenzaron a poner huevos al día siguiente (día 5). El número total de huevos puestos por hembra desarrollada en la placa control fue de 341 mientras que en presencia del compuesto **9** fue de 103 huevos y en presencia del compuesto **10** de 115, un 70 % y 67 % menos que el control. Las hermafroditas desarrolladas en presencia de los compuestos **8** y **11** pusieron un promedio de 182 y 134 huevos respectivamente, los que corresponden a una disminución del 48 y 61 % en relación a control respectivamente. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el test de Tukey y se encontraron diferencias significativas entre el número de huevos puestos en presencia de los compuestos **8-11** y el control., como así también entre el número de huevos puestos por hembras tratadas en presencia del compuesto **8**, **9**, **10** y **11**. Estos resultados indicarían que todos los compuestos analizados disminuyen la fertilidad en las hembras tratadas, siendo los compuestos **9** y **10** los que mayor efecto produjeron. A fin de determinar si los efectos observados sobre la fertilidad en la generación parental, continuaban en la F1 desarrollada en ausencia de compuesto, más precisamente, si se observaba lo que se denomina efecto transgeneracional, se realizó el experimento que se muestra en la Fig. 39B. Los huevos puestos por la generación parental (crecidas en presencia de compuesto o etanol como control) se transfirieron a placas sin compuestos, se los dejó desarrollar a hermafroditas, poner huevos y se determinó el número de huevos puestos/hembra. Se observaron diferencias significativas entre las medias de los huevos puestos por la generación P y la F1 para cada uno de los compuestos analizados (Fig. 39B). Estos resultados indican que los compuesto ejercen un efecto transgeneracional, este hecho resulta importante en el caso de compuestos con potencial uso nematicida. Ya que, no solo disminuyen la cantidad de huevos puestos por los gusanos que son tratados, sino que también disminuye la producción de huevos en aquellos que se desarrollan en ausencia del mismo, provocando una disminución en la población de gusanos disponibles para el próximo ciclo reproductivo.

5.2.1.4 Efecto de los compuestos **8-11** sobre la expectativa de vida.

Como se mencionó anteriormente, además de controlar tanto la elección del ciclo de vida (reproductivo o la entrada a diapausa) y el desarrollo a través de los distintos estadios larvales, DAF-12 regula la expectativa de vida y la longevidad (32). A fin de estudiar si los compuestos estudiados resultan capaces de modificar la expectativa de vida, se realizó una curva de supervivencia en presencia de cada uno de

los compuestos **8-13** (Fig. 40) y se determinaron la esperanza de vida y el día de última muerte (parámetros que la caracterizan) para cada una de las curvas. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

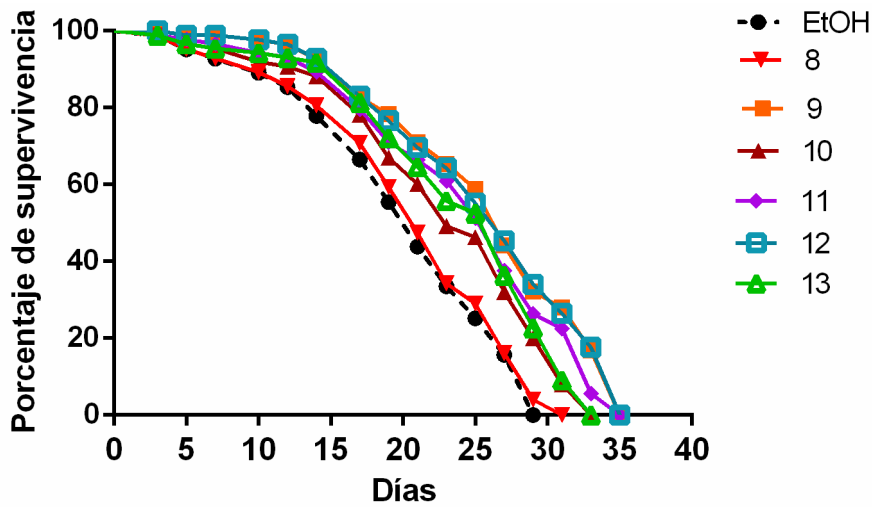


Figura 40. Curvas de supervivencia de gusanos salvajes crecidos en presencia de los compuestos 8-13 La curva de supervivencia se realizó a 16 °C en placas conteniendo 100 µM de los distintos compuestos a partir de huevos y se determinó el porcentaje de gusanos vivos cada 48 h por 35 días El análisis de supervivencia se realizó utilizando el test estadístico de Log-rank (Mantel-Cox) con un valor de P inferior a 0.0002. El análisis se realizó con 3 cohortes independientes y con una n> 60 gusanos.

Compuestos	Esperanza de vida media	Día de la última muerte
EtOH	21d	29d
8	21d	31d
10	23d	33d
9	27d	35d
11	27d	35d
12	27d	35d
13	27d	33d

Tabla 8. Parámetros característicos de las curvas de supervivencia de los gusanos salvajes en placas con los compuestos 8-13

Como se muestra en la tabla 8, la esperanza de vida media de los gusanos salvajes N2 fue de 21 días al igual que la de los tratados con el compuesto **8**, mientras que las de los nematodos crecidos en presencia de con 100 µM de los compuestos **9**, **11**, **12** y **13** fue de 27 días, mostraron un aumento estadísticamente significativo en la

esperanza de vida media del 28.5% (27 días) y no así el compuesto **10** que presentó un aumento del 10% con una vida media de 23 días. Las curvas de supervivencia fueron analizadas utilizando el test de Log-rank (Mantel-Cox) y dicho análisis mostró que las obtenidas en presencia de los compuestos **9-13** son significativamente diferentes al control con una $p < 0.0001$

Estos resultados obtenidos muestran un aumento significativo en la expectativa de vida en los gusanos tratados con los compuestos **9, 10 y 11** en concordancia con los efectos observados en sobre la fertilidad, es decir, aquellos compuestos que ejercen un mayor efecto negativo sobre la fertilidad, producen un aumento mayor sobre la esperanza de vida medio. Estos resultados se pueden interpretar en el contexto del modelo propuesto por Gerisch y colaboradores, donde la longevidad está determinada por señales de la línea germinal, donde se sintetizan en parte los AD, observándose un incremento en la expectativa de vida en aquellos gusanos a los que se les elimina la línea germinal por métodos físicos. Esto nos confirmaría que los efectos que observamos *in vivo* por estos compuestos, se encuentran mediados por el sistema endócrino en el que participa DAF-12 (84).

5.2.2 Ensayos de transactivación de genes reporteros en células

Los resultados obtenidos en ensayos *in vivo* presentados previamente en este capítulo, mostraron que los mismos poseían en algunos casos actividad o agonista mientras que otros presentaron ambas. A fin de confirmar que el blanco de los compuestos analizados era efectivamente el receptor DAF-12, decidimos estudiar la capacidad de los mismos de modular la actividad del receptor DAF-12 en ensayos de transactivación de genes reporteros en células eucariotas.

5.2.2.1 Los compuestos 8-10 presentan actividad agonista del CeDAF-12 en ensayos de genes reporteros.

Con el fin de confirmar que la actividad de los compuestos esteroidales sintéticos observada *in vivo* se encuentra mediada por DAF-12, se realizaron ensayos de transactivación de genes reporteros en células eucariotas como se indica en 4.2.6 de materiales y métodos. Las células fueron tratadas con distintas concentraciones de los compuestos **8-17** durante 16 h y como control positivo se utilizó compuesto **1** (Fig. 41).

Los compuestos **8 y 9** presentaron actividad agonista, aunque la misma resultó mucho menor que la actividad del control (**1**), el compuesto **9** el más activo, mostrando a 100 μM una inducción de 5 veces respecto del control con DMSO, pero que representa de sólo un 40% de la inducción del control, a una concentración de 1 μM , seguidos por los compuestos **8 y 10** que presentaron un 25 % y 14 % de la actividad del control

respectivamente. Por otro lado, el compuesto **11** resultó inactivo en estos ensayos. Los compuestos **12-17** resultaron inactivos (resultados no mostrados).

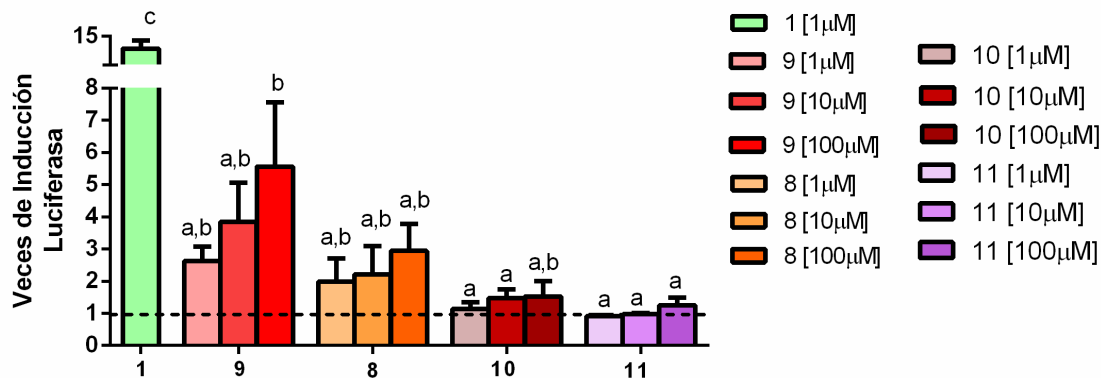


Figura 41. Los compuestos 8 y 9 presentaron actividad agonista en ensayos de genes reporteros en células. Curva dosis respuesta de la actividad del reportero de luciferasa dependiente del receptor Gal4-DAF-12 en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos **8-11** representados por intensidad de color [1, 10 y 100 μM] y del compuesto **1** a [1 μM] como control. Células HEK-293T fueron co-transfectadas con los plásmidos pGAL4-DAF-12LBD junto con pGal4-Luc y tratadas con los compuestos **8-11** y con DMSO como control, durante 5 h. El gráfico muestra las veces de inducción de la actividad, tomando como 1 el valor de luciferasa en las células sin tratar. Los valores se expresan como medias + -SEM de las veces de inducción respecto al control. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0.05$). Se probaron también los compuestos **12-17**, pero no se obtuvieron valores de inducción.

5.2.2.2 La unión de los compuestos 8-10 es desplazada en presencia del compuesto 2.

A fin de confirmar que el sitio de unión de estos compuestos **8-10** es efectivamente el mismo al que se unen los AD en el receptor CeDAF-12 se estudió el desplazamiento de los mismos en presencia de un antagonista de los AD, el compuesto **2** en un ensayo de genes reporteros similar al utilizado para medir la actividad agonista. Células HEK293T se co-transfectaron con el reportero Gal4-luciferasa y el vector de expresión Gal4-DAF-12-LBD. Por un lado, las células fueron tratadas con 1 y 10 μM de los compuestos **8-10** en presencia o ausencia del compuesto antagonista control **2** a 10 μM (Fig.42).

Los resultados obtenidos muestran que la actividad agonista de los compuestos **8** y **9** a una concentración 1 μM disminuye en presencia de un compuesto antagonista del receptor DAF 12 previamente caracterizado. Se observa en todos los casos una disminución mayor del 50 % en la actividad en presencia de dicho compuesto. Estos resultados indicarían, que ambos compuestos se unen al DAF-12. También se probaron los compuestos **12-17**, pero no se obtuvieron valores de inducción (datos no mostrados).

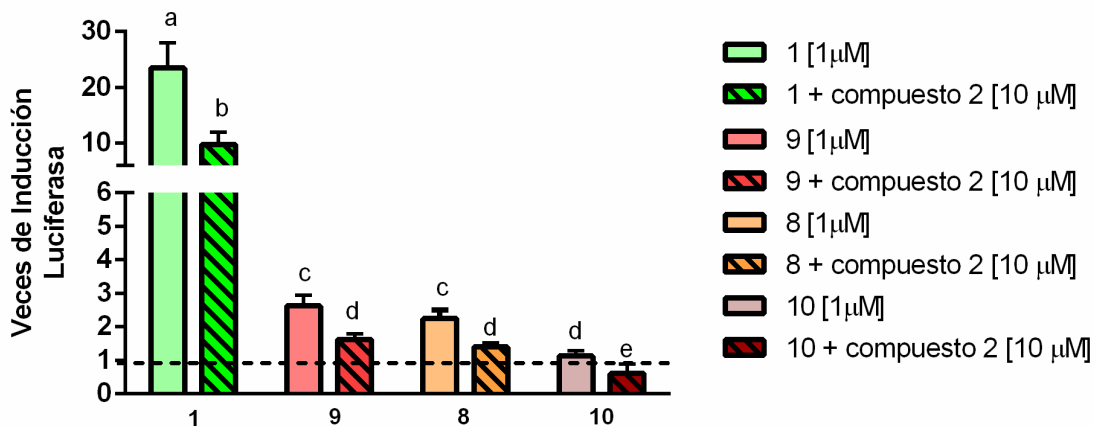


Figura 42. La actividad agonista de los compuestos 8-10 disminuye en presencia del compuesto 2. Actividad del reportero de luciferasa dependiente del receptor Gal4-DAF-12 en presencia de 1 µM del compuesto 1 y de los compuestos 8-10 a [1 µM] en presencia del compuesto antagonista 2 a 10 µM. Las células HEK-293T fueron transfectadas con los plásmidos pGAL4-DAF-12LBD junto con pGal4-Luc y tratadas con los compuestos 8-10 y con DMSO como control, durante 5 h. El gráfico muestra las veces de inducción de la actividad, tomando como 1 el valor de luciferasa de las células sin tratar. Como control positivo se realizó el ensayo en presencia del compuesto 1. Los valores se expresan como medias + -SEM de las veces de inducción respecto al control. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0.05$).

5.2.2.3 Los compuestos 8-13 presentan actividad antagonista de CeDAF-12 en ensayos de genes reporteros.

A fin de analizar si dichos compuestos presentaban también actividad antagonista con el receptor DAF-12, como se podía hipotetizar por el retraso en el desarrollo de los gusanos *in vivo*, se realizó un ensayo de genes reporteros en células. Las células HEK293-T se co-transfectaron con el plásmido reportero Gal4-luciferasa, el vector de expresión Gal4-DAF-12-LBD. Las células fueron tratadas con 1 µM del compuesto 1 en ausencia o presencia de los compuestos 8-13 a una concentración de 10 µM (Fig. 43). En estos resultados obtenidos muestran una disminución en la activación del reportero en presencia de los compuestos 8-10 causados por la capacidad desplazar la unión de este compuesto agonista 1 tomado como control. El compuesto 9 presentó mayor actividad antagonista, disminuyendo la actividad del compuesto 1 en un 64%, seguido del compuesto 8, 10 y 11 los cuales lograron disminuir la actividad del compuesto 1 solo en un 46%, 39% y 36% de la actividad medida respecto del control respectivamente ($P < 0.05$). Mientras que los compuestos 12 y 13 solo lograron reducir la actividad del compuesto 1 en un 32% y 21% respectivamente (Fig. 43).

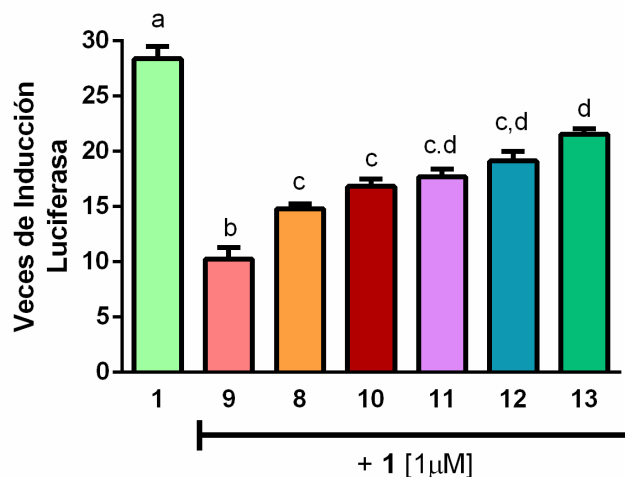


Figura 43. Los compuestos 8-13 presentan actividad antagonista de CeDAF-12 en ensayos de genes reporteros. Actividad del reportero de luciferasa dependiente del receptor Gal4-DAF-12 en presencia de $[1 \mu\text{M}]$ del compuesto 1 y de los compuestos 8-13 $[10 \mu\text{M}]$. Las células HEK-293T fueron co-transfectadas con los plásmidos pGAL4-DAF-12LBD junto con pGal4-Luc y se trataron con los compuestos 8-13 y con DMSO como control, durante 5 h. El gráfico muestra las veces de inducción de la actividad, tomando como 1 el valor de luciferasa de las células sin tratar. Como control positivo se realizó el ensayo en presencia del compuesto 1. Los valores se expresan como medias \pm SEM de las veces de inducción respecto al control. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0.05$).

A la luz de los resultados obtenidos en células, se sugiere una “promiscuidad” por parte del DAF-12 para la unión de los ligandos y su respectiva activación, ya que pueden unirse compuestos de estructura y tamaños muy distintos y así mismo presentar actividad agonista y antagonista frente al mismo receptor.

5.2.3 Ensayos *In Silico*

Teniendo en cuenta que los cambios estructurales menores introducidos en la estructura de los AD endógenos conducen a los esteroides inactivos, los resultados descritos en este trabajo pueden ser de alguna manera sorprendentes. Aunque se conoce desde hace casi dos décadas que el volumen de los ligandos endógenos de los receptores nucleares se ha conservado durante la evolución, (85) pruebas más recientes muestran que los dominios de unión a ligandos (LBD) de los receptores nucleares son lo suficientemente flexibles como para acomodar ligandos sintéticos mucho más grandes. Nuestra hipótesis es que las posibles nuevas interacciones entre el receptor y los ligandos sintéticos podrían compensar el gasto termodinámico de una expansión del LBD. Para verificar esto, se realizó una colaboración con el Dr. Lautaro Álvarez, quien llevó a cabo estudios de acoplamiento y dinámica molecular, como se explica en la siguiente sección.

5.2.3.1 Acoplamiento de los compuestos 9-11 al receptor ceDAF-12. Realizado en colaboración con el Dr. Lautaro Alvarez)

Los compuestos **9-11** se colocaron en el bolsillo de unión de ligando usando el programa AutoDock 4, con la estructura del receptor ceDAF-12 construida usando modelado de homología (86) (como se había estabilizado previamente con simulaciones de dinámica molecular en complejo con Δ 4-DA). El receptor se consideró rígido y todos los ángulos de torsión rotativos se consideraron en movimiento libre, excepto los enlaces amida. Usando una búsqueda de algoritmo genético, se encontraron 500 poses, que luego se agruparon con un RMSD (Raíz media desviación cuadrática) de 2 Å.

Los resultados muestran que el compuesto **9** tiene un modo de unión preferencial, con buena energía promedio y alta frecuencia (Tabla 9). De este modo, el compuesto **9** ocupa la misma posición que el Δ 4-DA (Fig. 44a), con el grupo 3-ceto interactuando con Gln638 y la cadena lateral se extiende más allá del bolsillo de unión que el observado para el ligando natural (Fig. 44b). Notablemente, las mayores demandas estéricas de esta cadena lateral más grande no impiden la introducción del ligando en el receptor. Se encontró que el grupo de ácido carboxílico en el compuesto **9** estaba demasiado lejos de las Arg564, Arg598 y Arg602 para que pudiera formar interacciones de enlace H estables con los residuos. Las otras posturas de unión obtenidas para el compuesto **9** no mostraban el esqueleto esteroideo correctamente posicionado, (86) por lo que no se consideraron más.

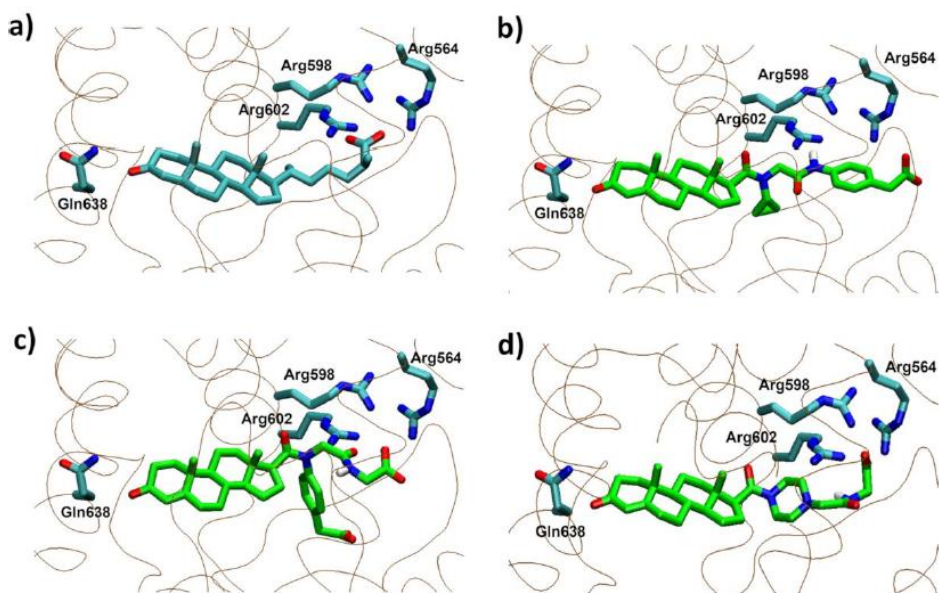


Figura 44. Simulaciones de Dinámica Molecular. a) Pose de unión de Δ 4-DA al receptor ceDAF-12. b-d) Poses de acoplamiento más favorables para los compuestos (b) **9**, (c) **10** y (d) **11**.

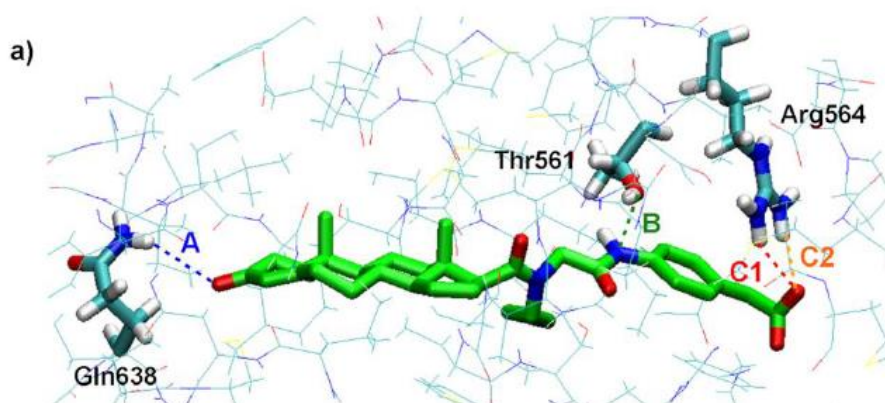
Ligando	Energía de enlace más baja (kCal / mol)	Frecuencia
9	-13.7	45
10	-14.5	8
11	-12.6	30

Tabla 10. Resultados del acoplamiento de los compuestos 9-11 unidos al receptor CeDAF-12

Aunque los resultados de acoplamiento para el compuesto **10** muestran una energía promedio más estable para lograr una posición adecuada en el bolsillo de unión (Fig. 44c), la frecuencia de este grupo es notablemente menor (Tabla 10). Ninguna de las otras poses logró una conformación de ligando correctamente colocado con el esqueleto esteroideo. Estos resultados sugieren que la introducción del compuesto **10** en el bolsillo de unión al ligando del receptor puede ser menos favorable que en el caso del compuesto **9**. Finalmente, el grupo más poblado del compuesto **11** es significativamente menos estable, lo que podría explicar la baja actividad provocada por este compuesto tanto en células como *in vivo*.

5.2.3.2 Simulaciones de dinámica molecular del compuesto 9 unido al receptor CeDAF-12.

Para evaluar si el modo de unión para el compuesto **9** obtenido a través del acoplamiento es estable, se usó la conformación de energía más baja para construir un complejo ceDAF-12 / compuesto **9**. El sistema se estudió a través de una simulación de 100 ns de dinámica molecular de agua (Fig. 45).



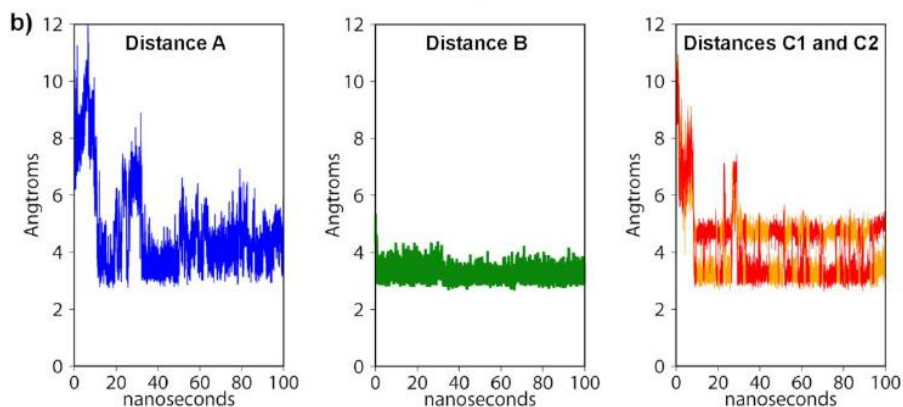


Figura 45. Simulaciones de dinámica molecular a) Instantánea representativa del modo de unión del compuesto 8 con el receptor CeDAF-12. b) Evolución de las distancias clave del ligando del receptor mostradas en (a) durante 100 ns en las simulaciones de dinámica molecular.

Los resultados muestran que durante los primeros 10 ns de simulaciones, el sistema sufre cambios que modifican considerablemente la interacción del receptor del ligando. Esto se manifiesta particularmente a través de la pérdida de enlaces H entre el grupo 3-ceto del compuesto **9** y Gln638, y entre el grupo de ácido carboxílico de la cadena lateral del ligando y Arg564 (Fig. 45). Sin embargo, estas interacciones se reforman después de los primeros 10 ns de las simulaciones, y se observa un modo de enlace altamente estable durante la parte restante de las simulaciones. Además de esta interacción, la cadena lateral del ligando permanece anclada al receptor mediante la formación de un enlace H entre el nitrógeno en el grupo amida y la Thr561.

A continuación, se muestra una comparación entre las estructuras del receptor CeDAF-12 cuando se une al ligando natural y el compuesto **9**, con la posición del ligando y las hélices resaltadas H3, H4, H11 y H12 (Fig. 46).

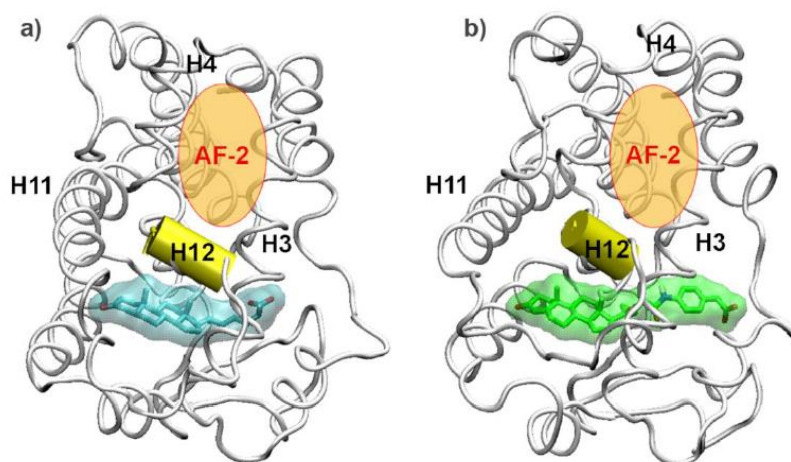


Figura 46. Vista general de los complejos del receptor CeDAF-12. a) Con el compuesto 1 ($\Delta 4$ -DA) (izquierda) y b) 8 (derecha).

La comparación entre estos dos sistemas muestra que la introducción del compuesto **9** en el bolsillo de unión produce cambios claros en la conformación de la hélice H11 y la posición de la hélice H12 permanece relativamente inalterada. En RN como el CeDAF-12, la posición de H12 es el principal determinante de la activación del receptor, ya que influye en la conformación del dominio AF-2 (formado entre las hélices H12, H3 y H4), que media la interacción con los cofactores que desencadenan la actividad transcripcional del complejo (87). Por lo tanto, estas observaciones muestran que la introducción del compuesto **9** en CeDAF-12 no influye para que el receptor esté inactivo, lo que es consistente con los resultados experimentales.

CAPITULO III

5.3.1 Identificación y caracterización molecular de los genes ortólogos de *Cedaf-12* en *Meloidogyne incognita*

Estudios realizados con nematodos parásitos de animales, en particular y más extensamente en el género *Strongyloides*, demostraron que el ciclo de vida del mismo se encontraba regulado por un sistema endócrino cuyos componentes principales eran los AD y el DAF-12 similar al descrito en *C. elegans*. Resultados obtenidos por Wang y colaboradores mostraron que el agregado de AD tenía un efecto sobre el en el control del ciclo de vida en *Strongyloides stercoralis* y propusieron a DAF-12 como un blanco terapéutico para el tratamiento de la strongyloidiasis (6, 49). En este contexto, nos planteamos como objetivo analizar si este sistema endócrino era funcional en los parásitos de plantas y en particular en *M. incognita* un parásito emergente y de gran importancia económica en nuestro país. El objetivo fue utilizar DAF-12 como blanco terapéutico y evaluar la posibilidad de controlar el ciclo de vida de este fitoparásito y de esta manera la infección en plantas. Al comenzar este estudio aún no se había identificado el gen que codifica la proteína DAF-12 en *M. incognita*, por esta razón comenzamos a desarrollar este objetivo realizando estudios bioinformáticos a fin de identificar él o los genes ortólogos a DAF-12 en este fitoparásito, en el marco de una colaboración en con Dr. Carlos Modenutti en el laboratorio de BioFísicoQuímica y Bioinformática Estructural de Proteínas (BFQyBE) perteneciente al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, IQUIBICEN-CONICET.

Los métodos utilizados hasta el momento de iniciar este estudio para la identificación de genes DAF-12 *M. incognita* no habían dado resultados positivos, por cual se llevó a cabo una estrategia alternativa a las utilizadas habitualmente.

5.3.1.1 *minc18013* y *minc10028* son homólogos de *Cedaf-12* en *M. incognita*

Para identificar los homólogos de *Cedaf-12* en *M. incognita*, se agruparon las proteínas identificadas en su transcriptoma curado en familias de acuerdo con la presencia de diferentes dominios, en particular las que presentaban un dominio de unión ligando (LBD) (PF00104) y un dominio de tipo C4 del dedo de zinc (PF00105). Se identificaron 59 proteínas que presentaban ambos dominios (Tabla S1 anexo). Luego, utilizando la secuencia de DAF-12 de *C. elegans* se realizó una búsqueda por homología en ese subgrupo de 59 proteínas identificadas en *M. incognita*. Se identificaron dos homólogos putativos con altas probabilidades de estar emparentados con el *Cedaf-12* en *M. incognita*: MINC18013 y MINC10028, que compartían una identidad de

aminoácidos de 99.83% entre ellos. Los alineamientos para ambos genes con la información detallada se presentan en las figuras S1 y S2 (ver anexos).

Debido al alto grado de identidad de aminoácidos, se realizaron análisis adicionales mediante el mapeo de los mismos en el genoma de *M. incognita* con el fin de descartar que se tratase de variantes de *splicing* del mismo gen. Los resultados muestran que los genes Minc10028 y Minc18013 se encuentran en regiones distintas del genoma (podría tratarse de genes parálogos).

El análisis *in silico* mostró que las secuencias MINC18013 y MINC10028 están ubicadas en dos regiones cromosómicas diferentes en el genoma de *M. incognita* (Tabla S2 anexo). Además, se modelaron MINC18013 y MINC10028 utilizando como template la cadena A del receptor DAF-12 completo con su sustrato del parásito *Strongyloides stercoralis*. El análisis bioinformático mostró que la desviación del cuadrado de la media (RMSD) entre las estructuras MINC18013 (o MINC10028) y el template seleccionado fue $2.8\pm$.



Figura 47: Modelo por homología de la proteína Minc18013. En la figura se muestran el modelo por homología de la proteína de *M. incognita* Minc18013 en color naranja con una representación de *New Cartoon* en superposición con la proteína de *S. stercoralis* DAF-12 (PDB ID 3GYT) en complejo con $\Delta 4$ -AD en color azul con una representación de *New Ribbon*

Estos resultados sugieren fuertemente que las estructuras MINC18013 y MINC10028 son significativamente similares a la estructura DAF-12 de *S. stercolaris*. Además, MINC18013 y MINC10028 tienen ambas regiones responsables del acoplamiento y la estabilización para la unión del ligando ácido $\Delta 4$ AD a *CeDAF-12* (datos no mostrados). La Fig. 47 muestra el modelado de la superposición de estructuras de la cadena A DAF-12 de *S. stercolaris* y la proteína MINC18013. Todos estos resultados sugieren que *minc18013* y *minc10028* codifican los homólogos de *CeDAF12* en *M. incognita* y que los productos de ambos genes podrían interactuar con el ligando ácido $\Delta 4$ AD. Además, estos datos apoyan la idea de que la red endócrina mediada por los AD es funcional en *M. incognita*.

5.3.1.2 *minc18013* y *minc10028* codifican proteínas homologas a DAF-12 en *M. incognita*

Los genes *minc18013* y *minc10028* se clonaron fusionados a un tag de c-Myc en el plásmido de expresión pCMV-3Tag-2A en la posición BamHI-XhoI como se indica en la sección 4.2.6 de materiales y métodos.

Una vez obtenidos los clones que codifican los putativos genes *mDAF-12* se realizó un ensayo de transactivación de genes reporteros en células a fin de determinar si ambos o alguno de los dos genes identificados codifican para el RN homólogo DAF-12 y resultaban capaces de unir AD.

Para ello, se co-transfectaron células HEK-293T con un vector de expresión que codifica el gen reportero de luciferasa bajo el control del promotor *atg-7/let-70* operón CEOP4404 que contiene los genes *atg-7* y *let-70* (fuertemente regulados por DAF-12) y un vector de expresión pCMV-3Tag-2A que expresa MINC18013 en un caso y MINC10028 por otro. Para comparar la actividad de estas proteínas con la de *CeDAF-12* las células fueron transfectadas con el plásmido pDAF-12-A1 (codifica *CeDAF-12* completo) y el mismo plásmido reportero (Fig. 48).

Tanto MINC18013 como MINC10028 unen el compuesto **1** cuando se administraron a una concentración superior a 1 μ M. A 10 μ M, MINC10028 proporciona una inducción ligeramente mayor que la de *C. elegans* tanto a 1 como 10 μ M. Mientras que MINC18013 tiene una inducción menor (Fig. 48A).

Por otro lado, se realizó el mismo ensayo que en el caso anterior y las células se trataron con 1 μ M del compuesto **1** en ausencia o presencia del compuesto **2** a una concentración de 10 μ M. La Fig. 48B muestra que el compuesto **2** fue capaz de inhibir el efecto del compuesto **1** en ambos receptores MINC18013 y MINC10028.

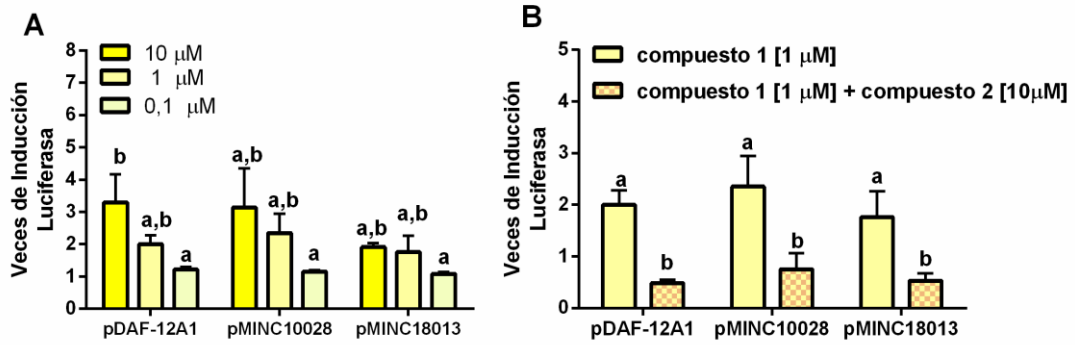


Figura 48. Minc 008 y 013 codifican ortólogos al CeDAF-12. Las células HEK-293T se co-transfectaron con los plásmidos pMINC18013, pMINC10028 y pDAF-12A1 con el vector de expresión DAF-12 dependiente de luciferasa atg-7 / let-70. **(A)** en presencia de concentraciones crecientes del compuesto 1, un agonista fuerte, se grafica la media \pm SD; n=3. **(B)** Las células se trataron con 1 μM del compuesto 1 en ausencia o presencia de 10 μM del compuesto 2. Las veces de inducción de la luciferasa se expresa con relación al control con DMSO. Los resultados son las medias \pm S.D (n=3). En todos los casos, la significancia estadística fue determinada por la prueba de Tukey, las mismas letras no son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

CAPITULO IV

5.4 Análisis del potencial uso de compuestos sintéticos análogos de los AD en el control de los procesos infectivos de *Meloidogyne incognita*

Luego de haber identificado los genes homólogos a CeDAF-12 en *M. incognita* decidimos evaluar tanto la capacidad de regular el ciclo de vida de este fitonematodo utilizando los compuestos sintéticos ya caracterizados en *C. elegans* como así también el potencial uso para controlar la infección en plantas. Los daños causados por *M. incognita* no solo reducen el rendimiento de los cultivos, sino que también afectan su calidad, lo que tiene un gran impacto en los precios. Además, una vez que los campos o invernaderos están contaminados con *Meloidogyne*, debe realizarse la rotación de cultivos con especies resistentes y el saneamiento de los mismos, y por lo tanto, ocasionan elevados costos de producción para los agricultores (51). Sin embargo, aunque todos los países con una economía basada en la agricultura se ven afectados por los daños de estos nematodos parásitos, en los últimos años no se han lanzado al mercado nuevos nematicidas efectivos para controlar esta plaga emergente. Las empresas agroquímicas solo han producido nuevas formulaciones que contienen las mismas moléculas que los productores agrícolas ya han estado utilizando durante varios años, debido fundamentalmente a que es difícil encontrar nuevas moléculas amigables con el medio ambiente. Además, muchas de ellas ya no pueden ser usadas debido a la aparición de cepas de nematodos resistentes a las mismas. Por lo tanto resulta indispensable encontrar drogas que utilicen nuevos blancos para el tratamiento de infecciones por nematodos tanto en humanos y animales como en plantas.

Ensayos *in vivo*

5.4.1 Los compuestos antagonistas inhiben la eclosión de huevos de *M. incognita* y aumentan la mortalidad de J2

Como se demostró en el capítulo I, los tratamientos con los compuestos **2-5** indujeron un retraso en el ciclo de vida de *C. elegans* (4). Con el fin de estudiar la capacidad de dichos compuestos de regular también el desarrollo de *M. incognita*, se analizó el efecto de los mismos sobre la eclosión de los huevos y la viabilidad de los J2 infectivos. Para ello, huevos de *M. incognita* aislados de agallas de raíces infectadas se incubaron en presencia los compuestos **2-5** en a una concentración de 100 μ M en 0,2 % DMSO o en DMSO 0,2 % como control y se determinó el porcentaje de huevos eclosionados al cabo de 96 h (Fig.49A). Por otro lado se analizó el efecto sobre la viabilidad de los gusanos en estadio J2, a los cuales se los incubó por 48 h en presencia de los compuestos **2-5** a 100 μ M en 0,2 % DMSO o en DMSO al 0,2 % como control y se determinó el porcentaje de J2 muertos al cabo de 48 h. Los resultados mostraron

diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de huevos eclosionados en presencia de los compuestos **2** y **3** con respecto al control, reduciéndose la eclosión a un 50 y 53 % respectivamente, mientras que no se encontraron diferencias en los tratados con los compuestos **4** y **5**. Asimismo, se observó también un incremento estadísticamente significativo en la mortalidad de los J2 incubados en presencia de los compuesto **2** y **3**, que se elevó a un 61 y 55 % respectivamente y tampoco se encontraron diferencias en los tratados con los compuestos **4** y **5** (Fig. 49B).

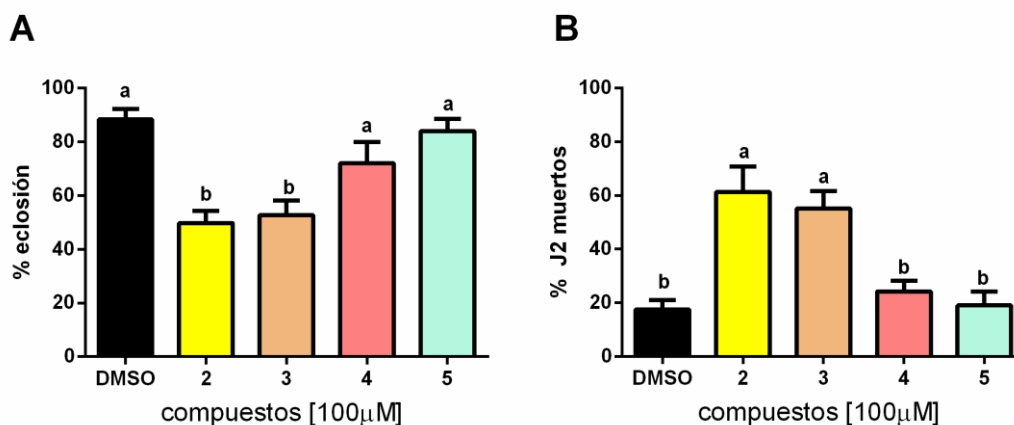


Figura 49. Los compuestos 2 y 3 inhiben de la eclosión de huevos de *M. incognita* y producen un aumento en la mortalidad de J2. (A) El porcentaje de eclosión se determinó después de 96 h de incubación de los huevos con 100 µM de los compuestos **2-5** en DMSO al 0,2% o DMSO al 0,2% como control. (B) El porcentaje de mortalidad se calculó después de 48 h de incubación de J2 en presencia de 100 µM de los compuestos **2-5** en DMSO al 0,2% o DMSO al 0,2% como control. Los valores mostrados son la media de tres experimentos biológicos independientes con 100 huevos. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. Las barras de error representan SEM. En todos los casos, letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias (P < 0,05).

Se observó que los compuestos sintéticos **2** y **3** resultaron capaces de inhibir la eclosión de huevos y aumentar la mortalidad del estadio infeccioso J2, tal como lo indica la Fig.49. El compuesto que presentó mayor efecto en ambos casos fue el compuesto **2**, por lo que decidimos realizar los próximos ensayos utilizando dicho compuesto.

5.4.2 Determinación de las condiciones apropiadas para estudiar el efecto del compuesto 2 sobre el ciclo de vida y la infección de *M. incognita*

Con el objetivo de establecer la concentración óptima para ser utilizada en los próximos ensayos se analizaron la eclosión de los huevos y la mortalidad de los J2 de la misma forma realizada en el punto anterior en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **2** (Fig. 50).

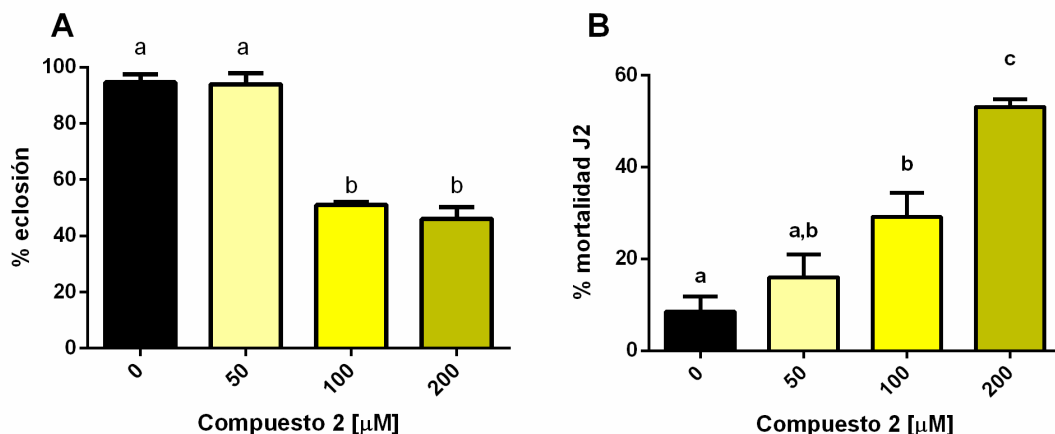


Figura 50. El compuesto 2 inhibe la eclosión de huevos y aumenta la mortalidad de J2 s de *M. incognita* en una forma dosis dependiente. (A) El porcentaje de eclosión se determinó después de 96 h de incubación de huevos con concentraciones creciente del compuesto 2 (50, 100 y 200 µM) en DMSO al 0,2% o DMSO al 0,2% como control. (B) El porcentaje de mortalidad se calculó después de 48 h de incubación de gusanos J2 en presencia de concentraciones crecientes del compuesto 2 (50, 100 y 200 µM) en DMSO al 0,2% o DMSO al 0,2% como control. Los valores mostrados son la media de tres experimentos biológicos independientes con 100 huevos. Las barras de error representan la SEM. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0,05$).

Se observó que después de 96 h de incubación, eclosionaron casi la totalidad de los huevos en ausencia de compuesto, así como los tratados con el compuesto 2 a 50 µM, mientras que, los huevos incubados con 100 µM y 200 µM eclosionaron sólo la mitad (52 y 46% respectivamente). El experimento se continuó durante otras 24 h adicionales, pero no se observaron cambios significativos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la eclosión de huevos a las 96 h ($p < 0,0001$) entre 100 y 200 µM tratados con el compuesto 2 en comparación con los controles y 50 µM tratados con el compuesto 2. Se analizó, además, la mortalidad de los J2 en presencia de concentraciones crecientes del compuesto 2 en DMSO 0,2% o DMSO 0,2% como control y luego de una incubación de 48 h se calculó el porcentaje de J2 muertos. La Fig. 50B muestra que hay un efecto dosis-respuesta significativo en la mortalidad de los J2 con el compuesto 2. Después de 48 h de incubación, se encontraron 16, 28 y 53% de nematodos muertos en presencia de 50, 100 y 200 µM del compuesto 2 respectivamente y solo un 8% en el control. Estos resultados sugieren que el compuesto 2 es capaz de modular al menos algunas etapas del ciclo de vida de *M. incognita* (eclosión) y presenta actividad nematocida, resultando un compuesto interesante para controlar la infección en plantas. No existen aún sistemas de crecimiento *in vitro* para este tipo de nematodos, solo se desarrollan los siguientes estadios dentro de la planta

huésped, por lo que no es posible evaluar el pasajes a los estadios larvales sucesivos en presencia de los compuestos sintéticos como se realizó con *C. elegans*.

5.4.3 El compuesto 2 es un potente antagonista con potencial efecto para controlar la infección de *M. incognita*

Continuamos nuestro análisis estudiando el efecto del compuesto 2 para controlar la infección en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) (una especie altamente susceptible al ataque por esta especie de fitonematodo). Las raíces de las plantas de tomate de 6 días se trataron durante 48 h con concentraciones crecientes del compuesto 2 en DMSO 0,2 % o en DMSO 0,2% como control y luego se infectaron con 100 J2. Treinta y cinco días después de la infección, se sacaron las plantas del papel de filtro y se determinó el número de agallas/sistema radicular y el número de las masas de huevos/sistema radicular.

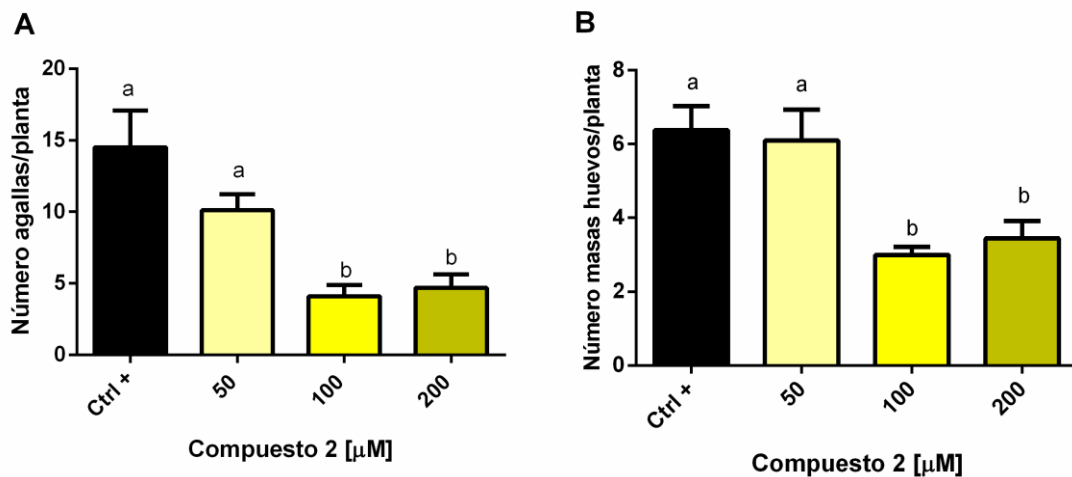


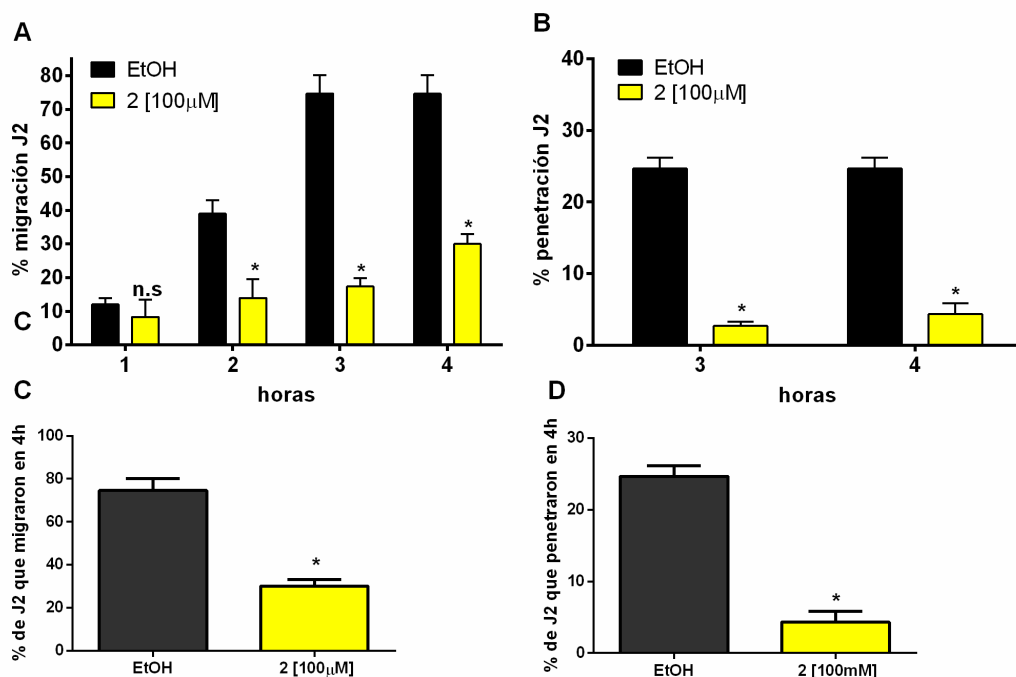
Figura 51. El compuesto 2 inhibe la infección por *M. incognita* en las plantas de tomate. Las plantas de tomate sin tratar (Ctrl +) o tratadas con concentraciones crecientes del compuesto 2 (50, 100 y 200 µM) se infectaron con 100 J2 y se crecieron sobre papel de filtro en bolsas plásticas como se describe en Materiales y Métodos (A) Número de agallas por sistema radicular. (B) Número de masas de huevos por sistema radicular. Los valores mostrados son la media de tres experimentos biológicos independientes con 10 plantas. Las barras de error representan la SEM. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0,05$).

El tratamiento con el compuesto 2 disminuyó significativamente el número de agallas por sistema radicular de una manera dosis-respuesta. Como se muestra en la Fig. 51 A, el compuesto 2 produjo a 100 µM y 200 µM una reducción estadísticamente significativa del 74% y 68 % en el número de agallas. Mientras que el tratamiento a una concentración de 50 µM no presentó ninguna diferencia significativa en comparación con las plantas de control (aunque hubo una tendencia de una reducción del 25% en el número de agallas). La Fig. 51 B muestra una disminución estadísticamente significativa

de 54 y 36% respectivamente en las masas de huevos por sistema radicular cuando las plantas de tomate se trataron con el compuesto **2** a 100 y 200 μM . En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con el compuesto **2** tiene un efecto inhibitorio sobre la infección por *M. incognita* incluso cuando el compuesto se aplica directamente a la planta. Probablemente esta respuesta sea una combinación de la capacidad del compuesto para interferir con el proceso de infección del parásito, así como una alteración en el desarrollo del ciclo de vida.

5.4.4 El compuesto **2** reduce la migración de J2 hacia la raíz de plantas de tomate

Para evaluar el efecto del compuesto **2** sobre la migración de *M. incognita* hacia la raíz de las plantas de tomate, se preparó una solución de agarosa 0,1% (que cumple la función de ser vehículo para que los J2 se desplacen hacia la raíz) conteniendo DMSO 0,02% como el control y por otro lado compuesto **2** en DMSO 0,02%. Se colocaron 60 μL de agarosa 0,1% en pocillos a los cuales se agregaron aproximadamente 100 J2 recientemente cosechados. Se incubaron los mismos a 28°C durante 4 h y posteriormente se colocaron sobre portaobjetos raíces de plantas de tomate de 5 días a las cuales se les agregaron los J2 previamente tratados a una distancia de 2 mm de la punta de la raíz para permitir que los mismos migren hacia la misma. A partir de ese momento se registraron fotográficamente las raíces de las plantas haciendo uso de una lupa y se determinó el número de J2 que migran y de los que ingresan a la raíz a cada hora, durante 4 h (Fig.52).



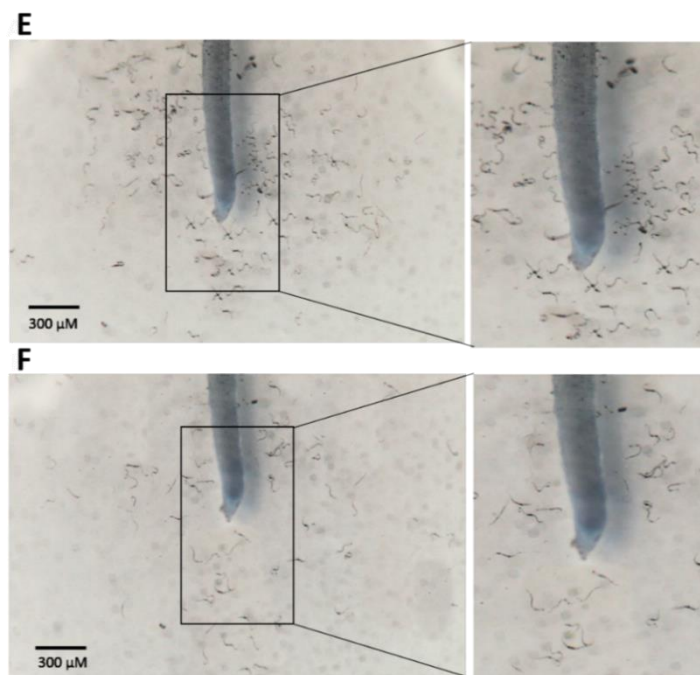


Figura 52. Reducción de la migración de los J2 tratados con el compuesto 2 (A) Porcentaje de migración de J2 hacia la raíz. (B) Porcentaje de penetración de J2 en la raíz. (C) Porcentaje de J2 que migraron y finalmente penetraron la raíz después de 4 h. (D) Porcentaje de J2 que entraron y finalmente penetraron en la raíz después de 4 h. Las fotografías muestran la migración de J2 tratados en respuesta a la punta de la raíz de tomate por un período de 4 h (barra de escala, 300 μ m). (E) Control no tratado, (F) J2 tratados con **2** [100 μ M]. Las fotografías fueron tomadas con la cámara Canon Rebel EOS T6 acoplada a la lupa Carl Zeiss aumento 20X y 50X respectivamente. Cada valor de la barra representa la media \pm desviación estándar de los experimentos por triplicado. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron utilizando una prueba T de Student con una $p < 0.05$

En la Fig. 52A se muestra el porcentaje de J2 que migraron en función del tiempo y en la Fig. 52C en número total de J2 que migraron en 4h, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de gusanos tratados con el compuesto **2** que migran hacia la raíz y el control, siendo un 50% menor que los del control. Los paneles B y D muestran un análisis similar pero determinando la penetración de los J2 en la raíz, la cual pudo ser observada a partir de la hora 3, determinándose que los gusanos tratados con el compuesto **2** penetraron un 80% menos que el control. Fotografías representativas de las plantas control se muestran en el panel E (control), y en el panel F de las plantas tratados con el compuesto **2**.

5.4.5 El compuesto 2 presenta un efecto de transgeneracional de letalidad embrionaria

Con el fin de estudiar el efecto a largo plazo del compuesto **2** en el ciclo de vida de *M. incognita*, se evaluó la eclosión de los huevos recuperados de las plantas de tomate tratadas con el compuesto **2**. Los huevos desarrollados dentro de las agallas de las plantas tratadas con el compuesto **2** a 100 μ M, así como las tratadas con DMSO, se

recolectaron e incubaron en agua durante 8 días a 28 ° C y al cabo de ese tiempo se determinó el porcentaje de eclosión de J2 (Fig. 53).

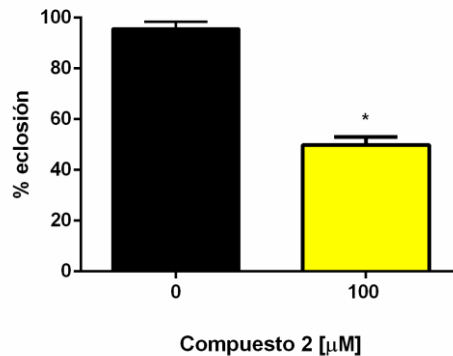


Figura 53. El compuesto 2 produce una disminución en la eclosión de los huevos de *M. incognita* purificados de plantas tratadas con el compuesto 2. Se obtuvieron huevos a partir de agallas de plantas no tratadas y tratadas con el compuesto 2 a 100 µM, se los incubó en agua por 8 días y se determinó el porcentaje de eclosión. Los valores mostrados son la media de tres experimentos biológicos independientes con 100 huevos. Las barras de error representan desviaciones estándar. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba t de Student. Las letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0,05$). Los asteriscos corresponden a diferencias significativas con el control.

Como se muestra en la Fig. 53, el 54 % de los huevos recolectados de plantas de tomate tratadas con el compuesto 2 no pudieron eclosionar en las mismas condiciones ensayadas que en 5.4. Este resultado apoya la idea de que el compuesto 2 tiene un efecto no solo en la infección de *M. incognita*, reflejado en el menor número de agallas y de masas de huevos, sino que también posee un efecto sobre las hembras que producen dichos nódulos, ya que más de la mitad de los huevos resultaron incapaces de eclosionar. Dos posibles escenarios podrían explicar este resultado, el primero es que el compuesto 2 afecta el desarrollo de la hembra y, en consecuencia, su viabilidad. La segunda es que el compuesto 2 aún persiste después de 45 días de tratamiento en la planta y puede afectar a los embriones durante su desarrollo en la masa de huevos. Estos datos confirman que el compuesto 2 es un nuevo potencial nematicida con un posible mecanismo de doble acción.

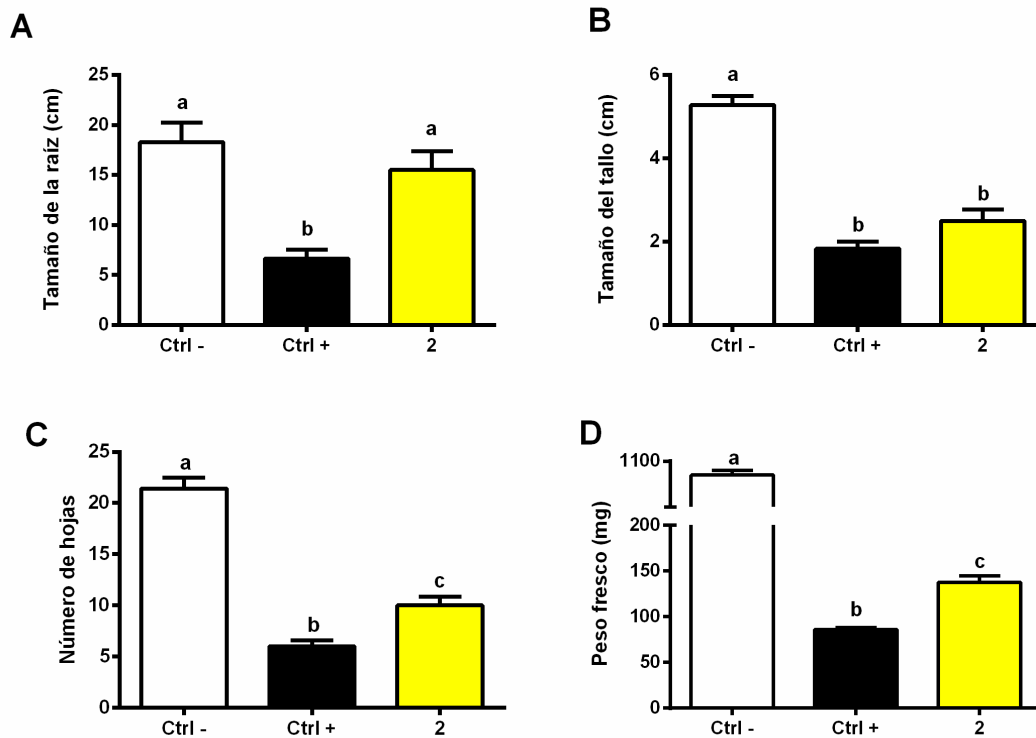
5.4.6 El tratamiento con el compuesto 2 mejora los parámetros de crecimiento de las planta de tomate

Un compuesto nematicida útil debe tener un efecto negativo en el ciclo de vida y el desarrollo del parásito, pero no tener ningún efecto fitotóxico. Además, las moléculas nematicidas deberían poder controlar la infección del parásito, permitiendo un desarrollo completo de la planta con una producción de frutos económicos y rentables.

Para evaluar si el tratamiento de las plantas de tomate infectadas con *M. incognita* con el compuesto 2 produce no solo una disminución en el número de agallas

y de masas de huevos sino también una mejora en el estado general de la misma, se infectaron plantas de tomate tratadas con 100 μM del compuesto **2** en DMSO 0,2% (**2**) o con DMSO 0,2 % (Ctrl +) con 500 J2 y también se incluyó como control plantas sin infectar (Ctrl-). Se determinaron distintos parámetros de crecimiento, como el peso fresco de la planta, el tamaño de la raíz y el tallo y el número de hojas después de 35 días de la infección en las plantas tratadas con el compuesto **2** y el control (Fig. 54). Este ensayo se realizó como se indica en 4.4.4.

La Fig. 54 muestra que las plantas infectadas con *M. incognita* pretratadas durante 48 h con el compuesto **2** las cuales fueron crecidas primero en papel de filtro y posteriormente crecidas en macetas presentan un mejoramiento estadísticamente significativo en sus parámetros de crecimiento con respecto a las plantas infectadas y no tratadas. Específicamente, la longitud de la raíz de las plantas tratadas resultó sólo un 17% menor que el de las plantas no infectadas, mientras que las plantas infectadas presentaron en promedio raíces cuya longitud fue un 61 % menor que las plantas control sin infectar (Fig. 54A).



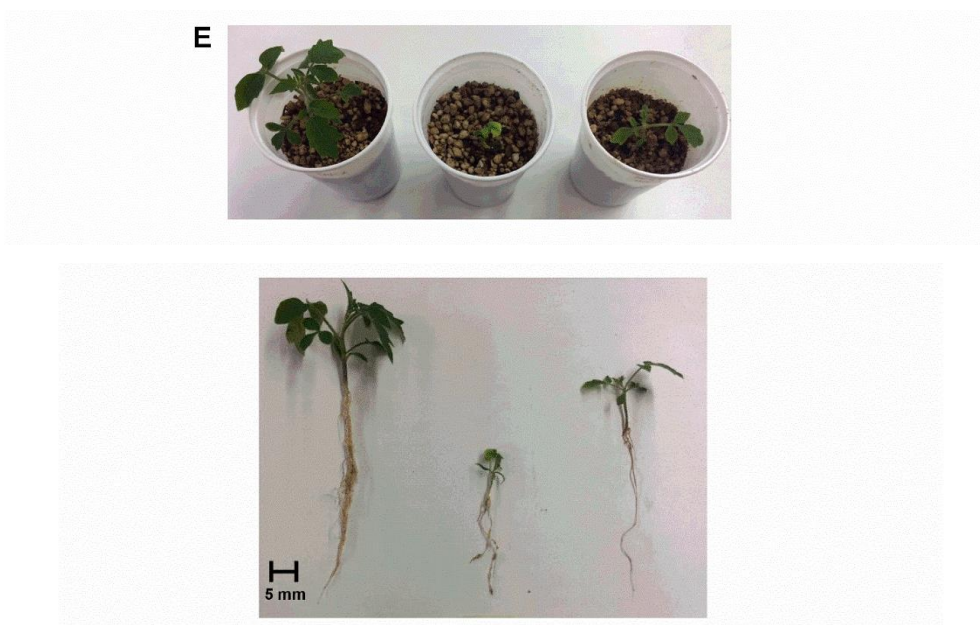


Figura 54. Mejoramiento de los parámetros de crecimiento en plantas de tomate pre tratadas con el compuesto 2 infectadas con *M. incognita*. Se determinaron diferentes parámetros de crecimiento de plantas de tomate no infectadas (Ctrl -), plantas infectadas (Ctrl +) sin tratar y tratadas con el compuesto 2 a 100 μ M. (A) Tamaño de la raíz, (B) Tamaño del tallo, (C) Número de hojas, (D) Peso fresco. Los valores mostrados son la media de tres experimentos biológicos independientes con 10 plantas. Las barras de error representan SEM, las letras distintas indican una diferencia significativa entre las medias ($P < 0,05$) analizadas con el test de Tukey. (E) Imágenes de experimentos de plantas de tomate sin infectar e infectadas sin tratar y tratadas con el compuesto 2 a 100 μ M respectivamente en ese orden.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el largo del tallo entre las plantas tratadas y no tratadas con el compuesto 2 (Fig. 54B). Por otro lado, se observó un aumento estadísticamente significativo del 50 % en el número de hojas y un 75 % en el peso fresco en plantas tratadas con el compuesto 2 y las plantas control (infectadas sin tratar) (Fig. 54 C y D). No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los parámetros de plantas tratadas con el compuesto 2 y no tratadas y ambas sin infectar demostrando la inocuidad del compuesto en la planta (datos no mostrados). Este resultado comprobó que la mejora en las plantas infectadas tratadas con el compuesto 2 se debió solo al efecto del compuesto en el ciclo de vida de *M. incognita* y no a un efecto inespecífico en el metabolismo de la planta.

Ensayos en genes reporteros en células de mamífero

A la luz de los resultados obtenidos con el compuesto 2 se ensayaron los compuestos sintetizados por el grupo del Dr. Ramírez a fin de analizar el posible uso de estas nuevas moléculas para controlar la infección en plantas. Comenzamos este análisis utilizando un sistema de genes reporteros en células de mamíferos como en

describió en el capítulo III, utilizando los plásmidos que codifican los genes homólogos a CeDAF-12 de *M. incognita* con el fin de expandir el repertorio de compuestos con potencial capacidad de controlar la infección por este parásito.

5.4.7 Evaluación de la actividad agonista sobre MINC10028 y MINC18013 en ensayos de genes reporteros.

Se estudió la actividad agonista de los compuestos **8-10** por un lado y los **6** y **7** sintetizados por el Dr. Burton por otro sobre MINC10028 y MINC18013 en un sistema de genes reporteros en células utilizando los plásmidos obtenidos en el capítulo III (3.1.2) y plásmido pGL3Luc bajo el control del promotor Let-70/atg7 (Fig. 55 A).

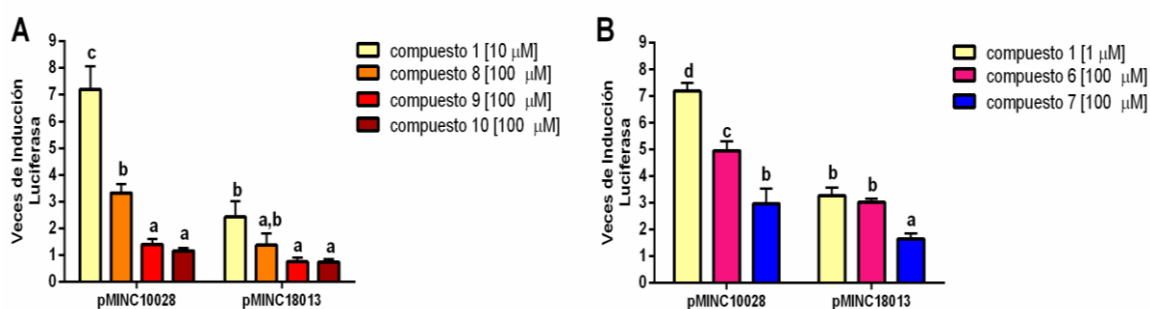


Figura 55: Los compuestos 8-10 y 6-7 presentan actividad agonista en ensayos de genes reporteros. Células co-transfectadas con el pMINC10028 y pMINC18013 y el pGL3-Luc en presencia de [10 μ M] del compuesto **1** como control y de los compuestos **8-10** [100 μ M] panel A, y de los compuestos **6** y **7** [100 μ M], panel B. El gráfico muestra las veces de inducción de la actividad, tomando como 1 el valor en las células sin tratar. Los valores se expresan como medias + SEM (n=3) de las veces de inducción respecto al control. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, letras diferentes indican una diferencia significativa entre las medias (P < 0.05).

Los resultados indican que los compuestos analizados que presentaron actividad agonista, la misma fue mayor cuando se utilizó el plásmido pMINC10028 que con el pMINC18013 (Fig. 55 A y 55 B). Los resultados obtenidos cuando se ensayaron los compuestos **8-10** mostraron que el compuesto **8** presentó una actividad agonista mayor que los compuestos **9** y **10** representando casi un 40% del control, mientras que las de los compuesto **9** y **10** fueron cercanas al control (Fig. 55 A). Cuando se ensayaron los compuestos **6** y **7**, que son estructuralmente más parecidos a los ligandos endógenos mostraron una mayor actividad agonista, correspondiendo a un 69 y 41 % del control cuando se los ensayó con el pMINC10028 y el compuesto **7** presentó una actividad comparable al control cuando se lo ensayó con el pMINC18013.

5.4.8 Los compuestos 8-13 no logran reducir el porcentaje de eclosión ni la mortalidad de J2

Con la finalidad de evaluar si los compuestos que presentaron actividad agonista en el punto anterior podrían ser utilizados como nematicida sobre *M. incognita*, evaluamos la actividad de los compuestos **8-13** sobre la eclosión y la mortalidad de J2, de la misma manera que en el punto 5.4.1.

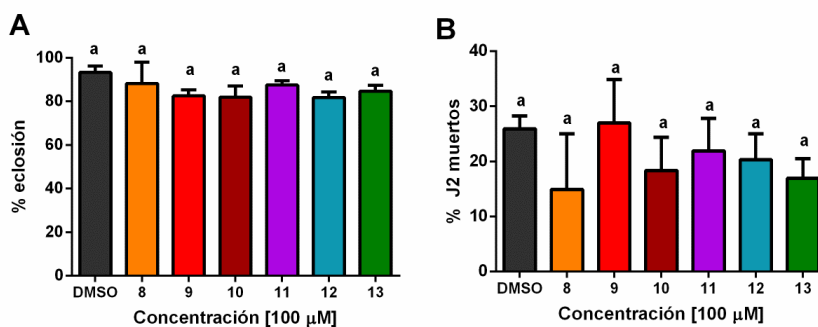


Figura 57. Los compuestos agonistas no producen inhibición de la eclosión de huevos de *M. incognita* y ni un aumento en la mortalidad de J2. (A) El porcentaje de eclosión se determinó después de 96 h de incubación de huevos de *M. incognita* purificados con 100 µM de los compuestos 8-13 en DMSO al 0.2% o DMSO al 0.2% como control. (B) El porcentaje de mortalidad se calculó después de 48 h de incubación de gusanos J2 en presencia de 100 µM de los compuestos 8-13 en DMSO al 0.2% o DMSO al 0.2% como control. Los valores mostrados son la media de tres experimentos biológicos independientes con 100 huevos. Las barras de error representan la SEM. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba de Tukey. En todos los casos, las letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre las medias ($P < 0.05$).

Como se observa en la Fig. 57 panel **A** no existen diferencias significativas en la eclosión entre los huevos tratados con los compuestos **8-13** y el control, y de la misma manera sucede en la Fig. 57 panel **B** donde no presentaron diferencias significativas entre el control y los J2 tratados con los compuestos **8-13** mostrando la ausencia de efecto en la mortalidad de los J2.

CONCLUSIONES

CAPITULO I: Evaluación de la actividad biológica de los análogos sintéticos de los ácidos dafacrónicos *in vitro* e *in vivo*.

Desde su introducción como modelo de estudio, *C. elegans* ha sido utilizado para investigar varios de los procesos biológicos enfocados a enfermedades humanas. Una de las características particulares de este nematodo es su capacidad de sobrevivir ante condiciones adversas mediante un estadio denominado *dauer*, el cual permite su supervivencia a largo plazo. La entrada en este estadio está fuertemente regulada por el receptor DAF-12. Los ligandos endógenos que interactúan con este receptor son oxisteroles llamados ácidos dafacrónicos (AD). Cuando un ligando agonista interacciona con el receptor DAF-12, promueve el desarrollo reproductivo, mientras que un ligando antagonista conlleva a un retraso en el desarrollo con permanencia en el estadio *dauer*. En trabajos anteriores del grupo de investigación del Dr. Burton, se sintetizaron análogos de los AD y se estudió su actividad en ensayos de genes reporteros e *in vivo*, identificándose compuestos con actividad agonista, por ejemplo el compuesto **1** y otros con actividad antagonistas como el compuesto **2**

En este capítulo se llevó a cabo la caracterización de los análogos sintéticos del receptor DAF-12, cuya síntesis y diseño se realizó en una primera parte, como dos análogos fluorados del compuesto **2**. La estrategia de síntesis consistió en el reemplazo del oxígeno del hidroxilo, por un átomo de flúor o también llamado reemplazo bioisostérico del hidroxilo C-24 por un grupo difluorometilo (compuesto **3**), lo cual le confirió una afinidad ligeramente mayor que la que presenta el compuesto **2** por el receptor DAF-12. Mientras que el compuesto **4**, que incorpora un doble enlace 24(25), el cual le confiere mayor rigidez, presentó una menor actividad antagonista tanto del compuesto **2** como del compuesto **3**. Adicionalmente, se realizó otra estrategia de síntesis fijando la orientación que adoptan los ligandos activos en el LBP del receptor DAF-12, mediante la formación de ciclos adicionales, con la finalidad de tener cadenas laterales conformacionalmente restringidas. Para lograrlo se incorporaron ciclos tipo pirano (compuesto **5**) que fijan una dada conformación en la cadena lateral, que confirió una débil actividad antagonista, menor a los compuestos anteriores. El análisis de ensayos *in vivo* mostró un retraso dependiente de la dosis en la maduración en estadios larvales progresivos para gusanos desarrollados en presencia de los compuesto **2**, **3**, **4** y **5**, siendo el compuesto **3** el de mayor actividad antagonista, inclusive mejor al utilizado como control (compuesto **2**). Mientras que en los ensayos de transactivación celular la actividad antagonista del compuesto **3** fue similar a la

observada para el compuesto **2** a la misma concentración, por lo que el reemplazo bioisostérico no cambió el perfil de actividad ni la potencia.

Por otro lado se sintetizaron los ácidos con el puente 20 β ,24-oximetileno (compuesto **6** y **7**) como posibles agonistas de DAF-12. En particular el compuesto **6** fue diseñado específicamente considerando el modo de unión en el LBP del ácido 27-nor-dafacrónico, otorgándole una conformación de silla estable. Los resultados de los ensayos tanto en genes reporteros como *in vivo*, mostraron no solo una significativa capacidad agonista, sino que superaron en eficiencia y potencia a su predecesor sintético utilizado como control (compuesto **1**), rescatando el fenotipo *dauer* y permitiendo el desarrollo de la cepa mutante incapaz de sintetizar lo AD hasta el estadio hermafrodita inclusive a una concentración de 0,1 μ M del compuesto **2** en un 95 y 98% para 1 y 10 μ M respectivamente.

Debido a que el compuesto **7**, es un estereoisómero del compuesto **6** que tiene una configuración diferente en uno solo de sus centros estereogénicos (en el C-24) y se encuentra orientado en sentido opuesto al compuesto **6**, no se esperaba que fuera capaz de interactuar correctamente en el bolsillo de unión al ligando del receptor DAF-12. Sin embargo, en los ensayos biológicos mostró una moderada actividad como agonista del receptor DAF-12, rescatando el fenotipo *dauer* y llegando al estadio adulto joven tan solo un 8 y 16% en presencia de 1 y 10 μ M respectivamente. Este efecto se debe a que el ciclo de seis miembros adopta una conformación de bote torcido que a pesar de ser inestable, le permite al carboxilato del esteroide tener una correcta interacción con residuos clave para la unión al LBP. Esto se observó gracias a las simulaciones realizadas por dinámica molecular realizadas por el grupo del Dr. Burton.

Con estos resultados podemos afirmar que los compuestos **6** y **7** son capaces de desencadenar la expresión de los genes bajo la regulación de DAF-12 y que son necesarios para promover la transición de larvas L2 *dauer* a hermafroditas en nematodos *daf-9* (*dh6*). Estos resultados pueden explicarse a la luz de los resultados descritos por Schaedel y colaboradores (25) en los que mostraron que los gusanos tienen un mecanismo que les permite evaluar e integrar los niveles hormonales en cada momento y determinar si se ha alcanzado el umbral para tomar la decisión de entrar en estadio *dauer* o comenzar el ciclo de vida reproductivo. Esta determinación podría tomarse al alcanzarse una cierta concentración de AD que resulta capaz de promover el intercambio de DAF-12/DIN-1 u otros complejos represores para formar complejos DAF-12/co-activadores (aún no han sido identificados). También se requieren concentraciones crecientes de AD para avanzar a estadios larvales de desarrollo progresivos (L2-L3-L4), a adulto y hembra hermafrodita. Es

decir estos compuestos son capaces de promover en distinta medida el intercambio del DIN-1 de los promotores que permiten la transición a estadios larvales sucesivos y el desarrollo a la adultez. Estos resultados fueron congruentes con los observados en ensayos en células de mamífero realizados en colaboración con la Dra. Del Fueyo en los que se determinó que los compuestos **1** y **6** poseen la misma potencia y eficacia. Además se demostró que el compuesto **6** no induce toxicidad ni afecta negativamente a la fertilidad de los gusanos salvajes, por el contrario, aquellos con el compuesto **6** pusieron casi el doble de huevos que los gusanos control a **1** a [10 μ M] y presentaron una mayor esperanza de vida media que los gusanos control aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Con estos resultados concluimos que la orientación y conformación de la cadena lateral afectan fuertemente la actividad como agonistas o antagonistas capaces de unirse al receptor DAF-12 por la vía canónica.

CAPITULO II: Nuevo repertorio de ligandos del RN DAF-12. Evaluación de la actividad biológica de compuestos con α -aminoacilamidas estructuralmente diversas como cadenas laterales.

Al igual que en el capítulo anterior, en el presente capítulo se evaluó la capacidad de los compuestos sintéticos análogos de AD para interaccionar con el receptor DAF-12. En esta ocasión, el grupo del Dr. Ramírez sintetizó una serie de compuestos esteroidales utilizando la estrategia de Ugi (48), la misma que les permitió obtener de una manera versátil y simple compuestos con α -aminoacilamidas estructuralmente diversas como cadenas laterales siendo las mismas estructuras significativamente más diversas que las de las hormonas endógenas o análogos descritos previamente por otros investigadores.

Los resultados de los ensayos tanto *in vivo* como en genes reporteros, mostraron que los compuestos **8**, **9**, **10** y **11** presentaron actividad agonista. Los ensayos *in vivo* mostraron que la cepa mutante incapaz de sintetizar lo AD desarrollada en presencia de los compuestos **8** y **9** alcanzaba estadio de adulto joven y en presencia de los compuestos **10** y **11** hasta el estadio L3, mientras que los compuestos **12** y **13** resultaron inactivos. Se confirmó la unión a DAF-12 de estos compuestos mediante ensayos de genes reporteros células. Los compuestos **8** y **9** presentaron una actividad agonista moderada, (siendo el compuesto **9** el más activo pero presentando una actividad del 40% del control a una concentración de 100 μ M), el compuesto **10** presentó una actividad muy leve y los compuestos **11**, **12** y **13** resultaron inactivos en las condiciones ensayadas. Continuamos

la caracterización de los mismos y estudiamos su actividad antagonista en la cepa salvaje *in vivo*, encontrando un resultado inesperado. Si bien no se observó diferencias en la velocidad en alcanzar los sucesivos estadios de desarrollo en los gusanos salvajes crecidos en presencia de los compuestos **11-13**, los gusanos tratados presentaron un tamaño mucho mayor que los gusanos controles desarrollados en ausencia del compuesto. DAF-12 es un regulador del metabolismo de lípidos, por lo que pensamos que la diferencia en tamaño podía deberse a su acumulación (83), Esto se comprobó mediante la técnica específica para teñir lípidos Oil Red (67). Además de este hallazgo, pudimos evidenciar que el efecto antagonista tenía efecto transgeneracional ya que el número de progenie obtenida en los gusanos tratados fue mucho menor comparada con el control en la siguiente generación. Se observó aumento significativo en la expectativa de vida en los gusanos tratados con los compuestos **9, 10 y 11** en concordancia con los efectos observados en sobre la fertilidad, es decir, aquellos compuestos que ejercen un mayor efecto negativo sobre la fertilidad, producen un aumento mayor sobre la esperanza de vida medio. Como se mencionó anteriormente, estos resultados se pueden interpretar en el contexto del modelo propuesto por Gerisch y colaboradores, donde la longevidad está determinada por señales de la línea germinal, donde se sintetizan en parte los AD, observándose un incremento en la expectativa de vida en aquellos gusanos a los que se les elimina la línea germinal por métodos físicos. (84). Por otro lado, los compuestos **8-13** en ensayos de genes reporteros en células, mostraron actividad antagonista presentando mayor actividad los compuestos **8** y **9**, y en orden decreciente los compuestos **10-13** por lo tanto, se sugiere una “promiscuidad” por parte del DAF-12 para la unión de los ligandos y su respectiva activación, ya que pueden unirse compuestos de estructura y tamaños muy distintos y así mismo presentar actividad agonista y antagonista frente al mismo receptor.

Como última parte, se realizaron ensayos *in silico* (realizados en colaboración con el Dr. Lautaro Álvarez), los cuales mostraron la flexibilidad del receptor DAF-12 para interactuar con los ligandos de cadenas estructurales diversas. Los resultados muestran que los ligandos más grandes pueden colocarse correctamente dentro del bolsillo de unión del ligando del receptor. Además, se estudió el comportamiento dinámico del complejo entre CeDAF-12 y el compuesto **9** usando simulaciones de dinámica molecular y se encontró un modo de enlace muy estable con tres interacciones clave de enlaces H entre el ligando y el receptor. La conformación del dominio AF-12, que es importante para la unión de los cofactores de la proteína, no se veía afectado por la presencia del compuesto **9**, un resultado que es consistente con la naturaleza agonista de este ligando.

Los resultados presentados en este capítulo confirman que el receptor DAF-12 es capaz de unir establemente compuestos con estructuras muy diversas, como las sintetizadas por el grupo del Dr. Ramírez, los cuales pueden presentar tanto actividad agonista como antagonista o ambas. Por otro lado, estos compuestos son capaces de promover respuestas diferentes sobre la elección del ciclo de vida, el desarrollo, la fertilidad y la expectativa de vida, siendo posible pensar que los mismos son capaces de unir selectivamente, co-activadores o co-represores distintos que activen distintas vías, como se propuso anteriormente.

CAPITULO III: Identificación y caracterización molecular de los genes ortólogos de *Cedaf-12* en *Meloidogyne incognita*

En este capítulo se identificaron mediante ensayos *in silico* dos genes *minc18013* y *minc10028* que codifican para dos receptores MiDAF-12, homólogas a *CeDAF-12* apoyando la idea de que una red endocrina mediada por AD es funcional en *M. incognita*. Además se realizó un modelado por homología tomando como templado la cadena A del receptor nuclear DAF-12 del nematodo parasitario *Strongyloides stercoralis* (cuya estructura está cristalizada) en complejo con su ligando fisiológico Δ -4 AD (88). Se confirmó mediante ensayos de genes reporteros las proteínas codificadas por ambos genes son capaces de unir los ligandos sintéticos

CAPITULO IV: Análisis del potencial uso de compuestos sintéticos análogos de los AD en el control de los procesos infectivos de *M. incognita*

En el presente capítulo, analizó el potencial uso de los compuestos sintéticos para modular el ciclo de vida y la infección de *M. incognita* en plantas de tomate. Se demostró que los compuestos **2-5** pueden inhibir la eclosión de los huevos y aumentar la mortalidad de los J2 infectivos, siendo el compuesto **2** el más efectivo, el cual además disminuyó la migración de los mismos hacia la raíz. Además, analizamos el efecto del compuesto **2** en plantas de tomate infectadas con *M. incognita*. Nuestros resultados indican disminuye tanto la cantidad de agallas y como las masas de huevos por sistema radicular en plantas de tomate pretratadas con el compuesto **2** causadas por la infección por estos parásitos. Además, estas plantas presentan una mejora general en varios parámetros de crecimiento, tales como: peso de la raíz y la parte aérea, tamaño de la raíz y el tallo y número de hojas. Asimismo, se observó un efecto transgeneracional de este compuesto, permitiendo, no solo

la disminución de los efectos causados por la infección sino también disminuir el inóculo de J2 infectivos en el suelo, que normalmente participan de un nuevo ciclo de infección. Por lo tanto, el compuesto **2** presenta actividad nematocida y es capaz de controlar en cierta medida la infección por *M. incognita* probablemente a través de la vía de señalización DAF-12. Estos hallazgos podrían guiar el descubrimiento y la optimización de nuevas drogas para el control de estas plagas emergentes.

REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

92. Guchhait SK, Priyadarshani G, Chaudhary V, Seladiya DR, Shah TM, Bhogayta NP. One-pot preparation of isocyanides from amines and their multicomponent reactions: Crucial role of dehydrating agent and base. *RSC Adv.* 2013;3(27):10867–74.
93. Rey J, O’Riordan TJC, Hu H, Snyder JP, White AJP, Barrett AGM. Design and Diastereoselective Synthesis of C-2,C-20-Diaryl Steroidal Derivatives. *European J Org Chem.* 2012 Jul .

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Síntesis de 24-difluorometil-4-colen-3-ona (compuesto 3)

La síntesis de los compuestos 3 y 4 fue realizada por el Dr. Cristian Rodríguez (75). Una suspensión de clorocromato de piridinio (56 mg, 0,26 mmol), carbonato de bario (26 mg, 0,1 mmol) y tamices moleculares de 3 Å (50 mg) en diclorometano seco (5 ml) se agitó a 25 ° C durante 5 minutos bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadió una solución de **11** (26 mg, 0,066 mmol) en diclorometano seco (5 ml) y la agitación continuó durante 40 min. La mezcla de reacción se diluyó con éter y se filtró a través de gel de sílice con hexano / acetato de etilo 95: 5. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente se purificó por MPLC (velocidad de flujo: 10 ml / min; hexano / acetato de etilo 100: 0 → 95: 5) para dar cetona **5** como un sólido blanco (24 mg, 0,061 mmol, 93%); P.f. 120 °C. RMN 1H δH: 5.79 (1H, tt, J = 57,0 y 4,5 Hz, H-CF₂); 5,72 (1H, br s, H-4); 2,42 (1H, m, H-2β); 2,39 (1H, m, H-6β); 2,33 (1H, m, H-2α); 2,27 (1H, m, H-6α); 2,03 (1H, m, H-12β); 2,02 (1H, m, H-1β); 1,85 (1H, m, H-7β); 1,84 (1H, m, H16α); 1,79 (2H, m, H-24); 1,69 (1H, m, H-1α); 1,62 (1H, m, H-15β); 1,52 (3H, m, H-23a, H-11α y H-8); 1,45 (1H, m, H-11β); 1,42 (1H, m, H-22a); 1,41 (1H, m, H-20); 1,33 (1H, m, H-23b); 1,18 (3H, s, H-19); 1,16 (1H, m, H-12α); 1,12 (1H, m, H-15α); 1,11 (1H, m, H-17); 1,09 (1H, m, H-22b); 1,03 (1H, m, H-7α); 1,02 (1H, m, H-14); 0,93 (3H, d, J = 6,6 Hz, H-21); 0,92 (1H, m, H-9); 0,71 (3H, s, H-18); ¹³C RMN δC: 199,6 (C-3); 171,6 (C-5); 123,8 (C-4); 117,4 (t, J = 239 Hz, CF₂); 55,84 (C-17); 55,80 (C-14); 53,7 (C-9); 42,4 (C-13); 39,6 (C-12); 38,6 (C-10); 35,7 (C-1); 35,6 (C-8); 35,5 (C-20); 35,3 (C-22); 34,5 (t, J = 20,5 Hz, C24); 34,0 (C-2); 32,9 (C-6); 32,0 (C-7); 28,1 (C-16); 24,1 (C-15); 21,0 (C-11); 18,7 (t, J = 5,5 Hz, C-23); 18,4 (C-21); 17,4 (C-19); 11,9 (C-18); ¹⁹F RMN δF: -115,71 (dt, J = 56,9 y 17,6 Hz, CF₂); HRMS-ESI: calculado por C₂₅H₃₉F₂O: 393,2963, resultó 393,2947.

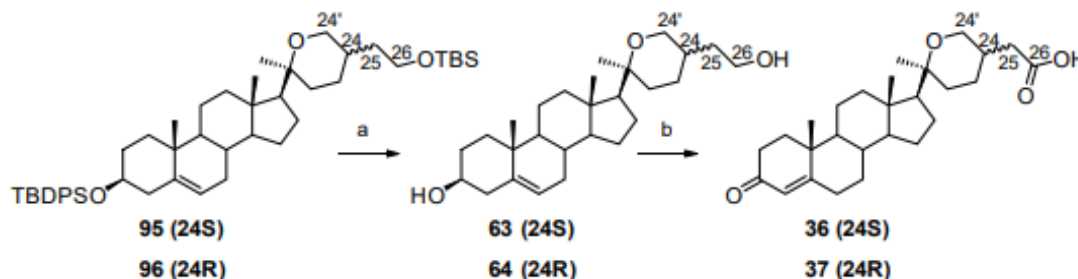
Anexo 2. Síntesis de 24-difluorometilideno-4-colen-3-ona (compuesto 4)

Una suspensión de clorocromato de piridinio (116 mg, 0,54 mmol), carbonato de bario (53 mg, 0,27 mmol) y tamices moleculares de 3 Å (100 mg) en diclorometano seco (10 ml) se agitó a 25 ° C durante 5 minutos bajo atmósfera de nitrógeno Una solución de alcohol **9** (53 mg, se añadieron 0,135 mmol) en diclorometano seco (8 ml) y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 40 min. La mezcla de reacción fue diluido con éter y filtrado a través de gel de sílice con hexano / etilo acetato 95: 5. El residuo obtenido después de la evaporación del disolvente fue purificado por MPLC (velocidad de flujo: 10 ml / min; hexano / acetato de etilo 100: 0 → 95: 5) para dar cetona

6 (46 mg, 0,118 mmol, 87%) como un blanco sólido; P.f. 110 °C; ^1H RMN δH : 5,73 (1H, br s, H-4); 4,10 (1H, dtd, $J = 25,6, 7,9$ y $2,6$ Hz, H-24); 2,42 (1H, m, H-2 β); 2,39 (1H, m, H6 β); 2,33 (1H, m, H-2 α); 2,27 (1H, m, H-6 α); 2,03 (2H, m, H-12 β y H-23a); 2,02 (1H, m, H-1 β); 1,89 (1H, m, H-23b); 1,85 (1H, m, H-16 α); 1,84 (1H, m, H-7 β); 1,70 (1H, m, H-1 α); 1,62 (1H, m, H-15 β); 1,54 (1H, m, C-20); 1,53 (1H, m, H-11 α); 1,46 (1H, m, H-22a); 1,45 (1H, m, H11 β); 1,41 (1H, m, H-8); 1,19 (3H, s, H-19); 1,17 (1H, m, H-12 α); 1,12 (1H, m, H-15 α and H-14); 1,10 (1H, m, H-22b); 1,03 (1H, m, H-7 α); 1,02 (1H, m, H-17); 0,94 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, H-21); 0,93 (1H, m, H-9); 0,72 (3H, s, H-18); ^{13}C RMN δC : 199,6 (C-3); 171,6 (C-5); 156,1 (dd, $J = 286$ y 284 Hz, CF_2); 123,8 (C-4); 78,3 (t, $J = 21,0$ Hz, C-24); 55,9 (C-14); 55,8 (C-17); 53,8 (C-9); 42,4 (C-13); 39,6 (C-12); 38,6 (C-10); 35,7 (C-1); 35,64 (C-20); 35,59 (t, $J = 5,6$ Hz, C-22); 35,2 (C-8); 34,0 (C-2); 32,9 (C-6); 32,0 (C-7); 28,1 (C-16); 24,1 (C-15); 21,0 (C-11); 19,0 (d, $J = 4,1$ Hz, C-23); 18,2 (C-21); 17,4 (C-19); 11,9 (C-18); 19F RMN δF : -89,73 (1F, br d, $J_{\text{FF}} = 49,7$, F_{trans}); -92,17 (1F, ddt, $J_{\text{FF}} = 49,8$, $3 J_{\text{FH}} = 25,6$ Hz, $4 J_{\text{FH}} = 1,9$ Hz, F_{cis}); HRMS-ESI: calculado por $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{F}_2\text{NaO}$: 413,2626, dió 413,2625.

Anexo 3. Obtención de los ácidos 6 y 7

A continuación se muestra la síntesis para la obtención de los compuestos **6** y **7** (compuestos **36** y **37** en la figura) realizada en la tesis doctoral de Ma. Celeste Del Fuego.



Esquema 1. Reactivos y condiciones: a) AcN, CH_2Cl_2 , HF; b) i. PCC, CH_2Cl_2 , BaCO_3 ; ii. MeOH, CH_2Cl_2 , HCl; iii. acetona, 0°C , Jones.

La desprotección de **95** y **96** para dar los dioles **63** y **64** respectivamente, se realizó por tratamiento con HF obteniéndose los alcoholes con 80 y 93% de rendimiento respectivamente (Esquema 1). Los ácidos **36** y **37** se obtuvieron por oxidación de **63** y **64** respectivamente. Como ya se había observado en el caso de la oxidación del alcohol **41**, para evitar la sobreoxidación del esteroide en la posición 6, la oxidación se realizó en tres pasos. Primero se oxidó con PCC para obtener la cetona en posición 3 y el

aldehído en C-26 y luego se acidificó el medio para promover la isomerización del doble enlace de $\Delta 5$ a $\Delta 4$. Finalmente se oxidó el aldehído en la posición 26 a ácido con el reactivo de Jones. De esta manera se obtuvieron los análogos de los ligandos del DAF-12, **36** y **37** (llamados compuestos **6** y **7** en esta tesis) con 50% y 57% de rendimiento respectivamente.

Anexo 4. Obtención de los compuestos mediante U-4CR

Síntesis del precursor del componente Ugi. Síntesis de ácido C20 (1).

Etil (3 β , 17 β) -3-hidroxiandrost-5-eno-17-carboxilato (2)

Se adaptó la técnica descrita en bibliografía (81). Se suspendió pregnenolona (4,00 g, 12,66 mmol) en piridina (10,4 ml) y se calentó a 90 °C hasta obtener una solución traslúcida, luego se agregó iodo (3,37 g, 13,28 mmol) en pequeñas porciones en un período de 30 minutos hasta obtener una solución marrón, la cual se reflujo por 1 hs. Una vez transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se filtró y el filtrado marrón se lavó con piridina (30 ml) y Et₂O (3x30 ml). El crudo se secó al vacío y se obtuvo un sólido anaranjado (5,75 g). Se agregó el crudo de ioduro de piridinio a una suspensión de metóxido de sodio (1,10 g, 16,09 mmol) en MeOH (20 ml) y dejó en reflujo suave durante 3 hs. Luego de reflujo, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se diluyó con agua destilada (30 ml) y se adicionó lentamente HCl (c, 0,6 ml). La mezcla fue filtrada y el filtrado se lavó con agua destilada (3x20 ml), luego se secó al vacío para obtener un sólido blanco **2** (2,29 g, 6,6 mmol, 52% rendimiento). Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los descritos en bibliografía.

Etil (17 β) -3-oxoandrost-4-eno-17-carboxilato (3)

Se adaptó la técnica descrita en la bibliografía (81). Se reflujo una solución de **2** (2,29 g, 6,6 mmol) en tolueno (100 ml) y N-bencilpiperidona (5 ml) durante 2 h, se destilaron 40 ml de tolueno usando la trampa de Dean-Stark. Se agregó isopropóxido de aluminio (1.5 g, 7.37 mmol) y se dejó reflujo a 140°C durante 2 hs. A la mezcla de reacción se la lavó con HCl (5%, 2x50 ml) y se extrajo con tolueno (2x20 ml). Se juntaron las fases orgánicas, se lavó con NaCl (ss, 2x50 ml) y se evaporó al vacío para obtener un aceite amarillo, que luego se recristalizó en Et₂O para obtener un sólido blanco **3** (1,56 g, 4,53 mmol, 69% rendimiento). Los datos de RMN ¹H y ¹³C fueron coincidentes con los descritos en bibliografía.

Ácido (17 β) -3-oxoandrost-4-eno-17-carboxílico (1) (compuesto 8)

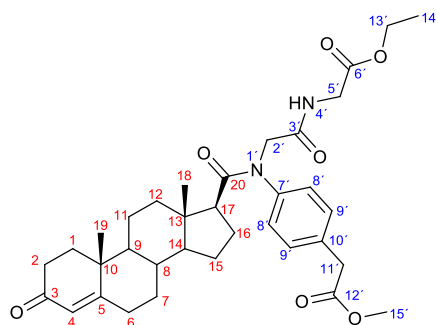
Se adaptó la técnica descrita en bibliografía (81). Se agregó KOH (0,68 g, 12,17 mmol) a una suspensión de **3** (1,27 g, 3,68 mmol) en MeOH (4 ml) y agua destilada (2 ml), se reflujo la mezcla durante 4 h a 110°C. Luego, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente, y se diluyó con agua destilada (0,5 ml). Se acidificó la mezcla hasta pH 1 mediante el agregado lento de 5 ml HCl (c). Se purificó el compuesto crudo mediante cromatografía de sílica gel (elución: 20% de acetato de etilo en cloroformo), obteniendo un sólido blanco **1** (0,48 g, 1,52 mmol, 99% rendimiento). Los datos de RMN ^1H y ^{13}C fueron coincidentes con los controles.

Procedimiento general para la reacción de Ugi.

Se adaptó la técnica descrita en las referencias bibliográficas. Se disolvió el ácido **1** (1 eq.) en solvente (2 ml cada 1 eq. de **1**) en presencia de formaldehído (1.1 eq.) y la **amina** correspondiente (1.1 eq.). Luego de agitar durante 1 h. se agregó el **isonitrilo** elegido (1.1 eq.) y se dejó reaccionando 72 h. a 28°C. Se evaporó el crudo de reacción, se redisolvió y se purificó por columna cromatográfica de sílica gel como se indica en cada caso.

*Etil N- [4- (2-metoxi-2-oxoetil) fenil] - N - {[(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} glicilglicinato (**4a**)*

Se partió del ácido **1** (50 mg, 158 μmol), formaldehído (17 μL , 174 μmol), **8** (27 μg , 174 μmol) y **11** (20 μL , 174 μmol) en EtOH (2 ml). Se purificó por columna cromatográfica de sílica gel (elución: 20% acetato de etilo en CH_2Cl_2), obteniendo **4a** (31 mg, 32% rendimiento). Aceite amarillo.

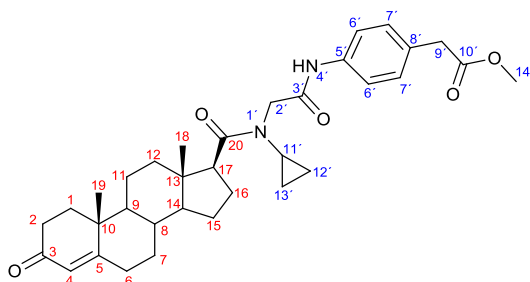


RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,30 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,21 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 6,84 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H), 5,67 (s, 1H), 4,41 (d, $J = 15,2$ Hz, 1H), 4,21 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 4,17 (d, $J = 15,2$ Hz, 1H), 4,07 (dd, $J = 5,5, 18,3$ Hz, 1H), 4,00 (dd, $J = 5,0, 18,3$ Hz, 1H), 3,70 (s, 3H), 3,63 (s, 2H), 2,51 (t, $J = 9,3$ Hz, 1H), 2,44-2,08 (m, 5H), 2,00-1,30 (m, 10H), 1,28 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,14 (s, 3H), 0,96-0,58 (m, 4H), 0,85 (s, 3H).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 199.66, 175.15, 171.67, 171.29, 169.82, 169.31, 142.32, 134.09, 130.90, 130.73, 128.29, 123.92, 123.69, 61.63, 55.42, 54.52, 53.57, 52.32, 51.85, 45.54, 41.43, 40.71, 38.70, 38.11, 35.80, 35.59, 34.06, 32.92, 32.06, 26.23, 24.72, 20.91, 17.45, 14.30, 13.89. HRMS (ESI) m/z calculado por $(\text{M}+\text{H})^+$ $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_7$: 607.3378, dió: 607.3390.

*metil {4 - [(N-ciclopropil-N - {[[(17 β)] -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} glicil) amino] fenil} acetato (**4b**)*

Se partió del ácido **1** (50 mg, 158 μmol), formaldehido (17 μL , 174 μmol), **12** (12 μL , 174 μmol) y **10** (31mg, 174 μmol) en MeOH (2 ml). Se purificó por columna cromatográfica de sílica gel (elución: 40% acetato de etilo en ciclohexano), obteniendo **4b** (48 mg, 63% rendimiento). Sólido blanco, P.f. 102-103 $^\circ\text{C}$.

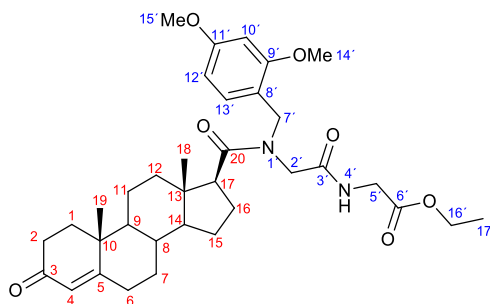


RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,78 (s, 1H), 7,42 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,17 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 5,73 (s, 1H), 4,15 (q, $J = 14,6$ Hz, 2H), 3,67 (s, 3H), 3,56 (s, 2H), 3,27 (t, $J = 8,9$ Hz, 1H), 2,93 (m, 1H), 2,45-2,12 (m, 5H), 2,05-1,44 (m, 10H), 1,41-1,20 (m, 2H), 1,18 (s, 3H), 1,10-0,80 (m, 5H), 0,85 (s, 3H).

RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 199,64, 178,35, 172,16, 171,17, 168,34, 137,14, 129,84, 129,68, 124,02, 120,03, 56,06, 54,44, 53,88, 52,16, 52,06, 46,11, 40,68, 38,95, 38,74, 35,85, 35,72, 34,08, 32,93, 32,27, 32,15, 27,03, 25,68, 24,85, 21,06, 17,51, 14,26, 11,77, 8,68. HRMS (ESI) m/z calculado por $(\text{M}+\text{H})^+$ $\text{C}_{34}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_5$: 561,3323, dió: 561,3337.

*N- (2,4-dimetoxibencil) -N - {[[(17 β)] -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} glicilglicinato de etilo (**4d**)*

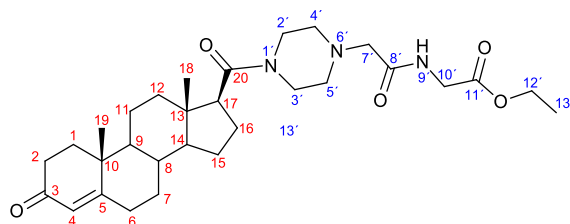
Se partió del ácido **1** (100 mg, 316 μmol), formaldehido (34 μL , 348 μmol), **13** (48 μL , 348 μmol) e **11** (38 μL , 348 μmol). Se purificó por columna cromatográfica de sílica gel (elución: 50% acetato de etilo en ciclohexano a 80% acetato de etilo en ciclohexano), obteniendo **4d** (122 mg, 65% rendimiento). Aceite amarillo.



RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6,90 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 6,71 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 6,41 (m, 2H), 5,70 (s, 1H), 4,96 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H), 4,41 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 4,23 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 4,18 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 4,10 (q, $J = 7,1$ Hz, 1H), 3,95 (dd, $J = 3,2, 5,2$ Hz, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,51 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 2,92 (t, $J = 8,8$ Hz, 1H), 2,44-2,22 (m, 5H), 2,07- 1,30 (m, 11H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,17 (s, 3H), 1,06-0,91 (m, 2H), 0,83 (s, 3H), RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 199,59, 175,12, 171,21, 169,63, 160,87, 158,46, 128,94, 123,96, 116,46, 103,95, 98,76, 61,49, 60,47, 55,88, 55,49, 55,46, 53,83, 50,99, 49,74, 48,23, 45,52, 41,40, 38,79, 38,71, 35,82, 35,79, 34,04, 32,92, 32,12, 26,10, 24,81, 21,13, 17,46, 14,24, 14,02. HRMS (ESI) m/z calculado por $(\text{M}+\text{H})^+$ $\text{C}_{35}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_7$: 609,3534, dió: 609,3516.

N - [(4 - {[[(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} piperazin-1-il) acetil] glicinato de etilo (**4c**)

Se partió del ácido **1** (50 mg, 158 μmol), formaldehido (17 μl , 174 μmol), **11** (17 μl , 174 μmol) e **17** (19 μl , 174 μmol). Se purificó por columna cromatográfica de sílica gel (elución: 40% acetato de etilo en ciclohexano), obteniendo **4c** (55 mg, 63% rendimiento). Aceite anaranjado.



RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,54 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 5,70 (s, 1H), 4,19 (m, 4H), 4,04 (m, 3H), 3,73 (s,a, 1H), 3,60 (s,a, 2H), 3,55 (s,a, 1H), 3,05 (s, 2H), 2,70-2,21 (m, 12H), 1,90-1,27 (m, 9H), 1,26 (m, 2H), 1,16 (s, 3H), 0,74 (s, 3H).

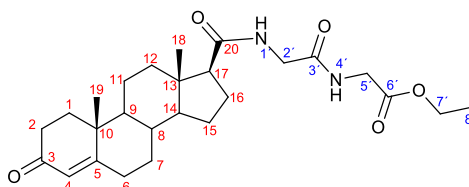
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 199,52, 171,86, 171,08, 170,65, 170,50, 170,20, 170,14, 170,02, 169,98, 169,95, 168,80, 123,97, 61,61, 61,55, 61,50, 61,30, 61,26, 61,24, 60,72, 59,25, 55,96, 54,02, 53,84, 53,57, 53,55, 53,24, 53,18, 52,94, 50,74, 46,15, 45,01, 42,18, 40,81, 40,79, 38,76, 38,66, 35,80, 35,76, 34,02, 32,87, 32,07, 25,56, 24,70, 21,08, 17,44,

14,31, 14,27, 14,23, 13,91. HRMS (ESI) m/z calculado por $(M+H)^+$ $C_{30}H_{46}N_3O_5$: 528,3432, dió: 528,3438.

Clivaje del grupo dimetoxibencilo de **4d**

N - {[(17β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} glicilcinato de etilo (**4e**)

Se adaptó la técnica descrita en la referencia bibliográfica (92). Se disolvió **4d** (62 mg, 101 μ mol) en CH_2Cl_2 (2 ml), y luego se agregó TFA (0.5 ml) observándose una solución de color rosada. Se agitó la mezcla por 1:30 hs. se evaporó a sequedad y luego se realizaron 15 evaporaciones con un pequeño volumen de CH_2Cl_2 para evaporar la mayor cantidad de TFA posible. Se purificó el compuesto crudo mediante cromatografía de sílica gel (elución: 60% de acetato de etilo en éter de petróleo a acetato de etilo), obteniendo **4e** (33 mg, 72 μ mol, 71% rendimiento). Aceite anaranjado.



RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6,97 (t, $J= 5,4$ Hz, 1H), 6,31(t, $J= 5,2$ Hz, 1H), 5,71 (s, 1H), 4,19 (q, $J= 7,1$ Hz, 2H), 4,04 (dd, $J= 5,2, 16,5$ Hz, 1H), 4,01 (d, $J= 5,3$ Hz, 1H), 4,00 (d, $J= 5,3$ Hz, 1H), 3,97 (dd, $J= 5,2, 16,5$ Hz, 1H), 2,44-2,14 (m, 6H), 2,05-1,99 (m, 2H), 1,87-1,29 (m, 9H), 1,26 (t, $J= 7,1$ Hz, 3H), 1,16 (s, 3H), 1,15-0,92 (m, 3H), 0,71 (s, 3H), RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 199,66, 173,52, 171,21, 169,65, 169,61, 124,00, 61,67, 56,72, 55,61, 53,83, 44,02, 43,14, 41,43, 38,71, 38,21, 35,81, 35,72, 34,04, 32,89, 32,02, 24,51, 23,65, 21,02, 17,47, 14,24, 13,32.

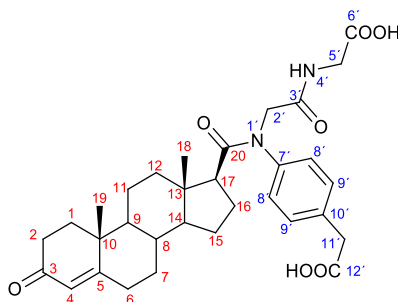
HRMS (ESI) m/z calculado por $(M+H)^+$ $C_{26}H_{39}N_2O_5$: 459,2853, dió: 459,2849.

Síntesis general de la hidrólisis de las cadenas laterales:

Se adaptó la técnica descrita en la referencia bibliográfica (93). Se disolvió el **éster** proveniente de la reacción de Ugi (1 eq.) en MeOH de calidad HPLC (1 ml cada 1 eq. de éster) y K_2CO_3 (ss, 1 ml cada 1 eq. de éster) y se dejó agitando a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Luego se evaporó el MeOH para reducir el volumen, se llevó a pH 7 con HCl y se extrajo con AcOEt (5x10 ml). La fase orgánica se lavó con agua destilada (5x5 ml), se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente a presión reducida para obtener, sin necesidad de más purificación, el ácido correspondiente.

N- [4- (carboximetil) fenil] -*N* - {[(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} glicilglicina (**compuesto 10**)

Se disolvió el éster Etil *N*- [4- (2-metoxi-2-oxoetil) fenil] -*N* - {[(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} glicilglicinato (23 mg, 37.91 μ mol) en MeOH de calidad HPLC (1 ml) y K_2CO_3 (ss, 1 ml). Se obtuvo el ácido **5a** (16 mg, 75% rendimiento). Sólido amarillo, P.f. 174-177 °C (d).

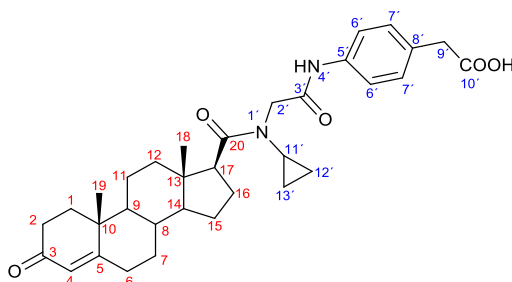


RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3+CD_3OD$) δ 7,25 (d, $J= 6,7$ Hz, 2H, H-9'), 7,16 (s,a, 2H, H-8'), 5,61 (s, 1H, H-4), 4,34 (d, $J= 15,2$ Hz, 1H, H-2'a), 4,10 (d, $J= 15,2$ Hz, 1H, H-2'b), 3,93 (m, 2H, H-5'), 3,55 (s, 2H, H-11'), 2,47 (t, $J= 7,2$ Hz, 1H, esteroide), 2,38-2,12 (m, 5H, esteroide), 2,09-1,15 (m, 15H, esteroide), 1,08 (s, 3H, H-19), 0,90-0,55 (m, 2H, esteroide), 0,76 (s, 3H, H-18).

RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3+CD_3OD$) δ 200,74 (C-3), 175,22 (C-20), 173,58 (C-12), 172,78 (C-5), 171,52 (C-6'), 169,39 (C-3'), 142,05 (C-7'), 134,46 (C-10'), 130,64 (C-9'), 128,10 (C-8'), 123,46 (C-4), 55,26, 53,94 (C-2'), 53,41, 51,69, 45,47, 41,14 (C-5'), 40,68 (C-11'), 38,68, 37,91, 35,49, 35,43, 33,78, 32,88, 31,93, 29,69, 26,00, 24,55, 20,75, 17,26 (C-19), 13,62 (C-18). HRMS (ESI) m/z calculado por $(M+H)^+$ $C_{32}H_{41}N_2O_7$: 565.2908, dió: 565.2920.

Ácido {4 - [(*N*-ciclopropil-*N* - {[(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} glicil) amino] fenil} acético (**compuesto 9**)

Se disolvió el éster Etil *N*- [4- (2-metoxi-2-oxoetil) fenil] -*N* - {[(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} glicilglicinato (40,9 mg, 72,94 μ mol) en MeOH de calidad HPLC (2 ml) y K_2CO_3 (ss, 2 ml), Se obtuvo el ácido **5b** (34 mg, 83% rendimiento). Sólido blanco, P.f. 152-156 °C

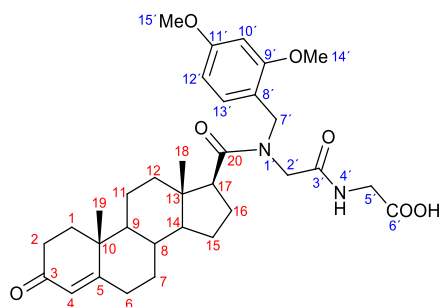


RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8,94 (s, 1H, H-4'), 7,34 (d, $J= 8,0$ Hz, 2H, H-6'), 7,09 (d, $J= 8,0$ Hz, 2H, H-7'), 5,73 (s, 1H, H-4), 4,29 (d, $J= 15,0$ Hz, 1H, H-2'a), 4,05 (d, $J= 15,0$ Hz, 1H, H-2'b), 3,52 (s, 2H, H-9'), 3,30 (t, $J= 9,1$ Hz, 1H, esteroide), 2,98 (m, 1H, H-11'), 2,46-2,25 (m, 4H, esteroide), 2,19-1,97 (m, 3H, esteroide), 1,89-1,18 (m, 10H, esteroide), 1,17 (s, 3H, H-19), 1,10-0,84 (m, 6H, esteroide, H-12', H-13'), 0,82 (s, 3H, H-18).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 199,85 (C-3), 178,30 (C-20), 176,15 (C-10'), 171,42 (C-5), 168,27 (C-3'), 137,12 (C-5'), 129,76 (C-7', C-8'), 124,00 (C-4), 120,13 (C-6'), 56,09, 53,90 (C-2'), 51,99, 46,30, 41,00 (C-9'), 38,89, 38,77, 35,84, 35,73, 34,07, 32,97, 32,36, 32,17, 29,83, 25,62, 24,86, 21,09, 17,51 (C-19), 14,20(C-18), 12,07 (C-12'), 8,81 (C-13'). HRMS (ESI) m/z calculado por $(\text{M}+\text{H})^+$ $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_5$: 547,3166, dió: 547,3190.

N- (2,4-dimetoxibencil) -*N* - {[(17 β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil} glicilglicina (**compuesto 12**)

Se disolvió el éster **4d** (42 mg, 72.32 μmol) en MeOH de calidad HPLC (2ml) y K_2CO_3 (ss, 2ml). Se obtuvo el ácido **5d** (33.3 mg, 85% rendimiento). Sólido naranja, P.f. 115-118 $^\circ\text{C}$.



RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6,92 (d, $J= 8,9$ Hz, 1H, H-13'), 6,83 (t, $J= 4,8$ Hz, 1H, H-4'), 6,43 (m, 2H, H-10', H-12'), 5,73 (s, 1H, H-4), 5,00 (d, $J= 16,2$ Hz, 1H, H-7'a), 4,41 (d, $J= 15,5$ Hz, 1H, H-2'a), 4,25 (d, $J= 16,2$ Hz, 1H, H-7'b), 4,07 (dd, $J= 5,5, 18,2$ Hz, 1H, H-5'a), 3,90 (dd, $J= 4,9, 18,2$ Hz, 1H, H-5'b), 3,79 (s, 3H, H-15'), 3,77 (s, 3H, H-14'), 3,53 (d, $J= 15,5$ Hz, 1H, H-2'b), 2,97 (t, $J= 8,5$ Hz, 1H, esteroide), 2,45-2,22 (m, 5H, esteroide),

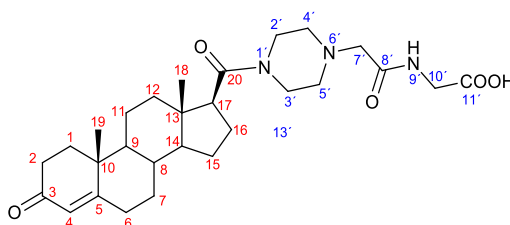
2,10-1,82 (m, 2H, esteroide), 1,76-1,19 (m, 10H, esteroide), 1,17 (s, 3H, H-19), 1,06-0,91 (m, 2H, esteroidee), 0,80 (s, 3H, H-18).

RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 200,05 (C-4), 175,51 (C-20), 172,11 (C-5), 171,68 (C-6'), 169,82 (C-3'), 161,05 (C-11'), 158,58 (C-9'), 129,29 (C-13'), 123,97 (C-5), 116,22 (C-8'), 104,09 (C-12'), 98,85 (C-10'), 55,92, 55,55, 53,86, 51,05, 49,61 (C-2'), 48,68 (C-7'), 45,83, 41,48 (C-5'), 38,77, 35,82, 33,99, 32,98, 32,15, 26,02, 24,83, 21,16, 17,47 (C-19), 13,96 (C-18).

HRMS (ESI) m/z calculado por (M+H)⁺ C₃₃H₄₅N₂O₇: 581.3221, dió: 581.3204.

N - [(4 - [(17β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil] piperazin-1-il) acetil] glicina (**compuesto 11**)

Se disolvió el éster **4c** (55 mg, 104.22 μmol) en MeOH de calidad HPLC (3ml) y K₂CO₃ (ss, 3ml). Se obtuvo el ácido **5c** (44 mg, 85% rendimiento). Aceite amarillo.



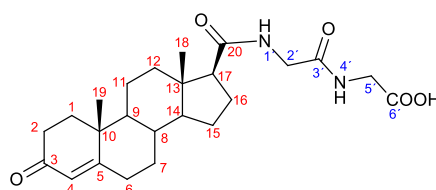
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ 5,64 (s, 1H, H-4), 3,63 (s, 3H, H-10', H-2'a), 3,54 (b,s, 3H, H-2'b, H-3'), 2,96 (s, 2H, H-7'), 2,63 (t, *J*= 8,8 Hz, 1H, esteroide), 2,55-2,16 (m, 10H, esteroide, H-4', H-5'), 1,94 (m, 1H, esteroide), 1,79-1,17 (m, 10H, esteroide), 1,10 (s, 3H, H-19), 1,01-0,83 (m, 2H, esteroide), 0,66 (s, 3H, H-18).

RMN¹³C (126 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ 200,55 (C-3), 179,70 (C-20), 175,50 (C-11'), 172,26 (C-5), 170,96 (C-8'), 123,59 (C-4), 60,97 (C-7'), 55,75, 53,91 (C-5'), 53,70, 53,26 (C-4'), 50,58, 46,04 (C-3'), 45,00, 43,48 (C-10'), 42,03 (C-2'), 38,64, 38,52, 35,61, 35,55, 33,75, 32,82, 31,92, 25,38, 24,55, 24,03, 20,94, 17,24 (C-19), 13,69 (C-18).

HRMS (ESI) m/z calculado por (M+H)⁺ C₂₈H₄₂N₃O₅: 500,3119, dió: 500,3104.

N - [(17β) -3-oxoandrost-4-en-17-il] carbonil] glicilglicina (**compuesto 13**)

Se disolvió el éster **4e** (61 mg, 133 μmol) en MeOH de calidad HPLC (2 ml) y K₂CO₃ (ss, 2 ml). Se obtuvo el ácido **5e** (40.6 mg, 71% rendimiento). Aceite marrón.



RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ 5,69 (s, 1H, H-4), 3,98 (d, *J*= 4,9 Hz, 2H, H-5'), 3,93 (s, 2H, H-2'), 2,43-2,06 (m, 6H, esteroide), 1,98 (m, 2H, esteroide), 1,86-1,21 (m, 9H, esteroide), 1,14 (s, 3H, H-19), 1,07-0,88 (m, 3H, esteroide), 0,67 (s, 3H, H-18),
RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃+CD₃OD) δ 200,42 (C-3), 173,92 (C-20), 172,19 (C-5), 171,67 (C-6'), 169,53 (C-3'), 123,75 (C-4), 56,58 (C-17), 55,49 (C-14), 53,74 (C-9), 44,04 (C-13), 42,56 (C-2'), 41,24 (C-5'), 38,72 (C-10), 38,00 (C-2), 35,65 (C-8 y C-1), 33,87 (C-6), 32,89 (C-7), 31,94 (C-12), 24,45 (C-15), 23,53 (C-16), 20,93 (C-11), 17,36 (C-19), 13,22 (C-18). HRMS (ESI) *m/z* calculado por (M+H)⁺ C₂₄H₃₅N₂O₅: 431,2540, dió: 431,2549.

Anexo 5. Tabla S1. Receptores de hormona en *M. incognita*

ESTs	c-Value	PF00104				PF00105				
		aligment		HMM		Aligment		HMM		
		from	to	from	to	from	to	from	to	
Minc00914a	3,40E-15	309	465	1	162	3,90E-20	91	156	2	69
Minc01325	8,70E-27	228	410	1	158	1,40E-22	9	77	2	70
Minc02050	1,80E-19	292	438	1	142	1,10E-17	63	129	2	68
Minc02055	8,00E-17	298	434	1	132	8,50E-19	70	136	2	68
Minc02316	2,20E-33	256	426	1	163	8,50E-18	49	95	24	70
Minc02318	6,70E-27	344	514	2	164	5,70E-31	131	198	2	69
Minc02855	5,20E-09	466	624	1	152	2,60E-16	13	81	2	69
Minc03121	1,60E-09	288	359	59	129	8,90E-15	7	82	1	70
Minc03122	1,20E-12	287	366	56	134	7,70E-16	7	81	1	70
Minc03124	2,70E-09	286	360	55	128	5,60E-16	8	82	2	70
Minc03929	1,90E-08	558	619	91	152	2,60E-17	275	339	2	70
Minc03951	4,60E-11	287	364	57	133	2,60E-16	7	81	1	70
Minc04628	4,10E-12	781	918	1	132	8,50E-12	566	636	7	70
Minc04725	2,00E-17	301	454	1	149	4,70E-20	69	136	2	69
Minc04734	5,80E-12	831	907	57	132	7,40E-12	555	625	7	70
Minc04767	1,50E-11	280	356	56	131	2,70E-13	8	86	2	70
Minc05571	2,40E-12	320	425	51	155	5,80E-09	8	77	2	69
Minc05754	1,60E-33	189	359	1	163	1,20E-14	2	42	25	65
Minc05938	1,90E-09	293	397	58	142	9,20E-14	8	88	2	70
Minc05939	1,20E-10	260	338	57	134	1,10E-15	7	88	1	70
Minc05946	1,20E-10	288	360	56	127	3,30E-16	8	83	2	70
Minc05948	2,30E-12	236	366	10	134	8,20E-16	7	81	1	70
Minc05949	6,20E-10	288	361	59	131	1,70E-15	7	82	1	70
Minc05953	1,00E-09	293	370	57	133	4,10E-14	8	86	2	70
Minc05954	1,20E-11	289	367	57	134	1,90E-15	5	85	1	70
Minc05955	4,80E-11	303	379	57	132	3,30E-16	7	82	1	70
Minc06609	6,90E-14	310	448	1	142	1,60E-19	82	147	2	69
Minc06656	3,30E-12	234	371	1	133	2,70E-15	8	82	2	70
Minc07312	1,30E-08	308	381	55	127	3,90E-13	8	89	2	70
Minc07962	1,10E-17	296	449	1	149	7,20E-19	68	134	2	68
Minc08076	2,00E-12	241	368	14	138	1,00E-17	3	52	18	69
Minc09138	1,10E-19	292	438	1	142	1,00E-17	63	129	2	68
Minc09142	2,30E-14	299	430	6	132	1,90E-18	66	132	2	68
Minc09143	2,50E-17	298	434	1	132	8,50E-19	70	136	2	68
Minc10028	3,40E-11	406	540	1	146	9,20E-27	32	117	2	70
Minc11248	2,00E-12	311	454	1	147	7,70E-20	83	148	2	69
Minc11307	2,90E-16	282	415	3	140	7,40E-32	68	135	2	69
Minc11357	9,10E-12	286	362	57	132	7,90E-16	5	79	1	70
Minc11359	1,20E-12	227	359	1	127	6,30E-16	8	82	2	70
Minc11361	1,20E-08	293	394	58	142	6,20E-13	8	88	2	70
Minc11362	6,40E-12	220	352	1	127	1,10E-15	8	75	2	70
Minc11986	1,60E-14	309	492	1	136	4,70E-26	42	110	2	69
Minc14140	8,80E-09	891	969	57	134	1,50E-08	637	683	21	70
Minc14217	2,30E-14	1033	1159	1	120	1,30E-16	758	823	2	69
Minc15059	1,70E-16	222	332	44	141	3,70E-22	7	80	2	69
Minc15185	1,90E-08	242	321	1	74	2,30E-30	25	92	2	69

Minc15187	9,00E-15	296	427	6	132	2,00E-15	68	129	2	68
Minc15420	4,00E-21	302	493	5	164	2,10E-32	26	93	2	69
Minc15750	5,30E-16	275	401	1	120	1,10E-18	12	77	2	69
Minc16419	3,80E-10	208	394	2	163	1,20E-18	30	94	2	65
Minc17206	5,20E-12	297	457	1	146	2,50E-11	73	132	8	69
Minc17472	2,90E-10	309	380	57	127	1,20E-13	25	105	1	70
Minc17538	3,50E-24	462	623	1	163	4,50E-30	142	209	2	69
Minc17667	3,80E-15	145	275	6	131	5,70E-21	21	88	2	69
Minc17901	2,90E-17	266	375	42	150	6,40E-10	7	76	2	69
Minc18013	3,80E-11	381	515	1	146	1,50E-24	32	92	2	70
Minc18240	3,00E-09	298	370	61	132	1,40E-14	7	87	1	70
Minc18661	9,00E-09	318	364	90	133	2,70E-16	17	84	2	69
Minc18991	1,10E-13	261	391	8	133	7,60E-20	20	87	2	69

Tabla S1: Receptores de Horma en *M. incognita*. En la tabla se muestran todos los ESTs que poseen dominio de unión al ligando del receptor de hormonas nucleares (PF00104) y dominio dedo de zinc, tipo C4 (PF00105).

Anexo 6. Tabla S2. Homólogos *CeDAF-12* identificados en *M. incognita*

Minc10028 scaffold:ASM18041v1a:MiV1ctg367:32578:31797:-1	Minc18013 scaffold:ASM18041v1a:MiV1ctg1671:2049:6855:-1
AAACCAGAGGAGGACTGCGCCAGTAGTCACCACTTCACTCGTCATTTATTTATAAAAAATAA ATCCTTTTTCTGCTCAAAAAAATGCAAGAGAATCAAAATAAAAAGTTTTTCGATAT TTCTGATTTTTATTCTGATTTTCTTAATTTTATAAAAAACCCCTGTAATAATTTTGGAGAC TCTAATGGCCTTAATTTTAAAAACCTTAAACCTTTTTTTTAAATTTTAAATCAAAGT TCTCTGATATTACTCGCACGTTAAACTTTTGCAGAGACCAGAACTCGTTTTTAAAAAT TCTGAAAAATCTGATTTTCCACTGTAGCCACCAACAGTCTGGGTATTGGGCATTTTTG GCTCCGGCTCCGAACATATGGGCTTTTTAAATCTTAGCTCCGGCTCTGGCCCGGAGCC AGCTCCGGAGCCATACCAACACTGACCACCACAAGTCCCTTAAATTTGGACATTAGAGT CTCAAAATATTTTTGTGTATGTACTTAACCTTTTTTATCAGATCCAACCTACTAT TTTTATTTTTTTGTAATACTAACAAAATATTAGACAAAATAAAATTAATTTTTCCG ATGGAACATCAACCAGGGTCCAGTTAAAGCCGCTCGATTATCCCAAAAATAGTGACT ACTGAGGGTGGTGAAG GTGGGTATTTTTAAATTTTTTAAACGAACCTTATTTAAAAATTA ATAAACTTCGTTAATGCTGCTTTTGGGTGTAATGGTTATTGTGTGGGCTTTCCACTAGT GGTGGCCGGGTTCCGAATCCGTTTTCGCCAGAAATTTTTTAGGCCCTCCCATTTTTTC ATAAATAAGGAACATTGGGAAAGAAAATTCATTTTTCATTGTTAATAACCATTTATGGAAG GGCGTAAAAAGTTCACCATATCTGAATATGCAACCAACTTCAACTAGTAAAATAAAGA AAATGTAGAGAAAATTTGGGGTCTTAACCTTTACCCCTAGTAAAAAAACCAAAACAG GATTTATGGCAACCCATAAGAGACCATTAGAGTCTGGGATTTTTAAACAATTTAATGT TCTCTAAAGCGTGTATTTTGGGTAGGATGGTTTTTGGTTAATTAATGATGTTTTTAG GCCTAAAGGCAGGAAAAAATTTCTGAAAAATTTTAGAAAATTTTCAACAAAATTTTTTCA ATTTAAG CCCAAATCGAAGTCACTCCCTTGCAAGTCTGTGGTGACAAATCTCTGGTGTG CATTATGGTGAATTAAGTGTGAAGGGTGAAGGCAAGTTTAAAAATCCCAACATTTTT AATAAATCCCTCCCTGCTTTTTAAAGGGTTCTTTCCGGCTTCCCAAAAATACGACAAAT TATCAGTGTGCCCGCAACAGTAAATGTATTTGTCATAGAGTTAACCGTAAACAGATGCCAA TATTGTCGATTGAAGAAATGTATAGAATTTGGGAATGAGTAAAGATGCTGTTAAATTTGGA AGAATGAGTAAAAACAGAGGGAAAGAGTGAAGATGAGTTGTGTTTTGGGGTGTGTT TGAGGATAATTTACCGAATGCAATTTCCGAAAAGAAAAGAAATTTGAAGAATGAAGG AAGAGGATGAAGATATTGGGAAGATAGTTGAAGAAGATTGAAGGGAAGGAAATTTA GGAAGAAAATTTAAACTCTTCTCTCTTCCCTTTCTCTCTCACTTCAATTTGT CGGTGAATGTCTTTCCGGCAATTTCCCTTTAATTTAACTCAAAATTTAATTAAG TA CCGAATGTGACACAAAGAGTGGAGAGTTTCTCTCTCTCTCCAGCTCCAAATCAAT ATCTTCATCTCCAGTAAATCCCAAGCTGTGAAGATCTCGGTAATAATTAATTAATGA AATTTAATTTAGCCAGTGCACCCCGTATGCTCAGCACGCAACATTTTTATCTCACCC TGCCAAGTGTGGAGGGAAATTTAAG GTGATGATTTTGGGACTCTATTGTCAAAGGGCC AAATGACTATTTTTGTAGTTGACCAATTTTGTACTTGACCATATTGGTAAATGACCTTTC TGGCTTTGACCAATTTAAATGTGACCAATTTTGTCAACTGACCAATTTTAAATTTGACCAA ACGAGTTTGGCAAAATGCTGTTTCCAGAGTCAATTTAAATTTTTTCAAAATTTTCTCAG CC TTTTCTCCAAACGGTGGAGTCAATTTCTCTCATCAACTCTTCTCCTCAGCTGCATTTTT ACTCCAAATAATATTATGGTCATCCAAACAATAATGTCTAGGAGGAGACCTCTAAAT ACTTCCCATTCATTTATGACCAACAACAATAATGTCTTCCACTTTTTGCCTCACAAC	AAACCAGAGGAGGACTGCGCCAGTAGTCACCACTTCACTCGTCATTTATTTATAAAAAATAA ATCCTTTTTCTGCTCAAAAAAATGCAAGAGAATCAAAATAAAAAGTTTTTCGATAT TTCTGATTTTTATTCTGATTTTCTTAATTTTATAAAAAACCCCTGTAATAATTTTGGAGAC TCTAATGGCCTTAATTTTAAAAACCTTAAACCTTTTTTTTAAATTTTAAATCAAAGT TCTCTGATATTACTCGCACGTTAAACTTTTGCAGAGACCAGAACTCGTTTTTAAAAAT TCTGAAAAATCTGATTTTCCACTGTAGCCACCAACAGTCTGGGTATTGGGCATTTTTG GCTCCGGCTCCTAACATATGGGCTTTTTAAAGATCTTAGCTCCGGCTCTGGCCCGGAGCC AGCTCCGGAGCCATACCAACACTGACCACCACAAGTCCCTTAAATTTGGACATTAGAGT CTCAAAATATTTTTGTGTACTTATCTCTGTTTTTTTTATCAGATCCAACCTACTAT TTTTATTTTTCTTGTAAATACTAACAAAATATTAGACAAAATAAAATTAATTTCTTTG ATGGAACATCAACCAGGGTCCAGTTAAAGCCGCTCGATTATCCCAAAAATAGTGACT ACTGAGGGTGGTGAAG GTGGGTATTTTTAAATTTTTTAAACGAACCTTATTTAAAAATTA ATAAACTTTGTTAATGCTGCTTTTGGGTGTAATGGTTAGTGTGTGGGCTTTCCACTAGT GGGGCGTGGGTTCCGAATCCGTTTTCGCCAGAAATTTTTTAGGCCCTCCCTTTTTTC TTTTTCTTTTTCCCTCAGTTTACCCTTTTTACCCTTAGACAAAGTAAAAAATTCCT ATAAATAAGGAACATTGGGAAAGAAAATTCATTTTTCATTGTTAATAACCATTTATGGAAG AACGTAAAAAGTTCACCATATCAGAACATATGCGACCAACTGCAACTAGTAAAATAAAGA AAATGTAAAGAAAAGGGGGGCTTAAACCTTACCCCTAGTAAAAAAACCCCAAAA CGACGTCTTCAACCCATAAGAGACCATTAGAGTCTGGGATTTTTAAACAATTTAATGT GCTCTTAAAGCGTGTATTTTGGGTAGGATGGTTTTTGGCCAAATTAATGATGTTTTTA ATCTTAAAGACTAGAAAAAGTAAAGAAAATTTCTGAAAAATTTTAGAAAATTTAAAA AGAAATTTTTTTTTCAATTTAAG CCCAAATCGAAGTCACTCCCTTGCAAGTCTGTGGT GACAAATCTCTGGTGTGCATTATGGT GTAATTACTTGTGAAGGTTGAAGCAAGTTTT ATAGAAAAATTTAAATTTTTAATAAATCCCTGCTTTTTTAAAG GGTTCTTTCCGGCTT CCCAACAAAATACAAACAATTTATCAGTGTGCCCGACACAGTAAATTTGATTGTCATAGAG TTAACCGTAAACAGATGCCAATATTGTCGATTGAAGAAATGTATAGAATTTGGGAATGAGTA AAAGTGTCTGTTAAATTTGAAGAAATGAGTAAAAACAGAGGAAAGAGTGAAGATGAGG TTGTGTTTTTAGGGTTGTTTTGAAAGGATAATTTACCGAATGCAATTTCCGAAAAGG GAAGAATTTGAAGAAATGAAGGAAGGATGAAGATATTGGGAAGAAATGATTTGAAGAA GATTTGAAGGAAGAGAAATTTAGGAAGAAAATTTAAACTCTTCTCTCTTCCCTTT CTTCTCTCACTCAATTTTGGGTGATTTGCTTTTCCGGCAATTTCCCTTTAATTTTA ACTCAAAATTTAATTTAAAG TACCGAATTTGACACAAAGAAATGGAGAGTTTCTCTCTC TTCTCAGCTCCAAATCAATATCTTCACTCCAGTAAATCCCAAGCTGTGAAGATCTC GGTAAAAATTTAATTTAATGAAAATTTAATTTAG CCCAAGTGCACCCCGTATGCCATCAGCA AGCAACATTTTTATCTCATCCCTGCCAAGTGTGGAGGGAAATTTAAG GTGATGATTTG GACTCTATTGTCCAAAGGGCCAAATGACTATTTTTGTAGTTGACCAATTTGTACTTGAC CATATTTGGTAAATGACCTTCTGGCTTTGACCAATTTAAATTTGACCAATTTTGTCAACTG ACCAATTTAAATTTGACCAAAACAGAGTTTGGCAAAATGCTGTTTCCAGATGCTTAAATTA ATTTTTCAAAATTTCCAG CTTTTTCTCCAAACGGTGGAGTCAATTTCTCTCATCAACT CTTCTCAGCTGCCTATTTTACTCCAAATAATATTATGGTCACTCAACAACAATAATGT CATGGAGGAGAACCTTAAATACTTCCCATTCATTTATTGACCAACAACAACAATAATGTCT

<pre> AATTTATAAATCAACCAACATGTTTCATCTACATATACACAACAACCTCCACATGGACTC GCCCGATATCTCCTCTGGGCCCTCAACCTTTGGGCAACACCCACATGATTGGC CACCTTGGGGCTGTTCCGTCTAGCAAGTTAGAGAGAAAATCTAAAATGGACACTAGAT CTCAAATTTATTTTATTTAGTGGGGTTATCCCAATGTGAGAGCACTCTCTCTC ATTCAACAGGCCATAGCACAGTTTCTCAACTGTGATGACGACCTGATAAAAAATGTT AGTAGAGCATATGAGCAGCACATCCCAAAAGCATTAACAACAATCATTTGGGGCTCTC TTTGATTCGTTAATGACACGCAACAAGTGGCCGACTTAAAAATATGTGGGGGGGAGG GGAATTAAAAAAATTTTTTCGATTTAGAACCGAACAAGAGGATGGCTGAAATTTGCA AATGAATTAAGCTCTTAATTAATGATATTATGAATTTGCAAAAGCGGTCAAAGGTTCC AAAAATTTAGAACAGAGCATCAAATACAGGCACTGAAACAGACTACCTTTGATCTGTCT GTTATTTGCTATGGCACAGGTTAGAGAAAATAACGAGAGAAATCTAAAATACAGTAAGAAA GGTTAGAGAGGGAGAAATGGACATAATGCCATTAAGGGAAGAAATAGACAAAATGCCAG TTTTGAAGGCTGGGCAAAAATGCCAATATACGTTATGGACAAAATGTTAAAAGGGGAAA TGGGCAAAAACGTCATCCAGGGA AAAAGGACAAAATGCCAATCTCTAGTTTGGGACAAA ATGTCACATAGCGGAAAATATTACAAAATGTCACAAAGCTCATTCAATTTTCAGCACTACC GTATCGGAACAGAAACCTCCATATCGAACACCTCATCTCCAGTCCGCGAATTCAAAT GTTCCGATCCAAACAGCAAACTTTGGCCGTGAAATAATAAAGCTTTGGAATGTCTCG GCCAATTTAAATTAACAACAACAGAGACCGCTCTCTGTCAGCCTATGTTTGTCTAGAAC AATCCAATGGAACGAAATTTGTTGCACAAAATAAAAAATGTTTGAATGCCAATTTGC ACTCTCGTCTCTCTCTGATGTGACAAATTTTGAATGATTTGATGGGTTTTTTGCGGA AAATTCGGCTTTTGGCCTATTTGCATTTACAGTGTTTTGGACGTTTAAAGAGACAAGTTA TGCAGTTGATGGAAGTTAAAATGGAATGGATGATAATGATGAATATGAGAGATGGAC AACAAAATGAATAATGTAATAATTTTATAGGACATTTTGTGGAAGGACTTTTCGCGT TAACTTTTAAACCGTCATACTCTAATGTCTGGAGTATGAAAAGTCCATTTGGCAAAATGTC GGAGCTTTTTTTGGCAATGAAAATTTTTTTAAATTTAGCAGACCTCCACAGACATT TTGGCATCATTTCCTCTCTTTACATGAAATGTTTGCACCGACTATTGGAACGGAATAA GTTAAAAATATATATTTAAATTTTCCCTTTATTTAATCGAAAAATTTGAGAGAGACGTG ATTTTGGGTTTTTTGTAATAATTTTATAAATGATCGGAAATCTGAAGAAAATTCGCCATA TGCCTTCAATCTCGATATAACCAACTTGAAGGGAACAAAATTTGGGTGAAGGGGCATA TCCAAAAATAGGTCAACTATAAAGAAATATGCAAAAGGGTCACTATCAATAATTTTGAA ATTGGCCTAGATACGTTAACGAAAATTAATTTACATCACCCAAAAATCATGTCCATCT ACACAAAATCAAAATGATAAAAAATAATCCAGTACAAAATCTCTCTCTTTCCCCAGTG TTCTTTCAATACAAAATTCGCCATGCTTTCAATTTTATTTTTACTGCTACCAAAAT AATCGGACTTTCAAATAATTTATCGACTCATTTTTTAATTAATAAATAATTTTCTTAA AAAAATTTCCATTTGCCTTAAACTTGAAAAAAGCCTTTCAATTTTTAATCAAAAAATGT TACTTTTACTTAATCTTTGAATAATTTAGAGTGAATCTTGATATAGTCAACTTGAAG </pre>	<pre> TCACACTTTTTGCTCACAACAATTTATAAATCAACCAACATGTTTCATCTACATATACA CAACAACCTCCACATGGACTCGGCCCATATCTCCTCTGGGCCCTCAACCTTTTGGG CAACACCCACACTTGTATGCGCACCTTGGGGCTGTTCCGTTCGAGCAAGTTGAAATAGAGA ATTTAAAAGGAAACACTAGAGTCTCAAATTTATTTTATTTTACGGGGTTATCCACC AATGTGAGAGCCACTCTCTCATTCACAAGGCCATAGCACCGTTTCTTCGACTGTCTGA TGACGATCTGATAAAAAATGTTAGTAGAGCATATGAGCAGCACATCCCAAAAGCATTA CAACAATCATTTGGGGCTCTTTTGAATTCGTTAATGACACGCAACAAGTGGCGGCACT TAAAAATATGTTGGGAGGGAGGAAATTAAAAAAATTTTTTCGATTTTGAACCGCAAC AGAAGGATGGCTGAAATTTGCAAAATGAATTAAGCTCTTTAATTAATGATATTATGAAT TGCAAAAGCGGTCAAAGGTTCAAATAATTTAGAACAGAGCATCAAATACAGGCACTGAA ACAGACTACCTTTGATCTGTCTGTTATTTGCTATGGCACAGGTTAGAGAAAATAACGGAGA GAATCTAAAATACAGTAAGAAAGGTTAGAGAGGGAGAAATGGACATAATGCCATTAAGG GAAGAATTAGACAAAATGCCAGTTTGAAGGCTGGGCAAAAATGCCAATATACGTTATGG ACAAAATGTTAAAAGGGGAAATGGGACAAAACGTCATCCAGGGA AAAAGGACAAAATG CCAATCTAGTTTGGGACAAAATGTCACATAGCGGAAAATATTACAAAATGTCACAAAG CTCATTCAATTTTCAGCACTACCGTATCGGAACAGAAACCTCCATATCGACACCTCATC TTCCAGTCCGCGAATTCAAATGTTCCGATCCAAACAGACGAAACTTTTGGCCGTGAAATA ATAAAGCTTTGGAATGTCTCGGCAATTTAATAAACAACAACAGAGATGATATTATGAAT TCAGCCTATGTTTGTCTAGAACAAATCCAATGGAACGAAATTTTGTGACAAAATAAAA AATGTTTGAATGGCCAGTTGCACTCTGCTCTCTCTGATGTTGACAAATTTTGTGAAT GATTTGATGGGTTTTTTGCGCAAAATTCGGCTCTTTGCTATGTTGCATTTACAGTGTTTT GGAGTTTTAAGAGACAAAATTTAGCAGTTGATGGAAGTTAAAATGGAATGGATGATAAT GATGAATATGTTGGAGAAATGGACAACAATAATGAATAATGTAATTTTAAAGGACACT TTGTCGAAGGACTTTTCTGCTTAACTTTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAA TGAAAGTAGAGGTCGGCTGGGGCGGATTTGCGGGATCCACCCCGGACCGTCCCGC ACTTTTTTCGATTTGCCAGATGCGGGATTTTCCACGGGATCCCGTCCCGGAAAGATT TTATAAGTTGCTCTGCTGGTCTTCAAAGACAATTTGCGCTAGCTTAAATGAAGATCC ATTGACAAAAGAGCTTTTTTTTGGCGATGAAAATTTTTTAAATTTAGCAGACATCCAC AGACATTTTGGCATCTTTCTCTCTTTACATGAAATGTTTGCACCGACTATTGGAAC GGAATAAGTTAAAATATATATTTAAATTTTCCCTTTATTTAATCGAAAAATTTGAGAG AGACGATGTTTGGGGTTTTTGTAAAATTTTATAAATGATCGGAAATCTGAAGAAAT TCCCTATGCCCTTCAATCTCGATATAACCAACTTGAAGGGAACAAAATTTTGGGTGAAG TGGGCATATCCAAAAATAGTCAACTATAAAGAAATTTGCAAAAGGGTCACTATCAATA ATTTCAAATTTGGCTGCTTATCGAAAATTAATTTACATCGCCCAAAAATCATGTCC ATCTACACAAAATCAAAATGATAAAAAATAATCCAGTACAAAATCTCTCTCTTTCCCGC AGTGTCTCTTTCAATACAAAATTAATTTCCCTATGCTTCAATTTATTTATTTATTTTCT ACTGCTACAAAATAATCGGACTTTCAAATAATTTATTCGACTCATTTTTTAAATTA ATATTTCTTAAAAACATTCATGCTCTTAACTTGAAAAAAGCCTTTTCGATTTTAA TCAAAAAATGTTAATTTTACCTAATCTTTTGAATAATTTAGAGTGAATCTCGATATAA CAAACTT </pre>
<pre> METSTGRVKRKAARLSHKIVITEGGETQIEVIPCVCVGDKSSGVHYGVITCEGCKASLKIQ HIFNKLPCFLKGFRRSQQNTTNYQCARQNCIVDRVNRNRCQYRLKKEIELGMSKDAV KFGMRSKQREVEDEYRIVTQRSGEFSPSSAPNSISSSPVIPAASAPPYASAQQHFIS SSLPTSGGFEKFFSPNGGVISSSTSSAAFTPNNIYGHPTTICHGGEPLNTHSFDIQ QQQMSHFLPHNLLNQPTCSSYTYQPPHGLAPISPSWAPQFFGQHPHLIAHPGAVPSS SGGYPPMSEPLSLIQGHSTVSSVDDDLIKNVSRAEAAHPQSINNNHLGASFDSLIDT QQVARLKNMNRTEGWLKFANELSSLIKIEFAKAVKGFKNLEQDDQIQALKQTTFFDLVS IAMAQHYRIGTETHIDNLIFFVREFKSDPDETFGREIIKALECLGQFKLTTTETALL SAYVLEQSNGTEDFVAQIKNLSAQHLRSLSSVDNFDLMDLGFPIKIRSLAMLHLQCF GRFKRQVMQLMVEKMEMDDNDEYVENQMNQNTSDILASFPLYIELFAPTIGTE </pre>	<pre> METSTGRVKRKAARLSHKIVITEGGETQIEVIPCVCVGDKSSGVHYGFFRRSQQNTTNYQ CARQNCIVDRVNRNRCQYRLKKEIELGMSKDAVKFGMRSKQREVEDEYRIVTQRSQ EFPSPSSAPNSISSSPVIPAASAPPYASAQQHFISLPTSGGFEKFFSPNGGVISSST SSAAFTPNNIYGHPTTICHGGEPLNTHSFDIQQQQMSHFLPHNLLNQPTCSSYTY QQPPHGLAPISPSWAPQFFGQHPHLIAHPGAVPSSGGYPPMSEPLSLIQGHSTVSSV DDDLIKNVSRAEAAHPQSINNNHLGASFDSLIDTQQVARLKNMNRTEGWLKFANELSSL IKCIEFAKAVKGFKNLEQDDQIQALKQTTFFDLVSIAMAQHYRIGTETHIDNLIFFVRE FKSDPDETFGREIIKALECLGQFKLTTTETALLSAYVLEQSNGTEDFVAQIKNLSA QLHRSLSVDNFDLMDLGFPIKIRSLAMLHLQCFGRFKRQVMQLMVEKMEMDDNDEYVE NQQMNQNTSDILASFPLYIELFAPTIGTE </pre>

Tabla S2: Genes y productos proteicos de homólogos de DAF-12 identificados en *M. incognita*. En la parte superior de la tabla se muestran las secuencias génicas para Minc10028 y Minc18013 con sus respectivas regiones codificantes (exones) resaltadas en amarillo a la izquierda y derecha respectivamente. En la parte inferior se muestran las secuencias proteicas de los genes Minc10028 y Minc18013 con los exones alternados en azul y negro y los residuos correspondientes a los sitios de superposición del splicing en rojo.

Anexo 7. Figura S1: Alineamiento de secuencia múltiple de CeDAF-12 con Minc10028 y Minc18013 usando el programa Clustal Omega.

```

CeDAF-12      MGTNGGVIAEQSMEIETNENPKVVEEPVVRKRVTRRRHRIHSKNNCLTPPNSDDDFQM
Minc10028    -----
Minc18013    -----

CeDAF-12      STPDDPVIHSPPSIGAAPGMNGYHGSGVKLESSGACGSPDGLLDSSEESRRRQKTCRV
Minc10028    -----METSTKGRVKA-----ARLSHKIVTTEGGETQIEVIPCKV
Minc18013    -----METSTKGRVKA-----ARLSHKIVTTEGGETQIEVIPCKV
                    *: . ** . . : . . *:: . *::

CeDAF-12      CGDHATGYNFNVTICESCKA-----FFRRNALRPKEFKCPYSEDCEIN
Minc10028    CGDKSSGVHYGVITCEGCKASLKIQHIFNKLPCKFLKGFRRSQONTTNYQCARQNCIVD
Minc18013    CGDKSSGVHYG-----GFFRRSQONTTNYQCARQNCIVD
                    *****: :.          ****. . : : * . : :

CeDAF-12      SVSRRFCQKCLRKCFVGMKKEWILNEEQLRNRKNSRLNNT-GTCNKRSQPGNQSPQ-
Minc10028    RVNRNRCQYCRLLKCIELGMSKDAVKFGRMSKKQR-ERVEDEYRIVTQRS--GEFSPSS
Minc18013    RVNRNRCQYCRLLKCIELGMSKDAVKFGRMSKKQR-ERVEDEYRIVTQRS--GEFSPSS
                    * . * . ** * : : * : : . : : : . * : : . : * . : :

CeDAF-12      GPNQQPHLSPHPGVAIYPPQPQRPLTINPMDNQMMHMQANRPNAMPQLISPPGAQPY
Minc10028    SAPNS-ISSSPVIPQAASAPPYAS-----AQ-QHFISL-----PTSGGE-F
Minc18013    SAPNS-ISSSPVIPQAASAPPYAS-----AQ-QHFISL-----PTSGGE-F
                    . ** . ** * . * * . . : : : . : : * : :

CeDAF-12      PLTSFVGSSASDPPNRS-----LTMHNGEKSPDGY----DPNIMAHRAP
Minc10028    KPFSPNGGVISSSSTSSAAFTPNNIYGHPTTICHGGEPLNTSHSFIDQQQMSSHFLP
Minc18013    KPFSPNGGVISSSSTSSAAFTPNNIYGHPTTICHGGEPLNTSHSFIDQQQMSSHFLP
                    ** * . * . * . * . * : * : * . : : : : * *

CeDAF-12      PPSFNNRPKMDSGQVVLSTEEYK--QLLSRIPGAQVPLMNEEPIKRAAYNCNGHPM
Minc10028    HNNLLNQPTCSSTYTQPPHGLAPISPSWAPQPFQPHLIAH-----PGAVPS
Minc18013    HNNLLNQPTCSSTYTQPPHGLAPISPSWAPQPFQPHLIAH-----PGAVPS
                    . : * : * . * . . : * . * * * : . . *

CeDAF-12      PAETTPPYSAPMSDMSLSRHNSTSSGTEKNHMTHS---TVSAIPGNSAQNHFDIASFGM
Minc10028    SSGGYPPMSEPLSLIQQGH-STVSSTVD-DDLIKNSRAYEAAHPQSINNHLG-ASFDS
Minc18013    SSGGYPPMSEPLSLIQQGH-STVSSTVD-DDLIKNSRAYEAAHPQSINNHLG-ASFDS
                    : ** * * : * : . : : * : : : : . * * . * : : * * .

CeDAF-12      GIVTATGGGDAEEMYKRMNMFYENCIQSALDSPENQEPKQPEAMIPKEEYMTPTHGFOY
Minc10028    L-----IDTQ-----QVARLKNMNRTEGW--
Minc18013    L-----IDTQ-----QVARLKNMNRTEGW--
                    : : : : : : : : : : : : : : * : * : * :

CeDAF-12      QSDPYQVPPAERNINYLNAELKALDAVREAFYGMDDPMEQGRQMSFLKANKTPADIM
Minc10028    -----LKF-----A
Minc18013    -----LKF-----A
                    **

CeDAF-12      NIMDVTMRRFVKVAKGVPAFREVSQEGKFSLLKGGMIEMLTVRGVTRYDASTNSFKTPTI
Minc10028    NELSSLIKCIIEFAKAVKGFKNLEQDDQIQALKQTFDLSVIAMAQHYRIGTETLHIDNL
Minc18013    NELSSLIKCIIEFAKAVKGFKNLEQDDQIQALKQTFDLSVIAMAQHYRIGTETLHIDNL
                    * . . : : : : * * . * : : * : : . * : : : : . * : : : :

CeDAF-12      ---KQONVSVNVDDMFAKLNANAQAQKAKCLEFFGFDEEIKKNE LAVYLMLAVLFSV
Minc10028    IFPVREFKCDPTDFTFGR-----EIIKALECLGQFKLTTTETALLSAYVLEQSN--
Minc18013    IFPVREFKCDPTDFTFGR-----EIIKALECLGQFKLTTTETALLSAYVLEQSN--
                    : : * . * : * : : : * : * * * . . . * * : *

CeDAF-12      RSDPPMNENDVRIVTERHNFMSLLNRYLES LFG-----EQARRIFER
Minc10028    GTEDFVAQIKNCLSAQLHSRLSSVDNFLNDLMGFLPKIRSLAMLHLQCFGRFKRQVMQL
Minc18013    GTEDFVAQIKNCLSAQLHSRLSSVDNFLNDLMGFLPKIRSLAMLHLQCFGRFKRQVMQL
                    : : : : . : : : * : : * : : : * : * : * :

CeDAF-12      IPKALGLLNEIARNAGMLFMGT----VRSGEAEELPGEFFKIK-----
Minc10028    MEVK---MEMDDNDEYVENGQOMNQSTDIILASFPPLYIELFAPTIGTE
Minc18013    MEVK---MEMDDNDEYVENGQOMNQSTDIILASFPPLYIELFAPTIGTE
                    : * : * : * . . . : * : : :

```