



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desarrollo y evaluación de análogos de C75 como potenciales fármacos contra la obesidad y el cáncer

Roberto Gómez García

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Desarrollo y evaluación de análogos de C75 como potenciales fármacos contra la obesidad y el cáncer.

Programa de doctorado en Química Orgánica

Facultad de Química

Roberto Gómez García

Directores: Jordi García Gómez y Dolors Serra Cucurull

Tutor: Jordi García Gómez

2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

“Long story short, I survived.”

Taylor Swift

Agradecimientos

A quien bien me conoce sabe que probablemente esta sea la parte que más tiempo y esfuerzo me ha costado de escribir de la tesis. No me caracterizo por ser una persona que expresa sus sentimientos (a no ser que estemos en la puerta de un bar después de dos cervezas), pero como dice el refranero español; una vez al año no hace daño y la ocasión así lo merece.

Me gustaría empezar agradeciendo la oportunidad y la confianza depositada en mi por mis dos directores; Jordi García y Dolors Serra. Una tesis no es un camino fácil, hay veces que las ganas de tirar la toalla parece que superan a las fuerzas para seguir, pero habéis conseguido que supere estos más de 4 años ayudándome cuando lo he necesitado y enseñándome cosas con las que no había ni soñado. No solo en el aspecto científico, si no de la vida en general. Así que gracias por vuestro esfuerzo, espero haber estado a la altura.

A pesar de no haber participado directamente en la tesis, no puedo ignorar todas las personas detrás de mis dos grupos; Xavi Ariza, Ernesto Nicolás, Laura Herrero, gracias también por vuestra ayuda y apoyo durante este tiempo.

Me gustaría continuar a partir de aquí por orden cronológico, empezando por las personas que más tiempo me llevan aguantando en este mundo; mis padres. Papá, mamá (más conocida como Igor) por muchas líneas que escriba no hay palabras para agradecer todo lo que habéis hecho, hacéis y haréis por mí, ni todo lo que os quiero. Puede que no coincidamos en todos los puntos de vista de la vida, y puede que yo no haya sido el hijo que esperabais (partiendo de la base de que no me esperabais...) pero espero haberos hecho sentir orgullosos en algún punto de la vida, de la misma manera que yo me siento orgulloso y afortunado de haberos podido tener a mi lado.

Por suerte, un poquito antes que yo llegaron otras 2 personas a este mundo y tuve la suerte de criarme con 2 hermanos mayores que me mimaron y me consintieron todo lo que pudieron y más. Ahora la diferencia de edad parece más pequeña y tengo la suerte de poder contar con dos personas maravillosas a mi lado que me han ayudado, me han apoyado y lo seguirán haciendo. A vosotros junto a mis cuñadas, además, os tengo que agradecer el regalo más bonito que me ha hecho nadie en la vida; los 3 soles de sobrinos que tengo. Rubén, Lucia y Sara, sois unos renacuajos, pero nunca olvidaré el momento en el que os unisteis a esta aventura y lo feliz que me hicisteis y me hacéis. El tiempo pasa rapidísimo y ya sois tres personitas cada uno con su personalidad, pero los 3 habéis demostrado ya la bondad que tenéis y lo que valéis, y no os podéis imaginar las ganas que tengo de ver en qué os convertís y todo lo que conseguís.

Por otro lado quedan mis cuñadas; Teresa y Almudena. Aunque suene tópico decir estas cosas, para mi más que mis cuñadas sois dos hermanas más. Literalmente no tengo casi recuerdos de mi vida sin vosotras, pero me alegra que así sea porque he tenido una suerte enorme de que forméis parte de mi vida y os quiero muchísimo. Gracias por haber estado ahí y por haber ayudado a dar forma a la persona que soy hoy. Ya sabéis que pase lo que pase os querré siempre.

Tampoco puedo ignorar a mi lado más cordobés de la familia; mis tíos y mis primos. Asun, Jose Ángel, Julio y Marina, aunque estéis lejos y no nos veamos todo lo que querríamos, se que estáis ahí y sois motivo suficiente para bajar a Córdoba un 15 de agosto a 45 °C. Vosotros también sois parte de lo que soy ahora, en especial tú Tito, que a pesar de ser el causante de que duerma con los pies tapados por miedo hasta en plena ola de calor, te quiero y te admiro a partes iguales.

No pueden faltar tampoco los que ya no están, mis abuelos. Espero que estéis donde estéis os sintáis orgullosos. El tiempo que hemos compartido, aunque demasiado breve por desgracia, es algo que siempre recordaré con amor. Os echo de menos.

Siempre se dice que la otra familia que elegimos son los amigos, y me toca empezar ahora con vosotros así que de nuevo iremos por orden cronológico.

Alba, poca gente puede presumir de haber tenido a alguien durante literalmente toda su vida al lado, pero yo sí. Sabes que, aunque estemos en ciudades diferentes te quiero muchísimo y que siempre podrás contar conmigo, igual que yo contigo, pero múdate a Barcelona ya, coño. Eres probablemente la persona con la que más he discutido en toda mi vida de pequeño, pero eres un pilar imprescindible y te quiero un montón, ojalá otros 29 años contigo al lado.

El tiempo de la carrera probablemente fueron los mejores años que he pasado en mi vida, y si eso es así probablemente no sean por los problemas de química física ni las horas de laboratorio, si no por 4 personas increíbles: Raquel, Vicky, Dunia y Alba. Si hoy estoy aquí escribiendo esto es gracias a vosotras. Gracias por vuestra ayuda, por vuestra paciencia, por el apoyo durante la carrera y en los años posteriores, y gracias por haberme hecho reír como nadie nunca. Aunque nos cueste organizarnos para vernos (es que tenéis una agenda que ni la Preysler, chica...) se que estáis ahí y que ahí seguiréis. Os quiero con locura y sois maravillosas. Tampoco puedo olvidarme de mencionar a la mejor profesora que tuve en ese tiempo: Ana Cuñat. Te incluyo en el apartado de amiga porque a pesar de todo este tiempo, todavía me guardas con cariño en un rinconcito de tu corazón. Gracias por haberte portado tan bien conmigo y gracias por todo lo que me has enseñado.

Antes de acabar la carrera tuve la suerte de poder estar un año en Alemania trabajando, donde conocí a gente increíble, pero Rocío tú destacas entre todas. Se que no nos vemos desde hace bastante y que raras veces encontramos tiempo, pero eres una persona muy importante en mi vida y te quiero mucho.

A mi vuelta conocí también a una de mis personas favoritas en el mundo. Sencher, lo primero que me dijiste fue que te gustaba el brillo que la grasa le daba a mi nariz, ¿cómo no me iba a enamorar de ti? Desde entonces ha llovido muchísimo y ahora tengo la suerte de tenerte viviendo a 10 minutos de mí, y joder qué suerte. Gracias por aguantarme, por quererme, por ser mi confidente y por estar siempre a mi lado (ah, y por descubrirme a Taylor Swift). Vivo más tranquilo sabiendo que estás en mi vida y nunca podré agradecerte todo lo que haces por mí. Te adoro.

Llegamos ahora a la época más reciente... Perdón por el tostón. He tenido la suerte de estar en dos departamentos a la vez durante la tesis, lo que tenía sus cosas buenas y malas, pero sin duda vosotros sois lo mejor.

Primero mis niños de química. Héctor: Gracias por haberme enseñado tanto en el laboratorio y por haber aguantado mi mal humor cuando tenía hambre. Gracias por tu amistad y por formar parte de mi vida, sabes que te quiero mucho y tuve mucha suerte de encontrarte.

Marina (Perez): Eres maravillosa, y ojalá pudieras verte a ti misma a través de mis ojos, porque verías todas las cosas que me fascinan de ti. La sinergia, la paz y la conexión que siento cuando estoy contigo no tienen precio. Con poca gente tengo la libertad de ser tal y como soy y no sentirme cohibido. Parafraseando tus agradecimientos: no sabes la tranquilidad de saber que estás a mi lado y todo lo que te quiero

Anna: Mi juguito de durazno... Qué te voy a decir que no sepas ya. Más que una amiga has sido y serás una compañera de vida. Gracias por todo lo que haces por mí, a pesar de la distancia te siento muy cerca, aunque te eche de menos a rabiar. Gracias por haber sido mi compañera de aventuras y por hacerme reír como poca gente puede. T'estime.

Marta: Aunque llegaste tarde y en una versión de ti misma que en nada se parece a lo que eres ahora, te quiero con locura y estoy orgulloso de ti.

Tampoco me olvido del resto; Miquel, Julia, Sergi, Davor... Perdón por no poder dedicaros un párrafo entero pero si queréis que os regale un poco el oído, invitadme a una cerveza.

Y por último, Marina (Pascual) y Stuart: Os he separado del resto porque, a parte de coincidir en el departamento, tenéis que lidiar conmigo en casa. Gracias a los dos por hacer que Barcelona sea un hogar para mí. Sois los mejores compañeros de piso que uno puede desear. Marina, gracias por todos los momentos que me has dado, por siempre estar de mi lado (el 90% de las veces al menos) y por todas las veces que consciente o no, me has ayudado me has tranquilizado y me has dicho justo lo que necesitaba oír. Eres maravillosa y te quiero muchísimo.

Por otro lado están mis niños de farmacia. Aunque con vosotros he coincidido menos tiempo no sois menos importantes. Mar, Cecilia, Simonas, Judith, gracias por todo, sabéis que os quiero un montón. Y perdonadme, pero tengo que hacer dos menciones especiales.

Kevin: Mi cabraloca favorita. Eres una persona increíble. Gracias por todo lo que me has enseñado, gracias por hacerme hacer cosas que nadie más conseguiría y gracias por tu amistad. Te quiero mucho mi niño.

Y cómo no mi gaditana favorita, mi bomboncito de licor, Ana. Hace bastante poquito que te conozco, pero lo nuestro fue un flechazo. Eres increíble y en na' y menos te has convertido en alguien imprescindible. Gracias por aguantarme cada día y por hacerme sentir querido.

Casi terminando, me gustaría añadir a dos personitas que llegaron hace poco pero que se han ganado unas pocas líneas aquí. Guille, aunque tenga que lidiar con tu música y tu exceso de energía por la mañana, me alegro muchísimo de haberte elegido como compañero de piso. Eres un amor de persona y me lo paso genial contigo. Gracias por aguantarme tu también, te quiero.

Por último, es importante mencionar a los fondos del Ministerio del Gobierno de España por concederme la financiación para llevar a cabo este proyecto a modo de beca FPU concedida en 2018.

En resumen y ya para cerrar. Pocas veces suelo decir en voz alta cuando estoy orgulloso de algo que he conseguido en la vida, pero en esta ocasión haré una excepción. En mis 29 añitos mi mayor logro no ha sido sobrevivir a 4,5 años de exposición a disolventes sin quedarme calvo, si no haberme sabido rodear de personas maravillosas.

A pesar de los errores que haya podido cometer en la vida, si volviera a nacer no cambiaría nada para asegurarme de poder teneros conmigo.

AGRADECIMIENTOS.....	1
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	9
1 INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 LA OBESIDAD	12
1.2 PAPEL DEL HIPOTÁLAMO Y LOS ÁCIDOS GRASOS EN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA	12
1.2.1 NEURONAS AGRP/NPY.....	13
1.2.2 NEURONAS POMC/CART	13
1.2.3 METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS Y SU PAPEL EN LA INGESTA	14
1.3 CARNITINA PALMITOILTRANSFERASA, CPT1.....	16
1.3.1 FUNCIÓN.....	16
1.3.2 ISOFORMAS DE CPT1	17
1.3.3 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CPT1	17
1.4 CÁNCER	21
1.4.1 REPROGRAMACIÓN METABÓLICA EN LA CÉLULA CANCEROSA.....	22
1.4.2 PAPEL DE LOS LÍPIDOS EN LA CÉLULA CANCEROSA.....	23
1.5 ÁCIDO GRASO SINTASA, FAS	23
1.5.1 FUNCIÓN Y ESTRUCTURA	23
1.5.2 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE FA	25
1.6 C75.....	30
1.6.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL C75.....	30
1.6.2 RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA ACTIVIDAD DEL C75	33
2 OBJETIVOS.....	42
3 SÍNTESIS Y ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE NUEVOS DERIVADOS DEL (±)-UB006	44
3.1 OBTENCIÓN DEL (±)-UB010 Y (±)-UB011.....	45
3.1.1 PRECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	45
3.1.2 SÍNTESIS.....	47
3.1.3 INTENTOS DE SEPARACIÓN DE LOS ISÓMEROS	57
3.2 OBTENCIÓN DE DERIVADOS HIDROXILADOS EN ANILLO DE LACTAMA	60
3.2.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	60
3.2.2 SÍNTESIS.....	61
3.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LOS NUEVOS DERIVADOS.	68
3.3.1 RESULTADOS PREVIOS.....	68
3.3.2 ESTUDIO DE LOS DERIVADOS UB009, (±)-UB010 Y (±)-UB011	69
3.3.3 ESTUDIO DE LOS DERIVADOS (±)-UB013 Y UB015	70
3.4 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS BIOLÓGICOS	72
3.4.1 LACTONAS	72
3.4.2 LACTAMAS.....	74
4 SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS DERIVADOS DE C75.....	76
4.1 OBTENCIÓN DE DERIVADOS CON AZUFRE DEL C75	77
4.1.1 PRECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	77

4.1.2	INTENTO DE SÍNTESIS DEL (±)-UB019	78
4.1.3	INTENTO DE SÍNTESIS DEL (±)-UB020	83
4.1.4	SÍNTESIS DEL SC75.....	88
4.2	OBTENCIÓN DE LACTAMAS DERIVADAS DEL C75.....	92
4.2.1	PRECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	92
4.2.2	INTENTO DE SÍNTESIS DEL (±)-UB021	93
4.3	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL SC75	97
4.3.1	RESULTADOS PREVIOS.....	97
4.3.2	ESTUDIO DEL (±)-SC75 COMO AGENTE CITOTÓXICO	97
4.3.3	ESTUDIO DEL SC75 COMO INHIBIDOR DE LA CPT1A	98
4.4	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS BIOLÓGICOS	99
4.4.1	SC75 COMO AGENTE CITOTÓXICO	99
4.4.2	SC75 COMO INHIBIDOR DE CPT1	100

5 NUEVA APROXIMACIÓN SINTÉTICA AL UB207 Y ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA **101**

5.1	SÍNTESIS DEL UB207	102
5.1.1	PRECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	102
5.1.2	INTENTO DE SEPARACIÓN DE LA MEZCLA DE PRODUCTOS	104
5.1.3	NUEVA APROXIMACIÓN SINTÉTICA AL (±)-UB207	104
5.1.4	INTENTO DE SEPARACIÓN DE LOS ISÓMEROS	106
5.2	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL (±)-UB207	109
5.2.1	RESULTADOS PREVIOS.....	109
5.2.2	ESTUDIO IN VITRO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD CPT1A	109
5.2.3	ESTUDIO SOBRE LA INGESTA Y EL PESO EN ROEDORES TRAS LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DEL (±)-UB207 110	
5.2.4	ESTUDIO SOBRE LA INGESTA Y EL PESO EN ROEDORES TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DEL (±)-UB207.....	111
5.2.5	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA TRAS LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DEL (±)-UB207... 114	
5.3	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS BIOLÓGICOS	119
5.3.1	(±)-UB207 COMO INHIBIDOR IN VITRO DE LA CPT1	119
5.3.2	(±)-UB207 COMO INHIBIDOR DE LA INGESTA	119
5.3.3	EFFECTOS DEL (±)-UB207 SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LOS TEJIDOS.....	121

6 DESARROLLO DE UN NUEVO ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE LA CPT1 **125**

6.1	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CPT1 IN VITRO.....	126
6.1.1	PRECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	126
6.1.2	MARCAJE ISOTÓPICO NO RADIOACTIVO	128
6.1.3	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD EN EXTRACTOS MITOCONDRIALES	129
6.1.4	ENSAYO EN CÉLULAS.....	134

7 RESUMEN Y CONCLUSIONES **139**

8 EXPERIMENTAL **147**

8.1	PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS QUÍMICA.....	148
8.1.1	INSTRUMENTACIÓN, DISOLVENTES Y TÉCNICAS	148

8.1.2	SÍNTESIS DE LAS MOLÉCULAS ORGÁNICAS	149
8.2	MATERIALES Y MÉTODOS EN BIOLOGÍA	183
8.2.1	ANIMALES	183
8.2.2	CÉLULAS.....	185
8.2.3	LEVADURAS Y VECTORES PLASMÍDICOS.....	188
8.3	MATERIALES Y MÉTODOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR.....	196
8.3.1	MÉTODOS CON PROTEÍNAS.....	196
8.3.2	MÉTODOS CON RNA.....	198
8.3.3	PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.....	199
8.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	202
9	<u>REFERENCIAS.....</u>	<u>203</u>

Abreviaturas y acrónimos

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	EDC	Malonil-CoA descarboxilasa	MCD
1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno	DBU	Metanol	MeOH
2-Cloroacetato de isopropilo	iPr	Metanol	MW
2,2,2-Trifluoroacetilo de 2,2,2-trifluoroetilo	TFA-TFE	Monoglicerol lipasa	MGL
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio	MTT	n-Butil litio	n-BuLi
3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa	HMGCR	N-óxido de N-metil morfolina	NMO
3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 1	HMGCS1	N,N-Dimetilformamida	DMF
3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 2	HMGCS2	Neuropéptido Y	NPY
Acetato sódico	NaOAc	Nucleo arcuato	ARH
Acetil-CoA sintetasa	ACC	Palmitoil tioesterasa	TE
Acetil-CoA-ACP transacilasa	AT	Paraformaldehído	PFA
Acetil-CoA-ACP transferasa	MAT	Péptido relacionado con el agutí	AgRP
Ácido glutámico descarboxilasa 1	GAD1	Perilipina 2	PLIN2
Ácido graso sintasa	FAS	Perilipina 5	PLIN5
Ácido <i>p</i> -toluensulfónico	pTsOH	Peróxido de benzoílo	(PhCO)₂O₂
Ácido tioacético	AcSH	Piruvato deshidrogenasa quinasa 4	PDK4
Ácidos grasos	FA	Proopiomelanocortina	POMC
Ácidos grasos de cadena larga	LCFA	Proteína quinasa B	Akt
Acilcarnitina translocasa	CACT	Proteína quinasa dependiente del AMP	AMPK
Adenosin trifosfato	ATP	Proteína transportadora de acilos	ACP
α -Hormona estimuladora de melanocitos	α-MSH	Proteínas de unión al elemento regulador de esteroides	SREBP
Barrera hematoencefálica	BHE	Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Bis(trimetilsilil)amida de litio	LiHDMS	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real	qRT-PCR
Bromuro de tetrabutilamonio	Bu4NBr	Reactivo de Lawesson	LR
cAMP response element-binding protein	CREB	Receptor de estrógenos	ERBB2
Carbonato de metilmagnesio	MMC	Resonancia magnética nuclear	RMN
Carnitina palmitoiltransferasa 1	CPT1	RNA mensajero	mRNA
Carnitina palmitoiltransferasa 2	CPT2	Sistema nervioso central	SNC
Clorocromato de piridinio	PCC	Tejido adiposo marón	BAT
Cloruro de benzoílo	PhCOCl	Temperatura ambiente	t.a.
Cloruro de <i>tert</i> -butildifenilsilil	TBDPSCI	Termogenina	UCP
Coenzima A	HCoA	<i>tert</i> -Butildifenilsilil	TBDPS
Cromatografía de capa fina	TLC	<i>tert</i> -Butilo	tBu
Diclorometano	DCM	Tetrahidrofurano	THF
Dimetilaminopiridina	DMAP	Transcripción regulada de cocaína y anfetamina	CART
DNA complementario	cDNA	Transportador de glucosa 1	GLUT1
Enoil-ACP reductasa	ER	Transportador de glucosa 2	GLUT2
Factor de crecimiento epidérmico	EGFR	Transportador vesicular de glutamato 1	VGLUT1
Food and Drug Administration	FDA	Transportador vesicular de glutamato 2	VGLUT2
Forkhead-box O1	FoxO1	Transportador vesicular del ácido gamma-aminobutírico	VGAT
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	PEPCK	Trietilamina	TEA
Glucosa-6-fosfatasa	G6Pasa	β -Acetil-ACP sintasa	KS
Hexametildisiloxano	HMDSO	β -cetoacil reductasa	KR
Homeobox específico de cerebro	BSX	β -cetoacil reductasa	DH
Hormona sensible a lipasa	HSL	β -Hormona estimuladora de melanocitos	β-MSH
Intracerebroventricular	ICV		
Intraperitoneal	IP		

1 Introducción

1.1 La obesidad

La obesidad se ha convertido en las últimas décadas en un problema de salud público en la mayoría de los países desarrollados por su alta prevalencia y el impacto que supone sobre los sistemas de salud. Solo en Europa se estima que el 60% de la población presenta exceso de peso, y el gasto médico derivado del tratamiento de afecciones relacionadas con la obesidad asciende a un 8% del presupuesto total.¹

La obesidad se define como una enfermedad crónica consistente en la acumulación excesiva de tejido adiposo,² y se relaciona directamente con un incremento en el riesgo de desarrollar otras patologías como el cáncer, la diabetes de tipo II o diferentes tipos de enfermedades respiratorias y cardiovasculares.³⁻⁵

Aunque el origen de la obesidad es multifactorial la mayoría de los casos son atribuibles a factores ambientales, como la gran disponibilidad de alimentos energéticamente densos^{6,7} y un mayor grado de sedentarismo en la sociedad moderna,^{8,9} que producen un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, favoreciendo la acumulación del exceso de energía en forma de grasa.¹⁰

En condiciones normales, el organismo es capaz de regular el equilibrio energético a través del hipotálamo monitorizando y respondiendo a las variaciones en las concentraciones de diferentes nutrientes como la glucosa y los ácidos grasos, o de hormonas como la insulina.¹¹⁻¹³

1.2 Papel del hipotálamo y los ácidos grasos en la homeostasis energética

El hipotálamo es una porción del cerebro que forma parte del sistema nervioso central (SNC) situada justo debajo del tálamo (**Figura 1**). Está involucrado, entre otros procesos, en la regulación de la temperatura corporal, la ingesta y la sed.¹⁴⁻¹⁶

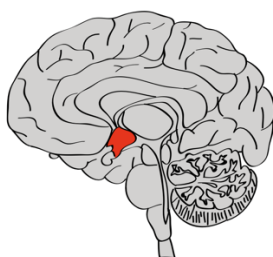


Figura 1. Representación esquemática del cerebro desde una vista sagital indicando la ubicación del hipotálamo. Dibujo extraído de *The Human Protein Atlas*.¹⁷

Se ha comprobado que la sección del hipotálamo reguladora de la ingesta es el núcleo arcuato (ARH). Está situado inmediatamente por encima de la eminencia media y los capilares fenestrados que forman la barrera hematoencefálica (BHE), favoreciendo el rápido intercambio de diferentes moléculas y metabolitos con el resto del cuerpo.¹⁸

En el ARH se hallan dos subpoblaciones neuronales capaces de procesar cambios en las concentraciones de nutrientes y de responder al estado energético del organismo mediante la expresión del neuropéptido Y (NPY), el péptido relacionado con el agutí (AgRP), la proopiomelanocortina (POMC) y la transcripción regulada de cocaína y anfetamina (CART).

1.2.1 Neuronas AgRP/NPY

Las neuronas AgRP/NPY son un subtipo neuronal que se caracterizan por expresar las moléculas NPY y AgRP.

El NPY es uno de los mayores orexígenos (estimulante del apetito) conocidos hoy en día. Su administración intracerebroventricular (ICV) provoca un aumento considerable de la ingesta en roedores,¹⁹ y las inyecciones repetidas en el núcleo paraventricular derivan en hiperfagia y en un aumento del peso y del tejido adiposo sostenido durante la duración del experimento.²⁰ Además de un potente inductor de la ingesta, el NPY ha demostrado ser un inhibidor de la termogénesis en el tejido adiposo marrón (BAT, del inglés *brown adipose tissue*) disminuyendo el gasto energético.^{21,22} Estos dos efectos simultáneos favorecen un estado catabólico que deriva en un aumento de los depósitos de grasa.²³ La concentración del NPY responde a los niveles energéticos del organismo, aumentando su expresión en estados de baja energía como el ayuno²⁴ y disminuyendo en respuesta a la leptina,²⁵ una hormona indicadora de la cantidad de tejido adiposo en el cuerpo.²⁶

En el caso del AgRP, aunque más tardíos y duraderos,²⁷ sus efectos sobre la ingesta son idénticos a los del NPY y está también demostrado que su administración en el tercer ventrículo cerebral aumenta la ingesta en roedores.²⁸ Además, su regulación es similar a la del NPY,²³ por lo que se considera que la acción de los dos neuropéptidos es redundante.^{23,27}

1.2.2 Neuronas POMC/CART

Las neuronas POMC/CART son otro subtipo neuronal con efectos en el control de la ingesta opuestos a las AgRP/NPY. Se caracterizan por la expresión de POMC y CART.

La relación entre los niveles de CART y la ingesta ha sido bien establecida en diferentes estudios. En ratas, se ha comprobado que la administración ICV del péptido o el uso de anticuerpos específicos contra CART provoca una disminución de la ingesta en roedores.^{29,30} En el caso de humanos, se han relacionado polimorfismos en el extremo 5' del gen que codifica la molécula con una mayor prevalencia de obesidad.^{31,32}

Por otro lado, se sabe que la POMC se transforma postraduccionalmente generando diferentes hormonas de la familia de las melanocortinas como la α y la β -hormona estimuladora de melanocitos (α -MSH y β -MSH respectivamente) que tienen importantes efectos sobre la ingesta. En modelos animales que carecen de POMC, la administración de α -MSH es suficiente para provocar una disminución significativa de la ingesta.³³ Por otro lado, las mutaciones en la región que codifica la expresión de β -MSH se correlacionan con una mayor probabilidad de padecer obesidad.³⁴

1.2.3 Metabolismo de ácidos grasos y su papel en la ingesta

Las poblaciones neuronales descritas anteriormente son capaces de responder a variaciones en los niveles periféricos de nutrientes como la glucosa o lípidos, y a hormonas como la leptina o la insulina, que son interpretadas como un reflejo del estado energético del organismo. Un estado de ayuno y su consecuente disminución en los niveles de glucosa provocan un aumento en la expresión de los neuropéptidos AgRP/NPY y una disminución de los niveles de POMC/CART.³⁵ Así mismo, la ingesta de alimentos y el aumento del nivel de glucosa en sangre que se deriva produce el efecto contrario.³⁶

Dado que el cerebro obtiene energía principalmente de la glucosa, se pensaba que el mecanismo que regía la ingesta obedecía exclusivamente a cambios en la glucemia. No fue hasta 2002 que se comenzó a considerar el rol de los ácidos grasos en la modulación del apetito tras comprobar que la administración ICV de ácido oleico reducía la ingesta en roedores, al tiempo que reducía los niveles de AgRP y aumentaba los niveles de POMC.³⁷

Estudios posteriores sugieren que los cambios en el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga (LCFA, del inglés *long-chain fatty acids*) en el hipotálamo están relacionados con la expresión de los neuropéptidos AgRP y NPY, modulando así la ingesta^{38,39}. Además, se ha visto que la inhibición de la esterificación de estos con coenzima A (HCoA) para formar LCFA-CoA provoca desajustes en la regulación de la glucosa hepática.⁴⁰ En caso necesario, los LCFA-CoA son oxidados en la matriz mitocondrial, pero dado que no pueden difundir libremente a través de la membrana se requiere un mecanismo específico del que forma parte la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), una enzima de la membrana mitocondrial externa que además regula la velocidad del proceso.⁴¹ La actividad de esta enzima se ve afectada por los niveles de malonil-CoA, un metabolito intermedio de la síntesis de ácidos grasos que es capaz de inhibir la CPT1.⁴² Se ha comprobado que la disminución de la actividad de la CPT1 a nivel del hipotálamo provoca un aumento en los niveles de LCFA-CoA y una disminución significativa de la ingesta en roedores, producida por la disminución en la expresión de los neuropéptidos AgRP/NPY.⁴³⁻⁴⁵

También se conoce que la inhibición de la ácido graso sintasa (FAS, del inglés *fatty acid synthase*), la enzima encargada de la síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir de malonil-CoA, produce una disminución en la ingesta.⁴⁶ Se ha propuesto que este efecto puede ser causado por el aumento de los niveles de malonil-CoA⁴⁷ ya que la administración central de esta molécula es suficiente para reducir los niveles de ingesta.^{47,48} Del mismo modo, la disminución de los niveles de malonil-CoA a través de la sobreexpresión de la malonil-CoA descarboxilasa (MCD) provocan un aumento en la ingesta y el peso de los roedores tratados.

Por último, se conoce que niveles energéticos bajos activan la proteína quinasa dependiente del AMP (AMPK), que es a su vez inhibidora de la acetil-CoA sintetasa (ACC) encargada de la síntesis de malonil-CoA.⁴⁹ Esto disminuye su concentración hipotalámica e incrementa la actividad de la CPT1, resultando en una mayor oxidación

de ácidos grasos y una disminución de los niveles de LCFA-CoAs, aumentado el apetito. Cuando el organismo recibe nutrientes ocurre el efecto contrario y se produce una disminución de la ingesta. En la **Figura 2** se resumen estos procesos.

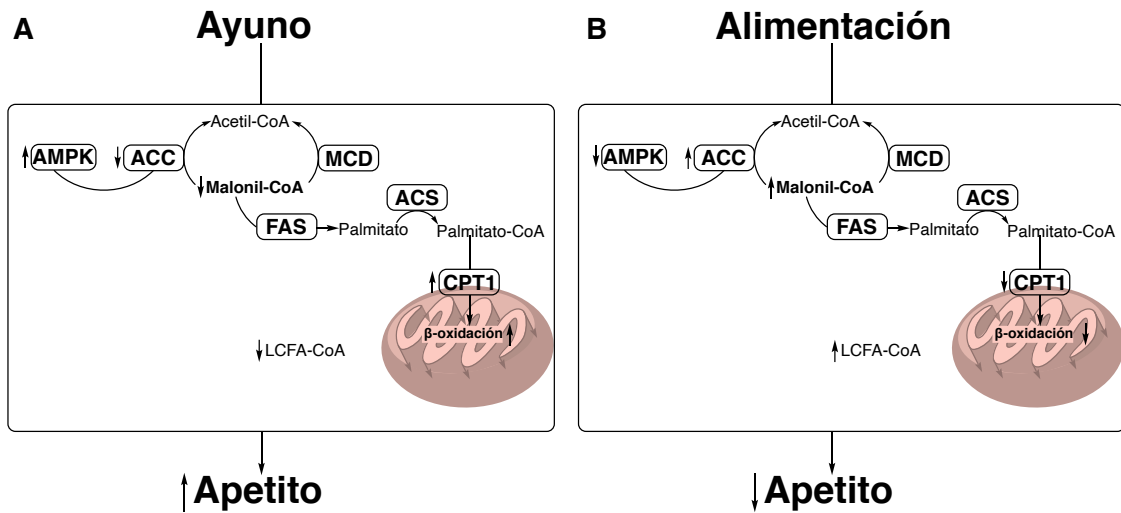
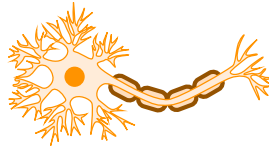


Figura 2. A. Durante el ayuno se activa AMPK y se inhibe ACC, disminuyendo los niveles de malonil-CoA. La CPT1 y la β -oxidación de ácidos grasos se encuentran más activadas y disminuye el nivel de LCFA-CoAs en el citosol. Se observa un aumento de la ingesta. **B.** Cuando los niveles energéticos aumentan, ACC se activa y suben los niveles de malonil-CoA. Se inhiben CPT1 y la oxidación de los ácidos grasos. Los niveles de LCFA-CoAs en el citosol aumentan y el apetito disminuye.

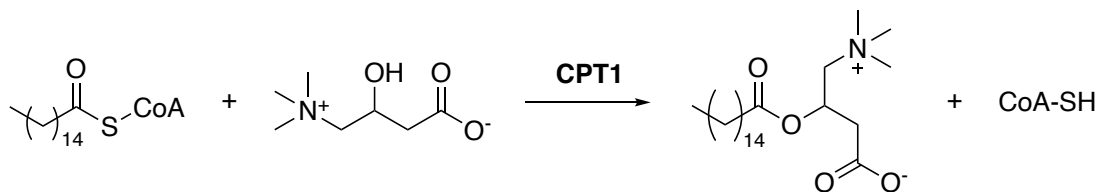
Aunque el mecanismo exacto que rige la modulación de la ingesta no se conoce en detalle, está claro que es un mecanismo complejo en el que el malonil-CoA, los LCFA-CoAs y las enzimas FAS y CPT1 a nivel de hipotálamo modulan la expresión de los péptidos que regulan el apetito, participando activamente en el mantenimiento de la homeostasis energética. Este hecho convierte a la FAS y la CPT1 en dianas terapéuticas para tratar enfermedades relacionadas con desequilibrios energéticos como la obesidad.^{48,50,51}

1.3 Carnitina palmitoiltransferasa, CPT1

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la CPT1 cumple un papel importante en la modulación del apetito y la ingesta en modelos animales y en este apartado profundizaremos en la naturaleza de la proteína.

1.3.1 Función

A diferencia de los ácidos grasos de cadena corta, los LCFA no pueden atravesar la membrana mitocondrial. La CPT1 actúa junto a la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2) y la carnitina acilcarnitina translocasa (CACT) en un sistema que permite la modificación estructural de los LCFA de manera que puedan atravesar la membrana mitocondrial y ser β -oxidados para la obtención de energía. El centro activo de la CPT1 está situado en el lado citosólico de la membrana externa de la mitocondria. Cataliza la transferencia de un grupo acilo de LCFA-CoA desde la coenzima A a la L-carnitina. Normalmente la enzima transforma palmitoil-CoA en palmitoil-carnitina (**Esquema 1**), de ahí su nombre.



Esquema 1. Transformación del palmitoil-CoA en palmitoil-carnitina catalizado por la CPT1 en la membrana exterior de la mitocondria.

En el espacio intermembrana, la CACT transporta la palmitoil-carnitina formada a la matriz mitocondrial. Una vez allí la CPT2 se encarga de revertir la reacción de la CPT1 para que el palmitoil-CoA pueda comenzar el ciclo de β -oxidación (**Figura 3**).

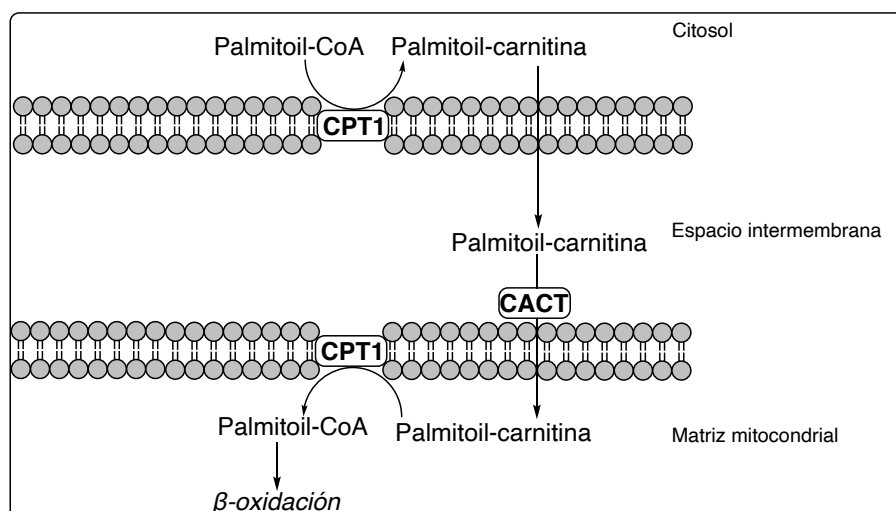


Figura 3. La CPT1 convierte el palmitoil-CoA en palmitoil-carnitina para que pueda entrar espacio intermembrana. Una vez allí, la CACT la transfiere a la matriz mitocondrial, donde la CPT2 revierte la reacción de la CPT1 formando palmitoil-CoA.

La primera etapa catalizada por la CPT1 es la limitante de todo el proceso, lo que convierte a la CPT1 en la enzima reguladora de la β -oxidación de ácidos grasos.

1.3.2 Isoformas de CPT1

Hasta hoy no se ha podido cristalizar la carnitina palmitoiltransferasa 1 por lo que su estructura exacta se desconoce. No obstante, se sabe que existen al menos tres isoformas: la CPT1A, CPT1B y CPT1C. Aunque las tres tienen una estructura similar, existen pequeñas diferencias entre ellas. Las dos primeras se encuentran en la membrana externa mitocondrial en la mayoría de los tejidos en proporción variable; la CPT1A se encuentra ampliamente extendida en muchos tejidos especialmente en hígado, tejido adiposo blanco, cerebro, etc... y la CPT1B se expresa más en tejidos con altas tasas de oxidación de ácidos grasos como el músculo esquelético o el tejido adiposo marrón. La CPT1C, la última en ser descubierta, se encuentra sobre todo en el retículo endoplasmático. Además, curiosamente, sólo se encuentra en el cerebro y testículos.⁵²

Respecto a su actividad, cabe destacar que la CPT1A tiene una mayor afinidad por la carnitina que la CPT1B ($K_M \approx 30 \mu M$ y $500 \mu M$ respectivamente).^{53,54} A su vez, la isoforma B presenta una mayor sensibilidad (unas 30-100 veces mayor) frente al inhibidor malonil-CoA.⁵⁵ Por último, cabe destacar que aunque la CPT1C presenta una secuencia similar a las otras isoformas, no está involucrada en la oxidación de ácidos grasos y su actividad catalítica es residual.⁵² No obstante, estudios recientes sugieren que podría tener una función relacionada con la monitorización del estado energético del organismo^{56,57} y modelos de animales transgénicos que no expresan esta proteína (también referidos como KO, del inglés *knockout*) mostraron una menor ingesta y una disminución del peso respecto a los ratones control. Se ha sugerido que el mecanismo de la regulación podría deberse a que la CPT1C actúa como tampón de malonil-CoA, modulando indirectamente la actividad de la CPT1A.⁵⁸

1.3.3 Modulación de la actividad de CPT1

Como se ha explicado con más detalle en apartados anteriores, el inhibidor endógeno malonil-CoA regula el nivel de actividad de la isoforma CPT1A y es capaz de unirse a la CPT1C en el hipotálamo, por lo que ambas isoformas parecen tener un papel importante en la regulación de la ingesta.

Por este motivo, la modulación de la actividad de la CPT1 a través de moléculas pequeñas ha sido ampliamente estudiada con el objetivo de comprender su función dentro del metabolismo general de la célula, y poder aplicarlo en el tratamiento de enfermedades derivadas de la disrupción de la homeostasis energética.⁵⁹

1.3.3.1 Inhibición de la CPT1

La mayoría de los compuestos descritos como moduladores de la actividad de CPT1 actúan como inhibidores uniéndose al centro activo de la enzima, aunque algunos pocos parecen actuar compitiendo alostéricamente con el centro de unión del malonil-CoA. A grandes rasgos se pueden clasificar en dos categorías; ácidos oxirano carboxílicos y derivados de acilcarnitinas.

1.3.3.1.1 Compuestos basados en la carnitina

La L-carnitina natural (**Figura 4, A**), sustrato de las CPT, ha sido utilizada como punto de partida en la síntesis de derivados con capacidad inhibitoria de la CPT1.⁶⁰ Un ejemplo interesante son las acilcarnitinas sintéticas **B** y **C** (**Figura 4**), moléculas que han mostrado capacidad inhibitoria de CPT1⁶¹ y provocan una disminución en el apetito y el peso de los ratones a los que se administra.⁴³ También cabe citar el compuesto **C** que presenta una mayor inhibición de la CPT1A frente a la isoforma B.⁶²

También se han descrito como inhibidores de CPT1 moléculas con diferentes grupos funcionales y estructuras, como el fosfonato tetrahédrico **D** o el análogo cíclico **E** (**Figura 4**) demostrando cierta versatilidad en el tipo de estructuras que actúan sobre la actividad de la enzima.

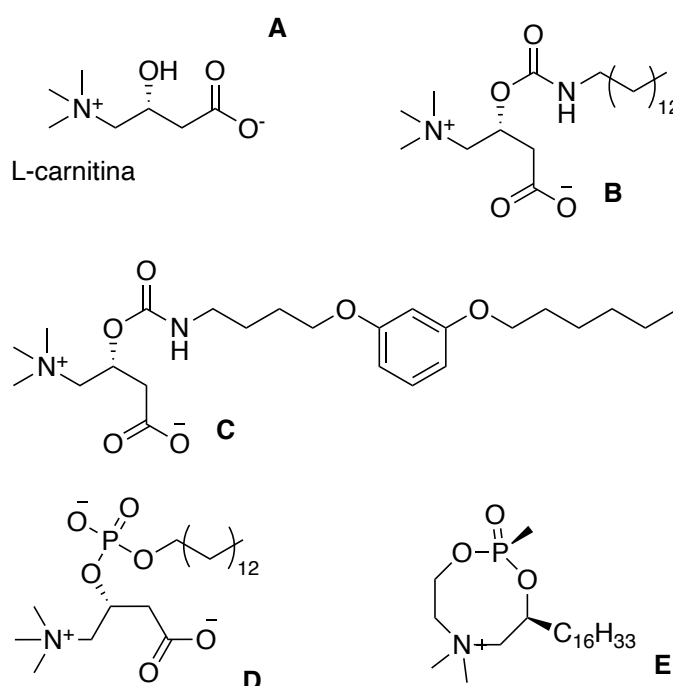


Figura 4. Estructuras químicas de moléculas inhibitorias de la actividad CPT1 con estructuras derivadas de acilcarnitinas.

1.3.3.1.2 Ácidos oxirano carboxílicos

Ciertos ácidos oxirano carboxílicos son inhibidores irreversibles que deben ser convertidos en sus derivados CoA para ser activos, cosa que ocurre de manera espontánea en condiciones fisiológicas.⁶³

Todas las moléculas dentro de esta categoría estudiadas hasta la fecha presentan un estereocentro en la posición C2, siendo el enantiómero *R* el más activo. El ejemplo más representativo es el etomoxir (**Figura 5**), cuya forma activa es el etomoxir-CoA (**Figura 5**). Ha sido ampliamente utilizado en estudios sobre la inhibición de la β -oxidación de ácidos grasos^{64,65} y su administración central provoca una disminución de la ingesta en modelos animales.⁶⁶

La mayoría de estos compuestos no son selectivos en la inhibición de las isoformas A y B, a excepción del dinitrofenil-etomoxir (**Figura 5**), que es mucho más inhibidor de la

CPT1A. No obstante, se ha postulado que esta diferencia se debería a la mayor facilidad del hígado frente al músculo para formar su derivado CoA y no a una mayor afinidad por la isoforma A.⁶⁷

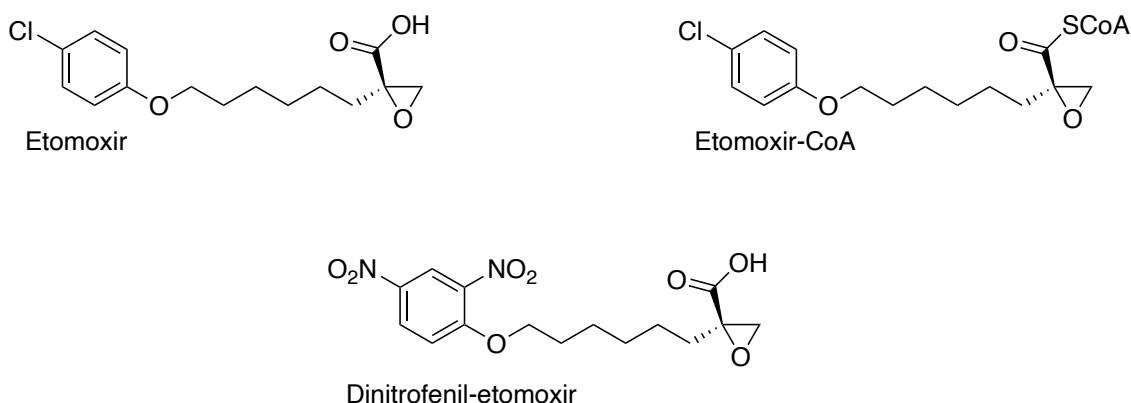


Figura 5. Estructuras químicas del etomoxir, su forma CoA y el derivado dinitrofenil-etomoxir.

1.3.3.1.3 Otros inhibidores

También existen moléculas sintéticas como el β -cetoácido aromático RO-25-0187 (**Figura 6**) que son capaces de discriminar entre las isoformas de la enzima, presentando mayor inhibición sobre la CPT1B respecto a la CPT1A. Este hecho puede relacionarse con la mayor sensibilidad de la isoforma B frente al malonil-CoA⁶⁸ (**Figura 6**), cuya estructura parece mimetizarse en el inhibidor sintético.

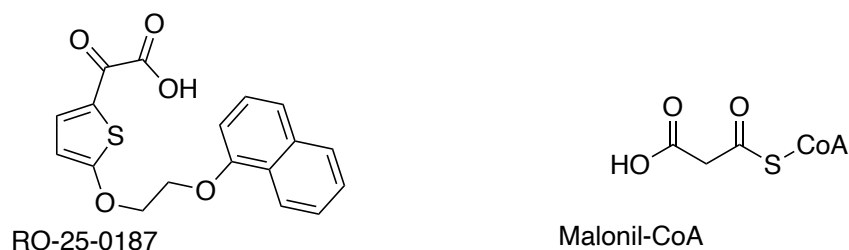


Figura 6. Estructuras químicas del inhibidor de CPT1B RO-25-0187, un, y del malonil-CoA.

1.3.3.2 Activación de la CPT1

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los compuestos descubiertos que actúan como moduladores de la actividad de CPT1 son inhibidores. Sin embargo, se han descrito algunas moléculas con capacidad de activación de la enzima como la genisteína (**Figura 7**), una isoflavona de la soja que suministrada junto a la L-carnitina parece aumentar la actividad de CPT1.⁶⁹ No obstante, el mecanismo de la activación de la CPT1 parece deberse al aumento de factores de transcripción que afectan a la expresión de la enzima y no por interacción directa con la proteína.⁷⁰ Más recientemente se ha sugerido que la baicalina (**Figura 7**), un flavonoide natural, podría activar directamente la CPT1 hepática mejorando la esteatosis hepática asociada a la obesidad inducida por

la dieta.⁷¹ De confirmarse el resultado, se trataría del primer caso descrito de una molécula con capacidad de activar la CPT1 por interacción directa.

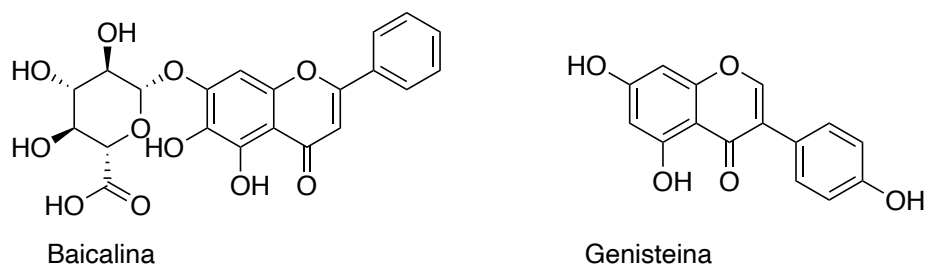


Figura 7. Estructuras químicas de la baicalina y la genisteína, compuestos descritos como activadores de la CPT1.

Mención especial merece el caso del ácido 4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico (conocido como C75, **Figura 8**). Se trata de una molécula con dos estereocentros que fue descrita por primera vez por Kuhajda y *col.* Como un inhibidor sintético de FAS.⁷² Este nuevo compuesto presentaba la capacidad de disminuir la ingesta y el peso de roedores, y se postuló que su efecto ocurría a través de la activación de la CPT1 en el hipotálamo.⁷³ Años más tarde, nuestro grupo descubrió que en condiciones fisiológicas el C75 se transforma en C75-CoA, una especie que actúa como un inhibidor muy potente de la actividad de CPT1.⁶³

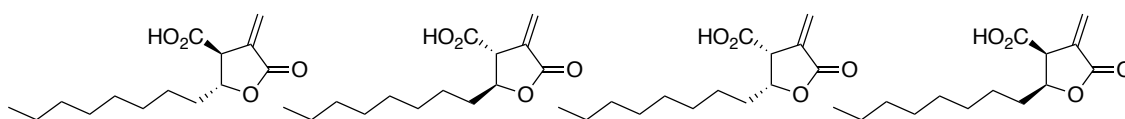


Figura 8. Estructura química de los 4 estereoisómeros del C75.

Esta molécula, por ser el eje central de la tesis, será discutida con mayor detalle en apartados posteriores.

1.4 Cáncer

En condiciones normales, las células de un organismo se dividen de manera meticulosamente regulada en respuesta a las necesidades biológicas y mueren cuando se dañan o han cumplido su función. No obstante, este proceso natural puede alterarse dando lugar al cáncer, donde células anormales o dañadas crecen sin control. Además, en algunos casos estas células pueden diseminarse a tejidos vecinos o lejanos dentro del mismo organismo en un proceso conocido como metástasis.⁷⁴

Según la organización mundial de la salud en el año 2020 casi 20 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer y casi 10 millones fallecieron a causa de la enfermedad. Encabezando la lista de nuevos diagnósticos se encuentran el cáncer de pulmón (11,7 %) y el de mama (11,4 %),⁷⁵ pero la lista de cánceres con una incidencia anual de por encima de los 40.000 casos llega hasta 13 tipos según datos del National Cancer Institute de los EE.UU.⁷⁶ Asimismo, se estima que para el 2040 los nuevos casos aumenten un 50%, lo que implicaría más de 30 millones de nuevos diagnósticos anuales.

La base de la enfermedad es de origen genético,⁷⁴ aunque se postula que solo el 5-10% de los cánceres se deben a factores heredados. El 90-95% de los casos restantes se deben a mutaciones en el genoma causados por factores ambientales como las infecciones, la contaminación o el estilo de vida.⁷⁷ Es conocido que la exposición a algunas sustancias aumenta el riesgo de aparición de cáncer.⁷⁸⁻⁸⁰ El tabaco, por ejemplo, es causante de un tercio de todos los cánceres de pulmón diagnosticados en los países desarrollados.⁸¹ Por otro lado, la dieta, el sedentarismo y la obesidad, que son cada vez más frecuentes en países desarrollados, se relacionan estrechamente con la aparición de cáncer.^{77,82,83}

Para que una célula se convierta en cancerosa debe tener una serie de características que resumieron Hanahan y Weinberg en un trabajo publicado en 2011:⁸⁴

- Mantenimiento de las señales proliferativas
- Evasión de los supresores del crecimiento
- Activación la inmortalidad en inmortalidad replicativa
- Inducir la vascularización del nuevo tejido formado (angiogénesis)
- Resistir la muerte celular
- Reprogramación metabólica

En esta tesis nos centraremos en los efectos de la reprogramación metabólica y más concretamente en el papel de los lípidos en la célula cancerosa.

1.4.1 Reprogramación metabólica en la célula cancerosa

Para que una célula cancerosa pueda mantener la inusual tasa de división celular requiere grandes cantidades de energía, que a nivel de biología molecular se encuentra en almacenada mayoritariamente en forma de adenosín trifosfato (ATP). La obtención de esta molécula a nivel celular proviene de dos rutas metabólicas diferentes; la glicolisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos (o ciclo de Krebs). En la primera, la célula obtiene 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa que oxida a piruvato. En la segunda, el piruvato es oxidado totalmente a CO_2 donde el aceptor receptor final de los electrones es el O_2 . La mitocondria acopla el potencial reductor de la cadena de transporte de electrones con la biosíntesis de ATP mediante un gradiente electroquímico, obteniéndose de esta manera 36 moléculas de ATP por cada una de glucosa. En condiciones bajas de oxígeno molecular, como en los músculos tras el ejercicio intenso, la célula redirige el piruvato formado en el citosol para oxidarlo a lactato sin requerir oxígeno. Esta ruta proporciona solo 2 moléculas de ATP, pero se obtienen 2 de NAD^+ , generando poder oxidativo en la célula para poder sostener la glucólisis y mantener los niveles de energía sin requerir oxígeno, aunque de manera menos eficaz.

Hace cerca un siglo, Warburg descubrió que las células cancerosas en presencia de suficientes nutrientes captan cantidades mayores de glucosa y la oxidan a lactato incluso en condiciones de suficiencia de oxígeno.⁸⁵ El mismo Warburg postuló que esto podía ser debido al desarrollo de mitocondrias dañadas en el cáncer.⁸⁶ No obstante, hoy en día diversos estudios avalan el correcto funcionamiento de estas en la mayoría de los cánceres.⁸⁷⁻⁸⁹ La explicación más aceptada para este hecho, que a priori puede parecer contraintuitivo por la baja eficacia de generación de ATP, es que permite a la célula cancerosa disponer de metabolitos con enlaces carbono-carbono en lugar de oxidarlos a CO_2 , disponiendo así de una mayor de biomasa para la síntesis de biomoléculas necesarias para el mantenimiento de la alta tasa de proliferación celular,⁹⁰ tal y como se muestra en la **Figura 9**.

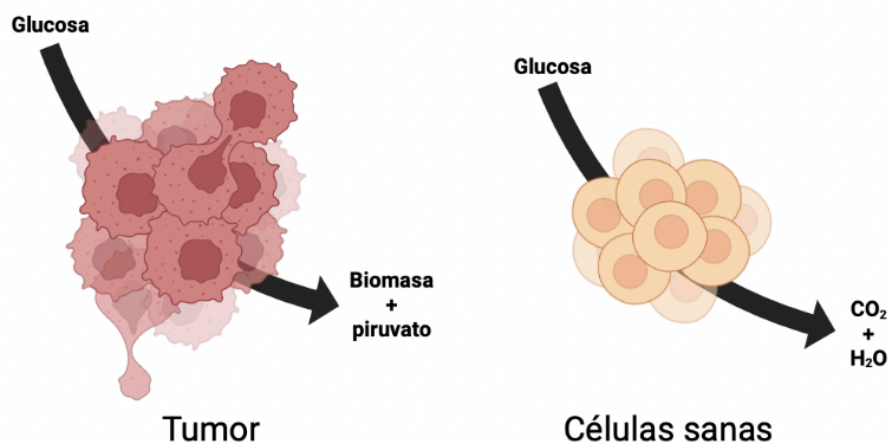


Figura 9. Resumen del efecto Warburg. **Izquierda.** Células cancerígenas emplean la glucosa para la obtención de energía y biomasa permitiendo el rápido crecimiento del tumor en presencia de señales de proliferación. **Derecha.** Las células sanas del mismo tejido oxidan la glucosa totalmente para la obtención de energía.

El estudio del metabolismo de la glucosa en el cáncer ha permitido el desarrollo de nuevas terapias⁹¹ y el diagnóstico por tomografía de emisión de positrones. No obstante, publicaciones recientes sugieren que la contribución de la glucosa a la síntesis de ATP solo es significativa en cultivos donde esta es la única fuente de carbono^{92,93} y que la obtención de energía ocurre principalmente a partir de los ácidos grasos.⁹⁴

1.4.2 Papel de los lípidos en la célula cancerosa

Los lípidos son moléculas imprescindibles para el correcto funcionamiento de cualquier tipo de célula⁹⁵ tanto por su función estructural como en el almacenamiento de energía o en tareas de señalización celular. La biosíntesis de ácidos grasos, FA (del inglés *fatty acids*), en mamíferos sanos tiene lugar principalmente en el tejido adiposo, hígado y, en hembras, en el tejido mamario.⁹⁶ No obstante, a principios de los años 50 se publicó un estudio en el que se demostraba que diferentes tipos de cáncer tienen una capacidad de síntesis *de novo* de FA equiparable a la del hígado. Además, en el mismo estudio se concluyó que, aunque las células cancerígenas obtienen FA de otros tejidos, la biosíntesis endógena facilita la mayoría de la cantidad necesaria para la rápida proliferación del tumor.⁹⁷

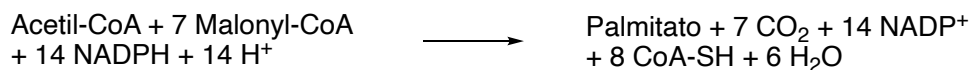
Diferentes estudios resaltan la importancia de los FA para el avance de la enfermedad. Por ejemplo, son necesarios para la construcción de la membrana celular, y se ha comprobado que en el caso del cáncer la síntesis *de novo* favorece un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados y monoinsaturados que podrían tener un papel protector frente al daño oxidativo.⁹⁸ Son también necesarios para la señalización molecular que permite la activación de factores de crecimiento, proliferación celular y migración.⁹⁹ Además, existen indicios que relacionan los FA con la angiogénesis, ya que la inhibición de la proteína encargada de su síntesis reduce la metástasis tumoral.¹⁰⁰

La obtención de ácidos grasos saturados tiene lugar en el citosol mediante 7 ciclos consecutivos que dan lugar al ácido palmítico de 16 carbonos. Las enzimas encargadas de la catálisis del proceso se encuentran en la proteína FAS, mencionada con anterioridad en el apartado 1.2.3.

1.5 Ácido graso sintasa, FAS

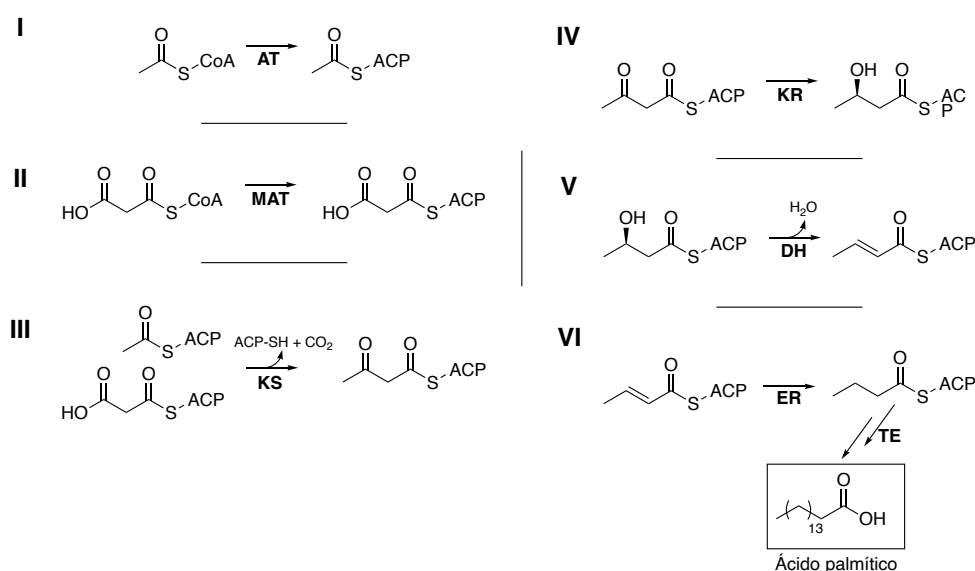
1.5.1 Función y estructura

Como ya se ha mencionado anteriormente, la ácido graso sintasa (FAS, del inglés *fatty acid synthase*) es la única proteína capaz de realizar la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena larga, y en particular del palmitato. Se necesitan 16 carbonos para la biosíntesis del ácido graso, de los cuales los dos primeros provienen del acetil-CoA y los otros de 7 unidades de malonil-CoA. La estequiometría global es la siguiente:



Con algo más de detalle, la síntesis consta de 6 reacciones:

1. **Iniciación:** El acetil-CoA se une a la proteína transportadora de acilos (ACP) mediante la acetil-CoA-ACP transacilasa (AT) (**Esquema 2, I**) y es transferido a la β -acetil-ACP sintasa (KS). El malonil-CoA sigue la misma ruta inicial catalizado por la acetil-CoA-ACP transferasa (MAT) y no se transfiere a la KS (**Esquema 2, II**).
2. **Condensación:** El grupo acetilo unido a la KS, que cataliza este paso, reacciona con el carbono 2 del malonil-ACP mediante una condensación de Claisen liberando una molécula de CO₂ en el proceso (**Esquema 2, III**).
3. **1ª Reducción:** La cetona es reducida a alcohol por la β -cetoacil reductasa (KR) consumiendo una unidad de NADPH para formar el alcohol correspondiente (**Esquema 2, IV**).
4. **Deshidratación:** La β -hidroxiacil deshidratasa (DH) cataliza la eliminación del alcohol generando un doble enlace (**Esquema 2, V**).
5. **2ª Reducción:** El doble enlace generado es reducido por la enoil-ACP reductasa (ER) donde el NADPH es de nuevo el reductor (**Esquema 2, VI**).
6. **Finalización:** En caso de tratarse de ciclos intermedios se produce la transferencia del intermedio a la KS para condensar de nuevo con otra molécula de malonil-CoA hasta llegar a los 16 carbonos. En el último ciclo se libera el palmitoil de la ACP, mediante la hidrólisis catalizada por la palmitoil tioesterasa (TE), en forma de palmitato o de palmitoil-CoA. (**Esquema 2, VII**).



Esquema 2. Conjunto de reacciones que dan lugar a la formación del ácido palmítico catalizada por la FAS. **ACP:** Proteína transportadora de acilos. **AT:** Acetil-CoA-ACP transacilasa. **MAT:** Acetil-CoA-ACP transferasa. **KS:** β -acetil-ACP sintasa. **KR:** β -cetoacil reductasa. **DH:** β -hidroxiacil deshidratasa. **ER:** Enoil-ACP reductasa. **TE:** Palmitoil tioesterasa.

La proteína existe en dos formas en la naturaleza conocidas como FAS tipo I y tipo II. La FAS tipo I se encuentra en eucariotas y plantas, consiste en dos subunidades diferentes de unos 185 y 180 kDa que forman un complejo de tipo $\alpha_6\beta_6$. En el caso de la FAS tipo II, correspondiente a eucariotas, se pensaba que consistía también en un complejo heterodimérico, pero cuando se realizó la electroforesis de la proteína en condiciones no proteolíticas se descubrió que se trataba de un homodímero de dos cadenas peptídicas idénticas de unos 250 kDa cada una.

1.5.2 Regulación de la síntesis de FA

Como ya se citó en el apartado 1.4.2, la síntesis *de novo* de los ácidos grasos juega un rol fundamental en la supervivencia y proliferación de la célula cancerosa. Esto ha contribuido al interés por estudiar la regulación de la actividad de la FAS, enzima clave en la síntesis, y la alteración de esta como una posible diana terapéutica para combatir el cáncer.¹⁰¹

1.5.2.1 Expresión de la FAS y su papel en el cáncer

En mamíferos, la síntesis de ácidos grasos parece estar mediada por la ingesta y estimulación hormonal a través de la transcripción de las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP).¹⁰²⁻¹⁰⁴ Las SREBP son unos factores de transcripción, codificados por los genes SREBP1 y SERBP2, que se encuentran unidos a la membrana nuclear y al retículo endoplasmático. Ante la disminución de los niveles citosólicos de ácidos grasos, se produce la escisión de la proteína generando un residuo N-terminal soluble en agua que es traslocado al núcleo de la célula donde activa la transcripción de genes codificantes de proteínas lipogénicas, entre las que se encuentra la FAS.¹⁰⁵

La regulación de la expresión de la FAS en las células cancerígenas sigue vías similares a las células normales y puede ser independiente de factores nutricionales.¹⁰¹ Por otra parte, son numerosos los tipos de cáncer (mama, próstata, ovarios, tiroides...) donde se encuentra sobreexpresada.

Se ha comprobado que el silenciamiento de la enzima mediante RNA de interferencia induce la apoptosis en células de próstata sin afectar a células sanas¹⁰⁶ y que la inhibición farmacológica de la enzima también provoca la apoptosis en la línea celular MCF-7, correspondiente al cáncer de mama.^{107,108}

Profundizando en los efectos metabólicos producidos por la inhibición de la FAS dentro de la célula cancerosa, encontramos diferentes vías afectadas:¹⁰⁹

- Inhibición de la síntesis de fosfolípidos que afecta a la capacidad de generación de membranas celulares para la división celular y a los microdominios necesarios para el correcto funcionamiento del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y el receptor de estrógenos (ERBB2).
- La replicación del ADN se ve afectada sin los fosfolípidos requeridos, deteniendo el ciclo celular de la célula cancerosa.

- Aumento en los niveles de malonil-CoA que disminuyen la β -oxidación de ácidos grasos y la síntesis de ATP. Además, provoca un aumento en la síntesis de ceramidas que pueden inducir la expresión de genes relacionados con la apoptosis celular.
- Regulación a la baja de proteína quinasa B (Akt) que puede provocar apoptosis en las células por su inhibición de proteínas que evitan la muerte celular programada.
- Disrupción del ciclo celular mediado por la proteína supresora de tumores p53, que responde al estrés metabólico causado por la inhibición de la FAS, y actúa induciendo la apoptosis celular o la detención del ciclo celular.

El impacto significativo que tiene la inhibición de FAS en células cancerígenas pone de manifiesto la importancia de desarrollar moléculas que sean capaces de reducir su actividad con el fin de obtener nuevos agentes quimioterapéuticos.

1.5.2.2 Inhibición de la FAS

Desde el descubrimiento del papel que juega la FAS en el cáncer, muchos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en la síntesis y caracterización de la actividad biológica de diferentes inhibidores de la proteína. En este apartado estudiaremos con más detalle algunos de los más relevantes.

1.5.2.2.1 Cerulenina

La (2*R*,3*S*,*E*,*E*)-2,3-epoxi-4-oxo-7,10-dodecadienamida, más conocida como cerulenina, fue el primer inhibidor de la FAS descrito¹¹⁰ (**Figura 10**). Se trata de un producto natural aislado del *Cephalosporum caerulens* y presenta propiedades antibióticas ya que es capaz de inhibir tanto la FAS tipo I como la tipo II.¹¹¹ El mecanismo de inhibición es por apertura irreversible del epóxido de su estructura por un residuo de cisteína presente en el centro activo del dominio KS de la proteína.¹¹² La cerulenina ha mostrado su eficacia en la inhibición de la división celular en diferentes líneas de cáncer y es también capaz de suprimir la metástasis en modelos murinos y en humanos tanto por sí mismo como en combinación con otros fármacos, potenciándose su efecto.^{113–118}

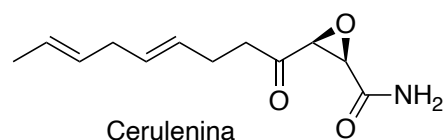


Figura 10. Estructura química de la cerulenina.

No obstante, la presencia del epóxido limita las propiedades terapéuticas del compuesto, ya que la alta reactividad química del grupo funcional conlleva una falta de estabilidad del compuesto en condiciones fisiológicas y una probable falta de selectividad en las enzimas que inhibe.¹¹⁹

1.5.2.2.2 (5R)-tiolactomicina y derivados

La (5R)-tiolactomicina (**Figura 11**) fue descrita por primera vez en el 1982¹²⁰ como un antibiótico con capacidades inhibitorias de la FAS tipo I, pero con poca eficacia frente al tipo II.¹²¹ No obstante, modificaciones posteriores en la estructura han permitido obtener derivados con buena actividad inhibitoria frente a la FAS tipo II presente en mamíferos. Tal es el caso del compuesto C247¹²² (**Figura 11**) que demostró ser efectivo en el tratamiento del cáncer de mama sin provocar efectos secundarios como la disminución del peso.¹²³

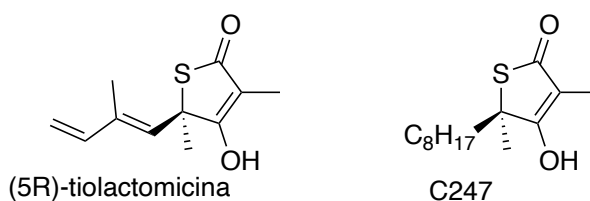


Figura 11. Estructura química de la (5R)-tiolactomicina y su derivado sintético C247.

1.5.2.2.3 Orlistat

El orlistat (**Figura 12**) es un fármaco aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) derivado del compuesto natural lipstatina (**Figura 12**) para el tratamiento de la obesidad. La molécula es capaz de inhibir las lipasas gástricas y pancreáticas impidiendo la hidrólisis de los triglicéridos y, por ende, la absorción de ácidos grasos.¹²⁴ Posteriormente se comprobó que el fármaco también presentaba acción inhibitoria de la FAS¹²⁵ por unión al dominio tioesterasa (TE) que libera el palmitato de la enzima en el último paso de la biosíntesis.

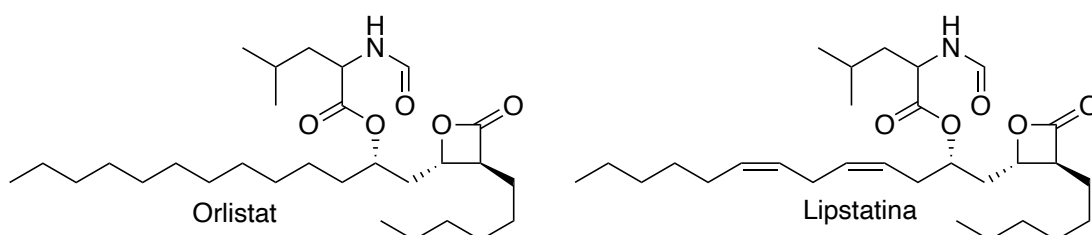


Figura 12. Estructura química del orlistat y de la lipstatina.

Múltiples estudios avalan la capacidad terapéutica del orlistat inhibiendo el crecimiento en diferentes líneas celulares cancerígenas de próstata, mama, ovario o endometrio.¹²⁶ Además, se ha empleado con éxito en modelos *in vivo* provocando la reducción de tumores sólidos.^{125,127}

En 2009 se publicó un estudio proteómico de las todas las posibles dianas enzimáticas del orlistat¹²⁸ resultando que afectaba 7 proteínas diferentes, de las cuales algunas están relacionadas con el cáncer como la β -tubulina. No obstante, se ha sugerido que este efecto es indirecto, ya que la β -tubulina es modificada postraduccionalmente con el ácido palmítico, producto de la FAS, y la inhibición de la enzima produce una disrupción de la estabilidad de las estructuras tubulares.¹²⁹ A pesar de la actividad antitumoral del

compuesto, su baja biodisponibilidad por vía oral es una seria limitación para su uso en pacientes con cáncer.¹³⁰

1.5.2.2.4 Flavonoides

El (-)-galato de epigalocatequina (**Figura 13, F**) y el (-)-galato de epicatequina (**Figura 13, G**), aislados del té verde, fueron los primeros compuestos de tipo polifenólico que demostraron ser activos en la inhibición de la FAS mediante su unión al dominio cetoacil sintasa (KS) de la proteína.¹³¹ Basándose en este tipo de estructuras se ha conseguido preparar un derivado sintético (**Figura 13, H**) con una actividad muy superior a la del (-)-galato de epigalocatequina frente a la línea celular SkBr3 de cáncer de mama.

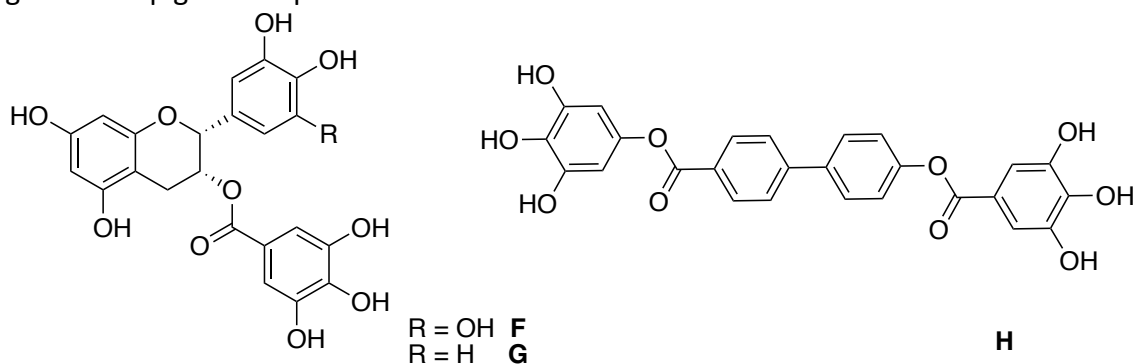


Figura 13. Estructuras de los flavonoides naturales activos contra FAS (**F, G**) y del derivado sintético (**H**) con una mayor capacidad inhibitoria.

A pesar de la potencial actividad terapéutica de los compuestos, ningún flavonoide se encuentra en ensayos clínicos como tratamiento para el cáncer.

1.5.2.2.5 TVB-2640

La empresa Sagimet Biosciences, antes conocida como 3-V Biosciences, presentó en 2012 la molécula TVB-2640 (**Figura 14**) como un nuevo inhibidor sintético de FAS y posible fármaco contra la esteatosis hepática no alcohólica.¹³²

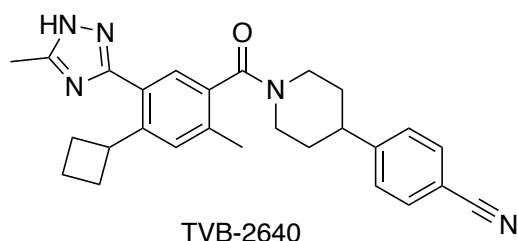


Figura 14. Estructura del TVB-2640.

Se trata de un inhibidor reversible y selectivo de la enzima,¹³³ que además tiene características farmacocinéticas óptimas como su alta biodisponibilidad tras la administración oral.¹³⁴ El compuesto actúa sobre el dominio de la cetoacil sintasa¹³⁵ (KS) y actualmente se encuentra en fase II de estudios clínicos con pacientes, siendo el

primer inhibidor de FAS que está siendo estudiado en humanos como agente quimioterapéutico.^{134,136,137}

1.5.2.2.6 C75 y derivados

El C75, mencionado anteriormente (ver apartado 1.3.3.2) fue inicialmente descrito como un inhibidor de la FAS.¹³⁸ Es capaz de interactuar con dicha proteína en diferentes dominios, específicamente los dominios KS, ER y TE.¹³⁹ Además, ha mostrado capacidad de inhibición del crecimiento en líneas celulares cancerígenas y en modelos xenograft.¹⁴⁰ No obstante, estudios *in vivo* con el C75 mostraron efectos adversos como la reducción del apetito y un acentuado descenso de peso en roedores debido a su capacidad de inhibición de la CPT1,^{46,141} así como por causar malestar y diarrea en los animales tratados.¹⁴² Más tarde nuestro grupo mostró que la actividad inhibitoria de la FAS corresponde al enantiómero (-)-C75 y que dicho isómero no tiene apenas efectos sobre la ingesta.¹⁴³ Teniendo en cuenta estos precedentes nuestro grupo pudo sintetizar el análogo (-)-UB006 (**Figura 15**).

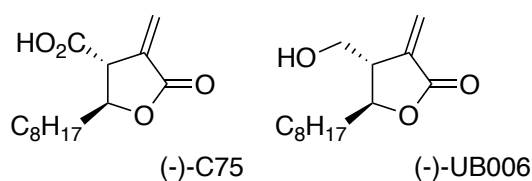


Figura 15. Estructura química del isómero (-)-C75 y del derivado (-)-UB006.

Se trata de un derivado con mayor capacidad de inhibición de la FAS, que además ha demostrado frenar el crecimiento de diferentes líneas celulares cancerígenas como OVCAR3 o MCF-7, de ovario y mama respectivamente, sin presentar efectos sobre la ingesta en modelos animales.¹⁴⁴ Estas moléculas serán objeto de estudio en más detalle en el siguiente apartado, por ser el eje central de la presente tesis.

1.6 C75

El ácido *trans*-4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico (**Figura 16**), más conocido como C75, es una α -metileno- γ -butirolactona que fue descrita por primera vez por Kuhajda *et al.* como un inhibidor sintético de la FAS con un mecanismo de acción análogo al de la cerulenina.⁷² Su estructura presenta una clara similitud estructural con los ácidos paracónicos (**Figura 16**), que son un tipo de compuestos naturales que presentan diferentes actividades biológicas.

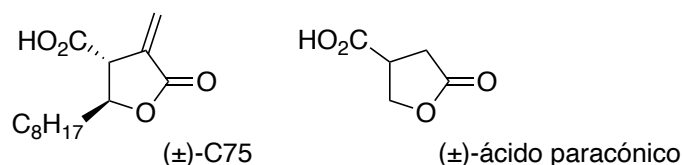


Figura 16. Estructura química del (±)-C75 y del (±)-ácido paracónico con el que guarda una similitud estructural.

1.6.1 Actividad biológica del C75

1.6.1.1 Inhibidor de FAS

La primera referencia del compuesto describe a la lactona como inhibidora reversible de la FAS por unión covalente a la enzima. El compuesto fue sintetizado como un análogo de la cerulenina con la que presenta cierta similitud estructural. Ambas moléculas tienen una cadena carbonada no ramificada de 8 carbonos y dos grupos carbonilo que flanquean un grupo electrófilo; en el caso de la cerulenina se trata de un epóxido y en el caso del C75 un doble enlace conjugado con un éster que puede actuar como aceptor de Michael (**Figura 17**).

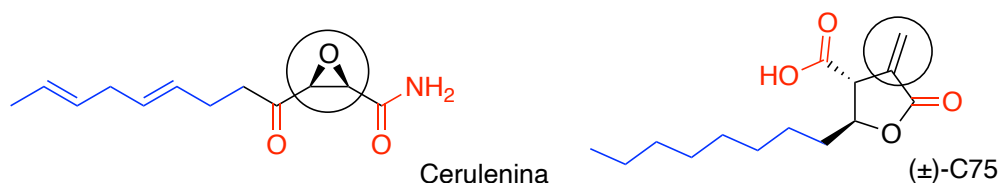
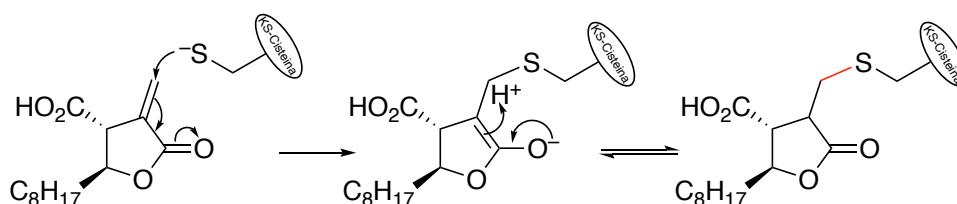


Figura 17. Estructuras químicas de la cerulenina y C75. En azul la cadena carbonada de igual longitud, en rojo la presencia de dos grupos carbonilo y remarcado con un círculo la parte electrofílica de la molécula.

Como se ha mencionado anteriormente, el C75 parece actuar sobre diferentes dominios de la FAS, concretamente los dominios de la β -cetoacil sintasa (KS), enoil reductasa (ER) y la tioesterasa (TE).¹³⁹ Comparativamente, la actividad de la cerulenina se debe exclusivamente a su interacción con la KS. El mecanismo de acción del C75 sobre el centro activo de la KS parece ocurrir a través de la reacción irreversible entre un residuo de cisteína de la enzima y el doble enlace en una reacción conocida como adición de Michael¹⁴⁵ (**Esquema 3**).



Esquema 3. Mecanismo de reacción del residuo de cisteína del dominio KS con el C75. En rojo se destaca el nuevo enlace covalente formado entre el inhibidor y la enzima.

Ya en el artículo original donde se describe la molécula se mencionan sus propiedades anticancerígenas sobre la línea celular SkBr3 de cáncer de mama, caracterizada por una elevada expresión de la FAS.⁷² Estudios posteriores avalan su capacidad para reducir el crecimiento celular de diferentes tipos de cáncer como mama, próstata u ovario,^{146–148} y más recientemente se está estudiando el uso del inhibidor como un agente sensibilizante frente a iones en radioterapia de cáncer de próstata.¹⁴⁹

A pesar de su capacidad anticancerígena, el uso del C75 en modelos *in vivo* mostraba una disminución en la ingesta y un descenso del peso de los animales asociado a su capacidad inhibitoria de la CPT1 hipotalámica, como se ha mencionado anteriormente.^{46,141}

1.6.1.2 Inhibidor del apetito

Paralelamente al descubrimiento de las propiedades antitumorales del C75, se descubrió su efecto anorexigénico. Este efecto indeseado que *a priori* lo descartaba como posible fármaco contra el cáncer, supuso una oportunidad para el tratamiento de la obesidad.

En el primer trabajo publicado sobre el efecto de la molécula sobre la ingesta se administró a los roedores diferentes dosis de C75 por vía intraperitoneal (IP). Los autores describen una reducción en la ingesta del 90% durante las 24 h posteriores a la inyección y una marcada disminución del peso, ambas de manera dosis-dependiente. Asimismo, reportan la reversibilidad de los efectos tras interrumpir el tratamiento.⁴⁶

Cuando se comparan los efectos de la molécula en modelos de ratones obesos (*ob/ob*) con ratones control se encuentran dos grandes diferencias: El modelo de obesidad responde mejor a la inhibición de la ingesta (reducción del 90% frente al 50%), y solo los ratones en normopeso generan resistencia al compuesto tras 2-5 días de administración continua. Además, la interrupción del tratamiento parece generar un efecto rebote en la ingesta de los animales control.¹⁵⁰

Cuando el compuesto se administra por vía intracerebroventricular también se observa una disminución del peso y la ingesta de los roedores, sugiriendo que el compuesto actúa a nivel del sistema nervioso central.¹⁵¹ Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que ratones tratados con C75 muestran una reducción en los niveles de los péptidos orexigénicos AgRP/NPY, incluso por debajo de los niveles en ratones alimentados, y un aumento de la concentración de los neuropéptidos anorexigénicos POMC/CART a nivel del hipotálamo.^{46,152}

La inhibición hipotalámica de la CPT1 por el C75 tiene también efectos a nivel sistémico y provoca un aumento del gasto energético. Se ha comprobado que esto ocurre por cambios en la expresión génica de tejidos periféricos como el BAT y el músculo esquelético, donde aumenta la expresión de la termogenina (UCP, del inglés *uncoupling protein*) y la oxidación de ácidos grasos.^{153,154} La UCP es la proteína responsable de la termogénesis no asociada al temblor y actúa desacoplando la cadena respiratoria de las mitocondrias. Es capaz de permeabilizar la membrana interna mitocondrial permitiendo que los protones vuelvan a la matriz generando calor en el proceso.

Por otro lado, la administración central del C75 aumenta los niveles de CPT1 y reduce la expresión de proteínas involucradas en la lipogénesis a nivel hepático.¹⁵⁵ Originalmente se atribuyó al C75 la activación de la CPT1¹⁵⁶ y la hipótesis fue generalmente aceptada,^{157,158} pero teniendo en cuenta que es capaz de aumentar los niveles de malonil-CoA por inhibición de la FAS, y que esto debería reducir la actividad de CPT1, su rol como activador parece contraintuitivo. Además, en 2005 se descubrió que la administración i.p. en roedores provocaba una disminución en la ingesta sin inhibir la FAS hipotalámica.¹⁵⁹ Poco después, nuestro grupo resolvió esta aparente contradicción al comprobar que el C75 en sí, carece de actividad biológica respecto a la CPT1 y que la forma activa del compuesto es su aducto con la coenzima A, el C75-CoA¹⁶⁰ (**Figura 18**).

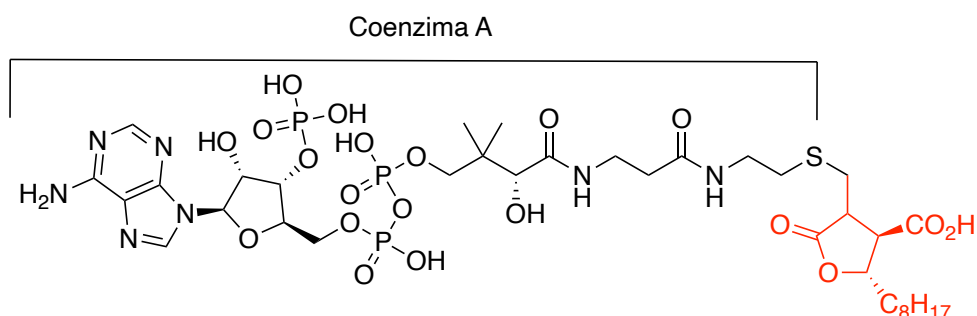
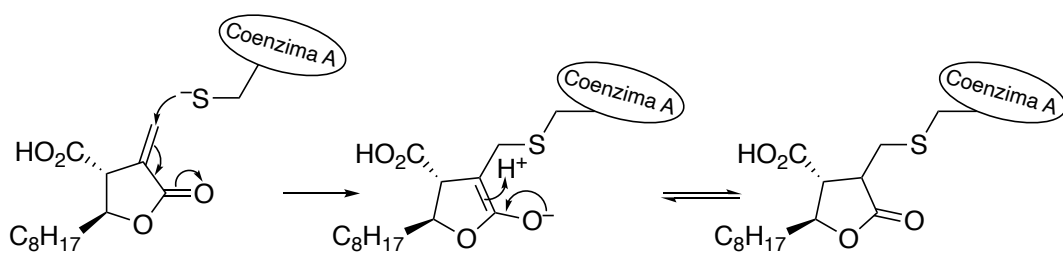


Figura 18. Estructura del C75-CoA, responsable de la actividad inhibitoria de la CPT1. En rojo se destaca la parte correspondiente al C75.

Se ha demostrado la presencia de C75-CoA por HPLC/MS en extractos hipotalámicos tras la inyección central de C75, lo que demuestra que el compuesto se forma de manera espontánea en el hipotálamo.⁶³ El mecanismo probable es la adición conjugada al doble enlace por el grupo -SH de la coenzima A (**Esquema 4**). La rápida formación de C75-CoA en el hipotálamo explicaría que no disminuya la actividad de la FAS en esta región del cerebro tras su administración, ya que el C75-CoA no dispone del doble enlace exocíclico necesario para su unión a la proteína.



Esquema 4. Mecanismo de reacción de la coenzima A con el C75 para formar el C75-CoA.

En 2013 nuestro grupo demostró que el efecto sobre la ingesta se debe exclusivamente al isómero (+)-C75, y la capacidad inhibitoria de la FAS corresponde al (-)-C75.¹⁴³ Este hecho será objeto de una discusión más extensa en apartados posteriores.

1.6.2 Relación entre la estructura y la actividad del C75

Desde el punto de vista estructural, el C75 se caracteriza por: *i*) ser una γ -butirolactona *ii*) poseer un doble enlace exocíclico en alfa, y la presencia de *iii*) una cadena alifática carbonada y *iv*) un ácido carboxílico (**Figura 19**).

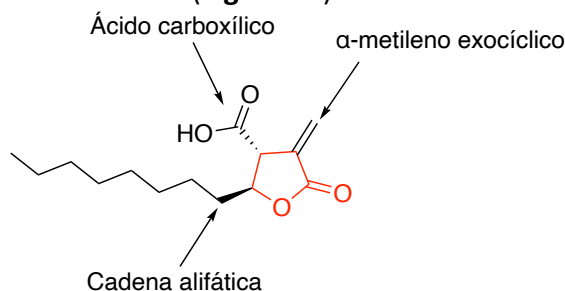


Figura 19. Estructura química del C75 donde se resalta γ -butirolactona (en rojo) y los 3 grupos funcionales presentes en la molécula.

1.6.2.1 Diferencias en la actividad de los isómeros

Atendiendo a la estereoquímica, la molécula puede presentar 4 isómeros. Dos con configuración *trans* respecto al ácido y la cadena alifática, y dos *cis* (**Figura 20**). De ahora en adelante, para mayor simplicidad y facilitar la lectura de la tesis, nos referiremos a los isómeros *trans* como C75 y a los isómeros *cis* como *cis*-C75.

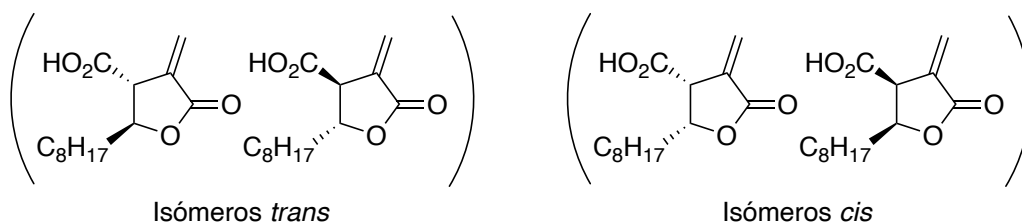


Figura 20. Estructura de los 4 isómeros del C75.

Actualmente conocemos que la mezcla racémica de la forma *trans* del C75 presenta una mayor actividad biológica respecto a la inhibición de la FAS y la CPT1. Esto se debe a que el doble enlace exocíclico del isómero *cis*-C75 isomeriza fácilmente al compuesto (\pm)-MLC22 (**Figura 21**) que carece de actividad. Estudios realizados por nuestro grupo demostraron que esta isomerización es tan rápida que la administración ICV del *cis*-C75 no inhibe la ingesta. Por otra parte, no se pudo detectar la presencia de *cis*-C75-CoA en el hipotálamo. Es por ello por lo que los estudios se centrarán en la configuración *trans* de la lactona.

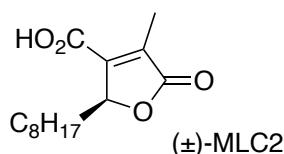
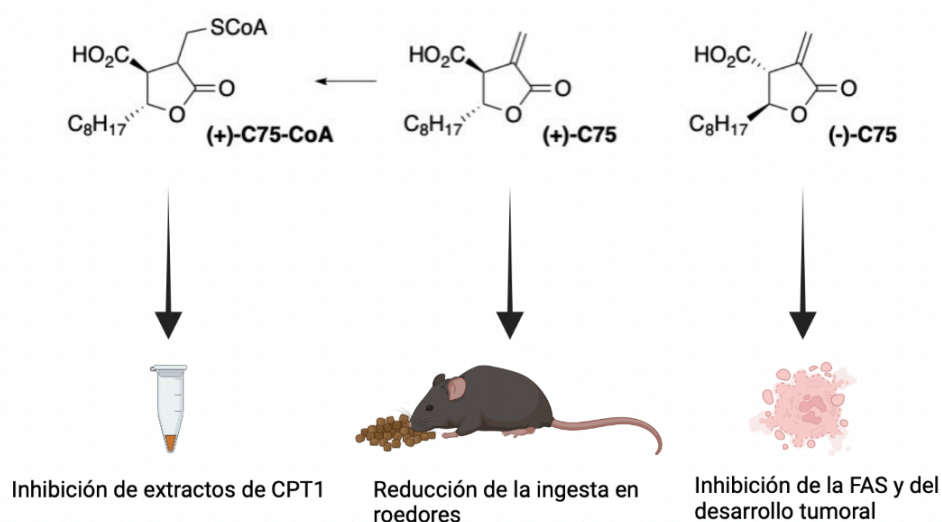


Figura 21. Estructura química del derivado (±)-MLC2 con el doble enlace endocíclico. Inactivo frente a la inhibición de FAS y CPT1, desarrollado por K. Makowski.

Por otro lado, nuestro grupo realizó la síntesis química estereoselectiva del C75 obteniendo los los compuestos ópticamente puros (+)-C75 y (-)-C75. El estudio de los *in vitro* diferentes isómeros descubrió que la inhibición de CPT1 se debe al derivado -CoA del enantiómero (+)-C75, mientras que la inhibición de la FAS corresponde al (-)-C75. Además, se comprobó que el (+)-C75 era un excelente supresor de la ingesta en ratas y el (-)-C75 presentaba actividad antitumoral en ensayos con la línea celular SkBr3 de cáncer de mama (**Esquema 5**).



Esquema 5. Representación de los isómeros del C75 y el aducto (+)-C75-CoA y sus diferentes efectos biológicos.

1.6.2.2 Estudio de la funcionalización de la molécula

Por lo que se refiere al resto de grupos funcionales de la molécula, nuestro grupo realizó la síntesis de diferentes derivados modificando los grupos funcionales, lo que ha permitido profundizar en el conocimiento de la relación entre la estructura y la actividad biológica del C75.¹⁶¹

1.6.2.2.1 Papel del metileno exocíclico

La ausencia de un grupo funcional en la posición α respecto al carbonilo de la lactona, como en el caso del (±)-MLC1, implica la pérdida de la actividad biológica del compuesto. El mismo resultado se obtiene al reducir el doble enlace a un grupo metilo como en el compuesto (±)-C273. La posición de la insaturación es relevante también para la

actividad de la lactona, pues la isomerización del C75 al (±)-MLC2 conduce también a un derivado sin efectos biológicos (**Figura 22**).^{161,162}

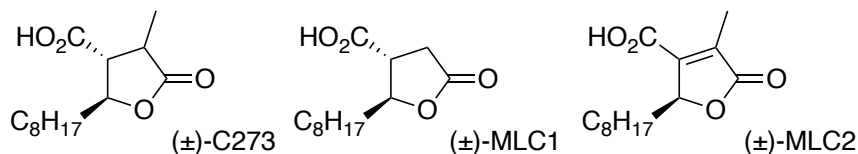


Figura 22. Estructura química de derivados de C75 sintetizados que no contienen un doble enlace exocíclico contiguo al grupo carbonilo y que carecen de actividad biológica

Estos resultados demuestran la necesidad del doble metileno para la actividad biológica del C75. Desde un punto de vista mecanístico, este grupo funcional es necesario ya sea para unirse al residuo de cisteína de la FAS (**Esquema 3**) o para formar el aducto C75-CoA (**Esquema 4**), responsable de la inhibición de la CPT1.

1.6.2.2.2 Papel del grupo carboxílico

Para modular la actividad de la CPT1 la presencia de un grupo carboxílico en β respecto al carbonilo de la lactona parece ser crucial. En la tesis doctoral de Kamil Makowski se diseñaron y se sintetizaron diferentes derivados (**Figura 23**) que carecían de este grupo.

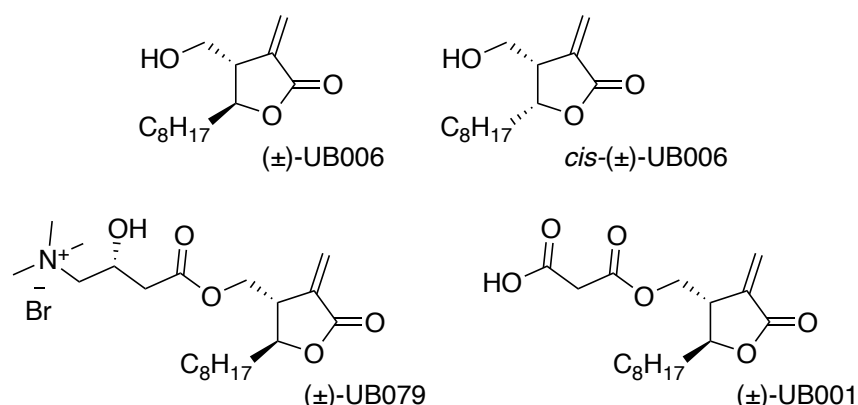


Figura 23. Estructura química de derivados de C75 sin un grupo ácido carboxílico en la posición β de la lactona.

Los primeros compuestos sin ácido carboxílico sintetizados fueron el (±)-UB006 y su isómero *cis*-(±)-UB006 por reducción directa del C75 y del *cis*-C75. Pudo comprobarse que su actividad inhibitoria de CPT1 disminuyó enormemente respecto al C75. A partir del (±)-UB006 se sintetizaron dos derivados mediante la funcionalización del ácido carboxílico, obteniéndose los compuestos (±)-UB079 y (±)-UB001. La estrategia del diseño de estos dos inhibidores viene del estudio de docking realizado con el C75-CoA y la CPT1. El carácter predictivo de este modelo, aunque limitado, permite obtener un conocimiento aproximado sobre la interacción entre el inhibidor y la enzima (**Figura 24**).

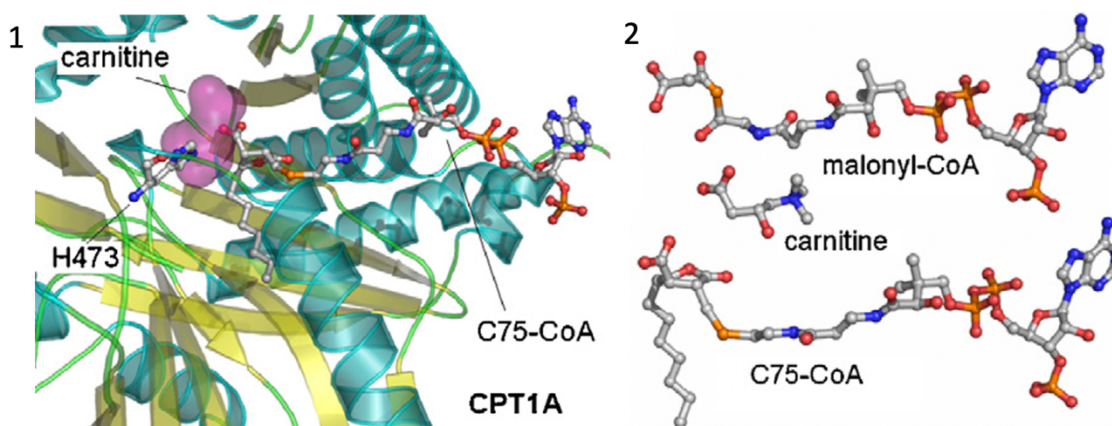
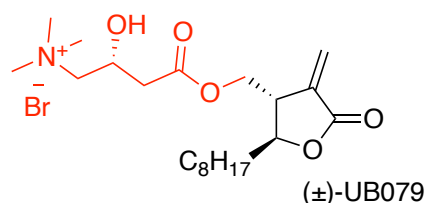


Figura 24. 1. Predicción del docking del C75-CoA con la CPT1A. Se puede apreciar la interacción entre el grupo carboxílico ácido y el espacio destinado a la carnitina. **2.** Similitud en la estructura y orientación espacial entre el malonil-CoA y el C75-CoA, orientando el grupo carbonilo de manera similar a la carnitina. Figura editada del artículo original de Paula Mera y col.⁶³

Los cálculos sugieren que el ácido carboxílico del C75-CoA se encuentra ocupando el lugar destinado a la L-carnitina en el centro activo de la enzima, tal y como ocurre con el malonil-CoA, impidiendo la reacción. También se aprecia que el espacio para la interacción entre el inhibidor y la CPT1 es lo suficientemente grande como para albergar grupos más voluminosos, por lo que se decidió acoplar el (±)-UB006 con dos estructuras que se conoce que tienen una fuerte interacción con la enzima; la L-carnitina y el ácido malónico (**Figura 25**), obteniéndose así los derivados (±)-UB079 y (±)-UB001 respectivamente.

Estructura de la L-carnitina



Estructura del ácido malónico

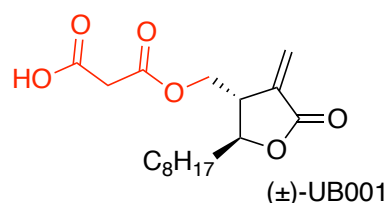


Figura 25. Estructura química de los inhibidores (±)-UB079 y (±)-UB001 donde se destaca, en rojo, la parte estructural correspondiente a dos estructuras cuya interacción con la enzima está demostrada; la L-carnitina y el ácido malónico, cuya forma -CoA es un inhibidor natural de la CPT1.

Cuando se realizaron los ensayos enzimáticos con las formas -CoA de los compuestos se encontró que su capacidad inhibitoria de la CPT1 era inferior a la del C75. Estos resultados se resumen en la **Tabla 1**:

Tabla 1. Derivados de C75 sin ácido carboxílico en la posición β y los valores de IC_{50} de sus aductos -CoA para la inhibición *in vitro* de CPT1A.¹⁶¹

Compuesto	IC_{50} de la forma -CoA (μM)
(\pm)-C75	$1,1 \pm 0,36$
(\pm)-UB006	~ 10
<i>cis</i> -(\pm)-UB006	>50
(\pm)-UB079	>50
(\pm)-UB001	~ 10

Los valores de IC_{50} hacen patente la necesidad de un grupo carboxílico en la posición β de la lactona para inhibir la CPT1, obteniendo en el mejor de los casos una actividad 10 veces menor que la del C75 cuando el grupo no está presente.

Otra variable estudiada fue la distancia entre el grupo carboxílico y el ciclo de la lactona. Para ello se prepararon los compuestos (\pm)-UB207 y (\pm)-UB244 añadiendo 1 y 2 carbonos respectivamente a la cadena del ácido (**Figura 26**).

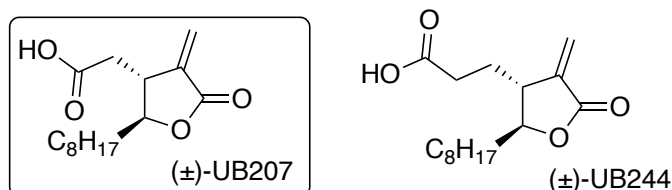


Figura 26. Estructura química de los derivados de C75 con diferente distancia entre el ácido carboxílico y el ciclo de lactona. Se resalta el (\pm)-UB207, análogo más activo desarrollado.

Cuando se realizaron las pruebas *in vitro* con los derivados -CoA de estas moléculas, se encontró que el (\pm)-UB207 presentaba una mejor inhibición que el C75 y el (\pm)-UB244 peor, siendo los valores de IC_{50} de $0,6 \pm 0,18 \mu M$ y $2,33 \pm 0,9 \mu M$ respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto que la distancia óptima entre el ácido carboxílico y la lactona para inhibir la CPT1 es de un metileno. A pesar de haber encontrado una molécula con un mayor potencial de inhibición de la ingesta, no se realizaron ensayos *in vivo* por falta de tiempo, por lo que este será uno de los objetivos a realizar en la presente tesis.

Varios de estos compuestos fueron ensayados también como potenciales inhibidores de la FAS y como agentes citotóxicos en líneas celulares de células cancerígenas. Los primeros experimentos consistieron en determinar la capacidad inhibitoria de las moléculas en extractos enriquecidos en la enzima, resumiéndose los resultados en la **Tabla 2:**

Tabla 2. Derivados de C75 sin ácido carboxílico en la posición β y sus valores de IC_{50} para la inhibición *in vitro* de FAS.¹⁶¹

Compuesto	IC_{50} (μM)
(\pm)-C75	460 \pm 44
(\pm)-UB006	517 \pm 73
<i>cis</i> -(\pm)-UB006	326 \pm 13
(\pm)-UB001	>5000

Se comprobó que la funcionalización del grupo hidroxilo con malonato (compuesto (\pm)-UB001) provoca una disminución muy pronunciada de la actividad biológica. Sin embargo, y contrariamente a lo ocurrido con la CPT1, la reducción del grupo ácido carboxílico no parece tener un impacto importante en la capacidad de los derivados de inhibir la FAS, como se puede observar con los valores de IC_{50} del (\pm)-UB006 y el *cis*-(\pm)-UB006, siendo el valor de este último ligeramente inferior que el del C75.

Para estudiar sus efectos anticancerígenos se realizaron ensayos de viabilidad celular en diferentes líneas cancerígenas que sobreexpresan la FAS. Los resultados se recogen en la **Tabla 3**:

Tabla 3. Valores de IC_{50} de los derivados de C75 para la inhibición del crecimiento celular de diferentes líneas de cáncer.¹⁶¹

	IC_{50} (μM)						
	SkBr3	MCF-7	OVCAR-3	MIA PaCa-2	PC3	HCT 116	MDA-MB-231
(\pm)-C75	19,9 \pm 1,9	27,3 \pm 1,9	21,8 \pm 3,9	21,8 \pm 0,8	26,9 \pm 3,1	46,4 \pm 5,8	43,7 \pm 1,9
(\pm)-UB006	3,7 \pm 1,6	26,6 \pm 2,1	1,2 \pm 0,4	12,9 \pm 0,4	10,0 \pm 2,1	6,6 \pm 1,2	11,6 \pm 1,2
<i>cis</i> -(\pm)-UB006	22,0 \pm 1,2	20,0 \pm 1,2	35,4 \pm 1,2	37,8 \pm 0,8	36,6 \pm 2,9	44,0 \pm 3,7	29,5 \pm 1,2
(\pm)-UB001	Nd*	Nd	>90	>90	>90	>90	Nd
(\pm)-UB207**	24,6 \pm 1,1	39,1 \pm 1,4	33,2 \pm 2,6	29,8 \pm 3,3	55,9 \pm 7,1	41,4 \pm 11,2	>90
(\pm)-UB244**	10,2 \pm 1,8	Nd	12,8 \pm 4,2	32,3 \pm 2,8	22,3 \pm 2,5	>90	>90

*Nd = no determinado. **: Compuestos probados directamente en cultivos celulares.

Son destacables los valores obtenidos para la inhibición del crecimiento celular de las líneas SkBr3 y OVCAR-3, de mama y ovario respectivamente, con el (\pm)-UB006, que, a pesar de presentar una inhibición menor de la FAS en el ensayo enzimático, tiene una actividad anticancerígena unas 20 veces mayor que el C75. Por otro lado, el derivado (\pm)-UB207 que dio los mejores resultados en inhibición de CPT1, no presenta ninguna mejora respecto al C75 en la inhibición del crecimiento en las líneas celulares de cáncer estudiadas.

Dado que se había encontrado un compuesto citotóxico de actividad significativamente superior a la del C75 se decidió profundizar en el conocimiento del derivado y se estudiaron también las diferencias en la actividad biológica de los enantiómeros de la molécula, el (+)-UB006 y el (-)-UB006 (**Figura 27**).

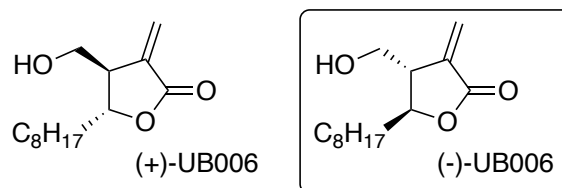


Figura 27. Estructura química de los dos enantiómeros del UB006. Se resalta el (-)-UB006, isómero al que corresponde la actividad biológica.

Se encontró que el isómero más activo en la inhibición in vitro de la FAS era el (-)-UB006 con un IC_{50} de $220 \pm 58 \mu M$ frente a $470 \pm 70 \mu M$ del enantiómero (+). De manera análoga, cuando se cultivaron las células OVCAR-3 con concentraciones crecientes de inhibidores se vio que la citotoxicidad del (-)-UB006 era mucho más alta que la de su enantiómero, con un IC_{50} de $0,5 \pm 0,3 \mu M$ frente a $19,5 \pm 2,5 \mu M$.

Paralelamente e igual que se hizo con la CPT1, se estudió la distancia óptima entre el grupo hidroxilo y la lactona, obteniendo los compuestos (\pm)-UB339 y (\pm)-UB340 donde se ha espaciado el grupo funcional uno y dos metilenos respecto al (\pm)-UB006 (Figura 28).

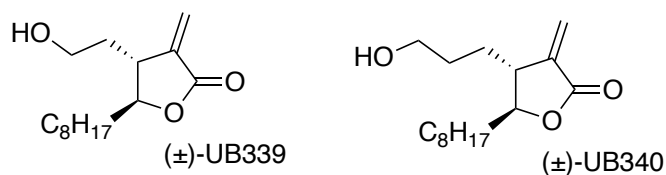


Figura 28. Estructura química de los derivados hidroxilados del C75 con diferentes distancias entre el grupo hidroxilo y el centro de la lactona.

El aumento en la distancia del grupo hidroxilo comportó una disminución sustancial de la inhibición in vitro de la FAS, siendo los valores de IC_{50} de $949 \pm 173 \mu M$ para el (\pm)-UB339 y $1978 \pm 192 \mu M$ para el (\pm)-UB340. Dado que al aumentar la longitud de la cadena hidroxilada se reducía la actividad del compuesto, se intentó sintetizar el inhibidor (\pm)-UB010 donde el grupo hidroxilo se une directamente a la lactona (Figura 29).

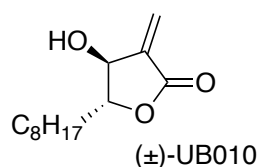


Figura 29. Estructura química de la molécula UB010, derivado hidroxilado del C75 donde el alcohol está directamente unido a la lactona.

La obtención del compuesto y el estudio de su actividad son un objetivo de la presente tesis.

1.6.2.2.3 Papel de la cadena carbonada

La última variable estructural de la lactona que queda por analizar es la cadena carbonada. Refiriéndonos de nuevo a los estudios de docking realizados con la CPT1 y el C75-CoA se pudo comprobar que existe un bolsillo hidrofóbico donde se sitúa la cadena alifática del inhibidor con capacidad para albergar hasta 15 carbonos, la longitud del ácido palmítico. Con el fin de mejorar las interacciones entre el sustrato y la enzima se procedió a la síntesis del derivado (\pm)-UB183, análogo del C75 con una cadena alifática de 15 carbonos (**Figura 30**).

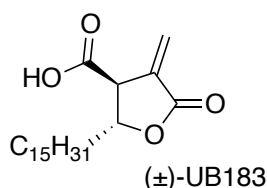


Figura 30. Estructura química del derivado de C75 con una cadena carbonada de la longitud del ácido palmítico.

Cuando se realizó el estudio de la actividad *in vitro* con extractos mitocondriales enriquecidos en CPT1 se vio que la actividad del (\pm)-UB183-CoA era similar a la del C75-CoA con un IC₅₀ de $0,78 \pm 0,52 \mu\text{M}$ frente a $1,1 \pm 0,36 \mu\text{M}$. Viendo que su actividad era ligeramente superior a la del C75 se decidió realizar la administración ICV del compuesto en ratas, encontrándose que la actividad del (\pm)-UB183 no suponía una mejoría significativa de los efectos respecto al C75, ya que la reducción de la ingesta y la disminución del peso fueron muy similares en ambos grupos.

En lo referente a la citotoxicidad del compuesto en células cancerígenas se comprobó que el compuesto presentaba una menor actividad.

1.6.2.2.4 Conclusiones de los requisitos estructurales de los derivados

De toda la información extraída de la actividad biológica de los derivados de C75 estudiados, se pueden inferir algunas conclusiones respecto a los requisitos estructurales de las moléculas según qué enzima se busque inhibir:

Para la inhibición de la CPT1:

- Es imprescindible la presencia del doble enlace exocíclico y del ácido carboxílico.
- La actividad mejora si este se encuentra separado por un metileno del esqueleto de la lactona.
- El impacto de la longitud de la cadena carbonada es negligible.

Para la inhibición de la FAS:

- La actividad de los inhibidores mejora reduciendo el grupo ácido a un hidroxilo.
- Hasta ahora, el compuesto más eficaz tiene el alcohol a un -CH₂- del esqueleto de la lactona.
- La elongación de la cadena carbonada impacta negativamente en la actividad de los inhibidores.

Desde la primera descripción del C75 publicada en el año 2000 se han publicado diversos artículos que describen su actividad como inhibidor sintético de la FAS y una marcada actividad antitumoral, pero provocando al mismo tiempo una disminución de la ingesta y en el peso en modelos animales.

Durante la tesis desarrollada en nuestro grupo por el Dr. Kamil Makowski se demostró que el C75 era capaz de unirse a la Coenzima A, y que el aducto formado era responsable de los efectos anorexigénicos a través de la modulación de la CPT1A en el hipotálamo.

Se han estudiado las diferentes actividades biológicas de los enantiómeros de la molécula descubriendo que el (+)-C75 es el responsable de la inhibición de la CPT1 y el (-)-C75 es presenta propiedades antitumorales.

Además, se desarrollaron dos nuevos compuestos basados en la estructura del C75 que mejoran sus propiedades biológicas; el (\pm)-UB207, que presenta una mayor inhibición *in vitro* de la CPT1 y el (-)-UB006, cuya actividad citotóxica en la línea celular de cáncer de ovario OVCAR-3 es 20 veces superior a la del C75.

2 Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la síntesis y posterior evaluación farmacológica de nuevos derivados de C75 buscando compuestos más potentes y selectivos en la inhibición de la CPT1 y de la FAS, y por tanto potenciales fármacos para el tratamiento de la obesidad y el cáncer respectivamente.

Objetivo 1. Síntesis de nuevos derivados hidroxilados de C75 donde el grupo -OH se encuentre unido directamente al anillo para obtener una mayor actividad antitumoral.

Objetivo 2. Desarrollo de una nueva ruta sintética para la obtención del (±)-UB207 que permita su obtención de forma pura y en cantidades suficientes para poder realizar diferentes ensayos *in vivo* con roedores. Se buscará también la separación de los enantiómeros para estudiar las diferencias en sus efectos farmacológicos.

Objetivo 3. Síntesis de nuevos análogos del C75 con un anillo nitrogenado. Se buscará desarrollar alguna metodología sintética para la obtención de compuestos de tipo lactama, que contienen un punto extra de funcionalización sobre el nitrógeno para la introducción de nuevos sustituyentes en la estructura o su posterior anclaje a soportes poliméricos, grupos fluorescentes, marcadores, facilitadores de paso de membrana, etc...

Objetivo 4. Síntesis de derivados novel del C75 sustituyendo átomos de oxígeno de la estructura por azufre para estudiar las propiedades farmacológicas de las nuevas estructuras como potenciales fármacos anticancerígenos y anorexigénicos.

Objetivo 5. Estudio de las propiedades farmacológicas de los nuevos compuestos mediante estudios de inhibición de CPT1 *in vitro* e *in vivo*.

Objetivo 6. Desarrollo de un nuevo ensayo de actividad de CPT1 basado en el marcaje isotópico no radioactivo de alguno de los productos y su cuantificación por HPLC-MS.

3 Síntesis y estudio de la actividad citotóxica de nuevos derivados del (\pm)-UB006

3.1 Obtención del (±)-UB010 y (±)-UB011

3.1.1 Precedentes bibliográficos

En nuestro grupo ya se había obtenido por primera vez y estudiado con éxito la actividad inhibitoria de la FAS de tres nuevos derivados de C75 con una cadena hidroxilada en la posición β de la lactona (compuestos UB006, UB339 y UB340).

Al constatar que la actividad biológica de los derivados disminuía al aumentar la longitud de la cadena, se planteó la obtención de dos nuevos derivados, el (±)-UB010 y (±)-UB011, donde el grupo hidroxilo estaría unido directamente al ciclo de la lactona con la esperanza de que su actividad superara la del resto de la serie (**Figura 31**).

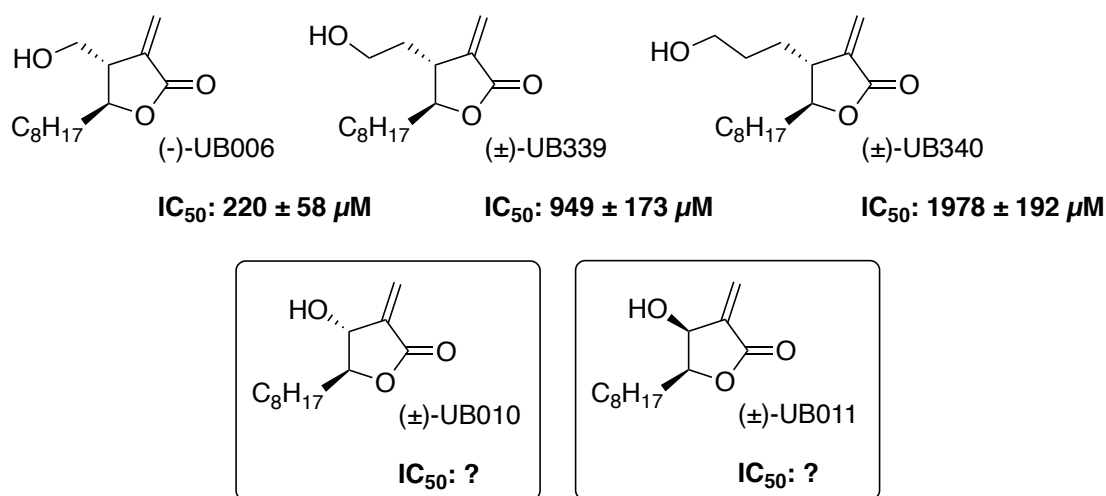
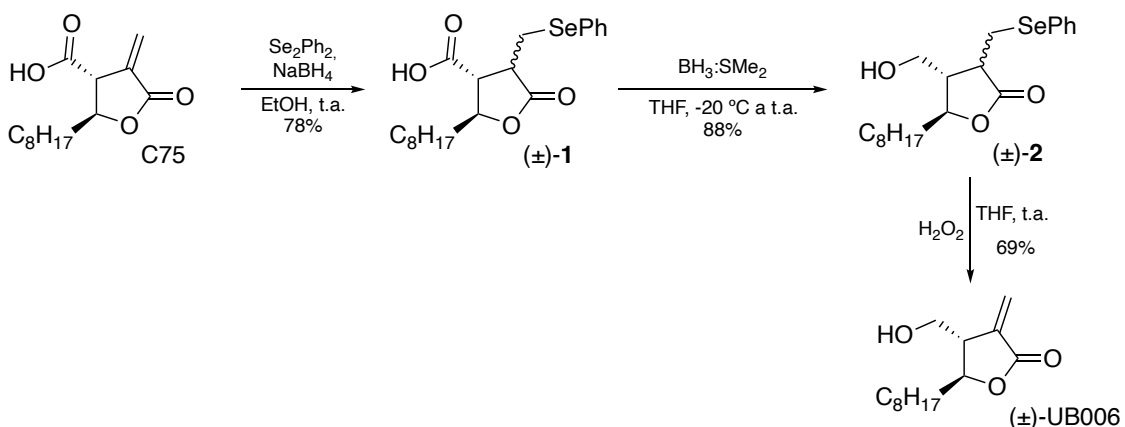


Figura 31. Serie de análogos hidroxilados del C75 con sus valores de IC₅₀ para la inhibición *in vitro* de la FAS y estructuras de las moléculas objetivo de estudio (±)-UB010 y (±)-UB011.

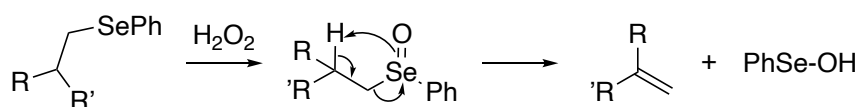
Los 3 derivados previos habían sido preparados por reducción del ácido carboxílico correspondiente siguiendo diferentes metodologías. En el **Esquema 6** se muestra la síntesis del (±)-UB006.



Esquema 6. Ruta sintética desarrollada para la obtención del (±)-UB006 a partir del C75.

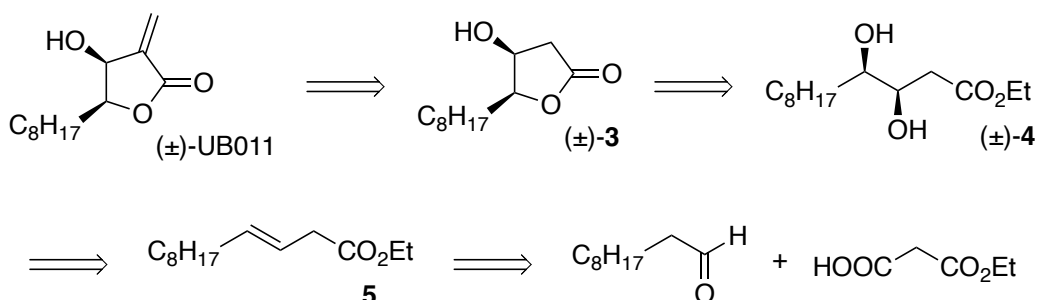
La estrategia se basa en la protección del doble enlace exocíclico mediante la formación de un selenoéter con el fin de evitar la isomerización del doble enlace en las siguientes etapas y la posterior reducción del grupo ácido con $\text{BH}_3:\text{SMe}_2$, para obtener el alcohol intermedio (\pm)-2.

El posterior tratamiento del intermedio peróxido de hidrógeno permite la oxidación del éter de selenio a selenóxido, que no es estable y se elimina espontáneamente en el medio de reacción. Se regenera así el doble enlace (**Esquema 7**) y se obtiene el producto deseado.



Esquema 7. Mecanismo propuesto para la desprotección de un doble enlace. El éter de selenio es oxidado a selenóxido, grupo no estable que es β -eliminado espontáneamente regenerando el doble enlace.

Obviamente, esta estrategia de reducción de un grupo carboxílico ácido ligado a la lactona no es aplicable a la obtención de un derivado con el grupo -OH directamente unido al ciclo. Por tanto, para la síntesis de los nuevos derivados, se planteó un nuevo análisis retrosintético que se muestra en el **Esquema 8**.



Esquema 8. Análisis retrosintético propuesto para la obtención del (\pm)-UB011.

El compuesto deseado derivaría de la metilación de la lactona (\pm)-3. Este sería el último paso de la ruta sintética y posiblemente el más complicado, ya que aun existiendo referencias bibliográficas de metilaciones en γ -butirolactonas¹⁶³⁻¹⁶⁵, carecemos actualmente de una metodología fiable y robusta para la introducción de dobles enlaces exocíclicos. Además, no es descartable que la presencia del grupo -OH interfiera en la reacción.

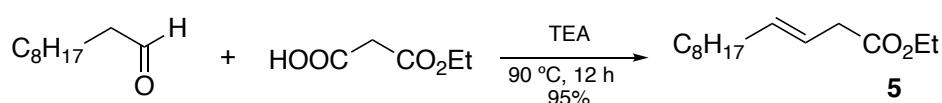
Por otro lado, la lactona (\pm)-3 se podría obtener fácilmente mediante la ciclación del diol (\pm)-4, ya que además se trata de una ciclación 5-*exo-trig* que está favorecida según las reglas empíricas de Baldwin.¹⁶⁶

A su vez, el compuesto (\pm)-4 se podría preparar mediante una dihidroxilación empleando el método Upjohn. Esta reacción, además, permitiría el control estereoselectivo de la formación de los dos enantiómeros del diol, facilitando tanto la obtención del (\pm)-UB011 como la del (\pm)-UB011.

Por último, el alqueno **3** se podría obtener de una condensación de Knoevenagel¹⁶⁷ a partir del decanal y el malonato de monoetilo, materiales de partida disponibles comercialmente.

3.1.2 Síntesis

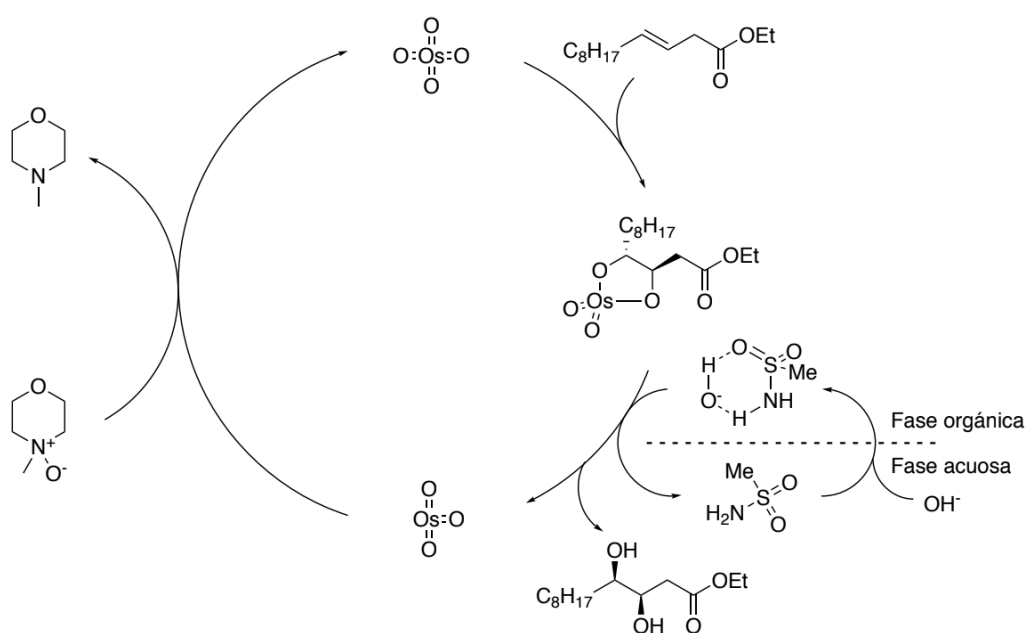
El primer paso de la ruta fue la obtención del alqueno **3** mediante la reacción de decanal con malonato de monoetilo. En las condiciones clásicas de la reacción se obtendría el éster α,β -insaturado, por lo que seguimos una modificación en la reacción descrita por Rao.¹⁶⁸ Esta metodología emplea trietilamina (TEA) como base no nucleofílica que permite la eliminación regioselectiva del alcohol intermedio formándose el compuesto carbonílico β,γ -insaturado tal y como se muestra en el **Esquema 9**:



Esquema 9. Obtención del alqueno **3** a partir de decanal y malonato de monoetilo.

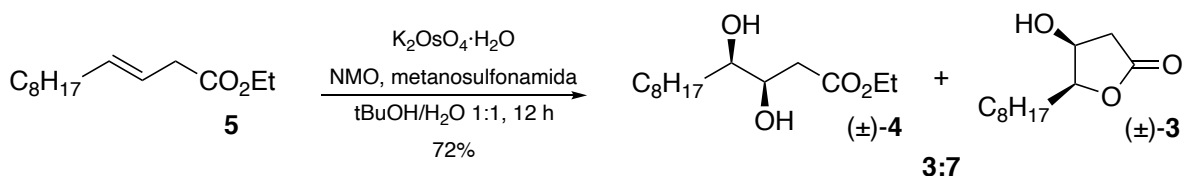
En la dihidroxilación del alqueno **3** se siguió el método catalítico en osmio descrito por la empresa Upjohn, con cantidades catalíticas de K_2OsO_4 y N-óxido de N-metilmorfolina (NMO) como oxidante estequiométrico.¹⁶⁹

El K_2OsO_4 es una sal que genera OsO_4 *in situ* permitiendo el trabajo con un compuesto que es menos volátil, menos tóxico y más económico. A la mezcla de reacción se le añade también metanosulfonamida para favorecer el intercambio entre el ion hidróxido entre la fase acuosa y la orgánica, permitiendo una mejor hidrólisis del osmiato cíclico intermedio tal y como se representa en el **Esquema 10**:¹⁷⁰



Esquema 10. Mecanismo de hidroxilación del alqueno. El cual el OsO_3 es reoxidado a OsO_4 por el N-óxido de N-metilmorfolina y la transferencia del anión hidroxilo de la fase acuosa a la orgánica favorecida por la metanosulfonamida.

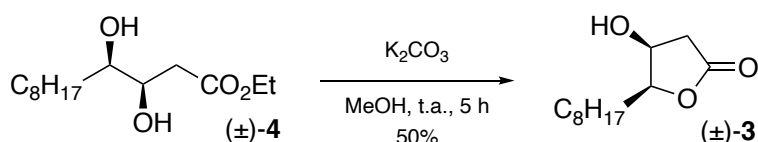
Las condiciones experimentales se muestran en el **Esquema 11**:



Esquema 11. Hidroxilación del alqueno **5** en el que se obtiene tanto el diol como la lactona por la ciclación *in situ* en una proporción 3:7.

Los productos de la reacción fueron tanto el alcohol (±)-**4** como la lactona (±)-**3** debido a su ciclación espontánea en el medio de reacción.

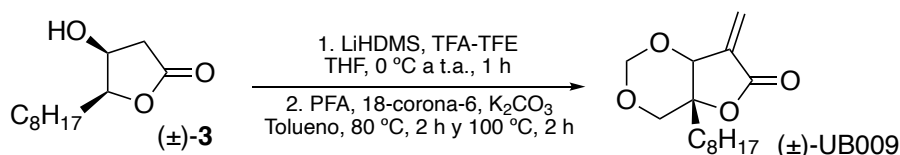
El dialcohol restante se puede ciclar fácilmente por su agitación en metanol (MeOH) en medio ligeramente básico durante 5 horas (**Esquema 12**).



Esquema 12. Ciclación del diol **4**.

Respecto a la metilación, nuestra primera aproximación fue la introducción del doble enlace directamente sobre el alcohol (±)-**3** mediante el procedimiento descrito por Riofski.¹⁷¹

Esta metodología consiste en la formación del enolato con bis(trimetilsilil)amiduro de litio (LiHDMS) y una posterior activación de la posición α mediante su reacción con el 2,2,2-trifluoroacetilo de 2,2,2-trifluoroetilo (TFA-TFE) en tetrahidrofurano (THF). El posterior tratamiento del crudo con paraformaldehído (PFA) y éter 18-corona-6 en tolueno, debería permitir la obtención del producto deseado.



Esquema 13. Metilación del alcohol (±)-**3** empleando la metodología de Riofski.

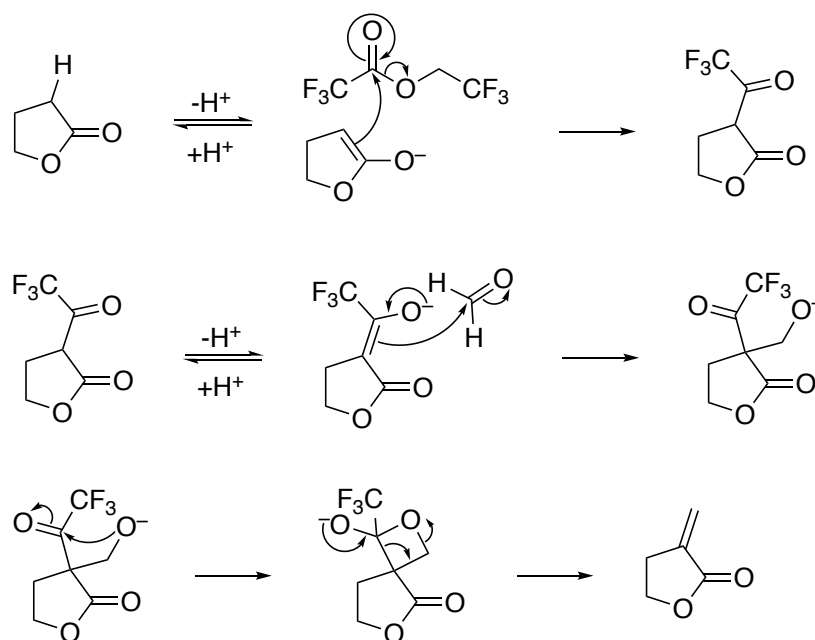
No obstante, tal y como se muestra en el **Esquema 13**, todas las veces que se llevó a cabo la reacción con el alcohol (±)-**3**, se aislaba un producto inesperado muy mayoritario.

En el TFM de Oscar Benito se observó por primera vez la formación de este compuesto (±)-UB009 y en el presente trabajo se confirmó el resultado y se logró determinar su estructura.

Para comprender la formación de este compuesto bicíclico se tiene que analizar el mecanismo de metilación de γ -butirolactonas empleando la metodología descrita:

El primer paso del método de Riofski es la activación de la posición α de la lactona, mediante la enolización de la misma y posterior condensación con el TFA-TFE. El intermedio formado presenta ahora un hidrógeno en α de mayor acidez, por lo que el K_2CO_3 es suficiente para desprotonar la lactona.

El enolato formado, aunque se encuentra estabilizado entre dos grupos carbonilo, presenta la nucleofilia necesaria para reaccionar con el paraformaldehído. Se forma entonces un intermedio inestable que, tras la eliminación intramolecular de trifluoroacetato, genera un doble enlace exocíclico en la posición deseada tal y como se detalla en el **Esquema 14**.¹⁷¹



Esquema 14. Mecanismo propuesto para la metilación de lactonas por el método de Riofski.

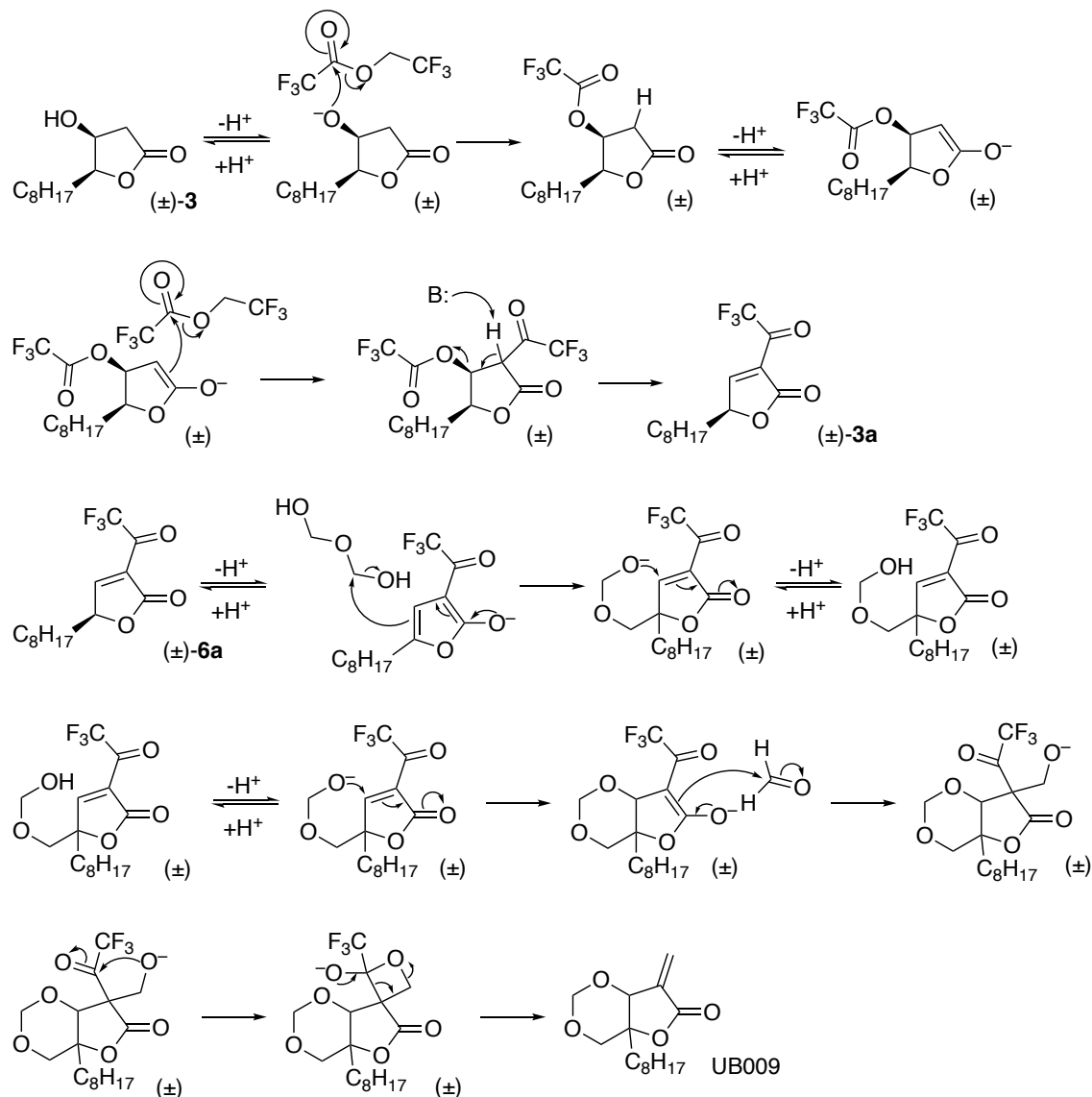
No obstante, la presencia del grupo hidroxilo en la molécula cambia la reactividad favoreciendo la formación del derivado UB009. Un posible mecanismo para explicar la obtención de este derivado se explica a continuación:

En una primera etapa de reacción se acilarían tanto el grupo hidroxilo como la posición α de la lactona. Quedando todavía exceso de base en el medio, la posición α podría desprotonar llevando a la eliminación del grupo trifluoroacetato en la posición β . Se desconoce si la salida del grupo y el protón se daría en un proceso concertado o si ocurriría primero la desprotonación, pero está claro que la fuerza motriz de este paso sería la generación del compuesto carbonílico α,β -insaturado (\pm)-**6a** y la liberación irreversible de una molécula de trifluoroacetato.

La siguiente etapa consistiría en la desprotonación compuesto (\pm)-**6a** para formar un intermedio aniónico de tipo furano que podría reaccionar con una molécula de

paraformaldehído. Se generaría entonces un éter con un alcohol libre en su extremo terminal que sería capaz de dar una adición de Michael con el doble enlace generado anteriormente y formar un acetal cíclico de elevada estabilidad química. En el paso final, la reacción del enolato intermedio con otra molécula de formaldehído generaría el doble enlace exocíclico tras la eliminación intramolecular de otra molécula de trifluoroacetato.

El mecanismo se encuentra representado con detalle en el **Esquema 15**:



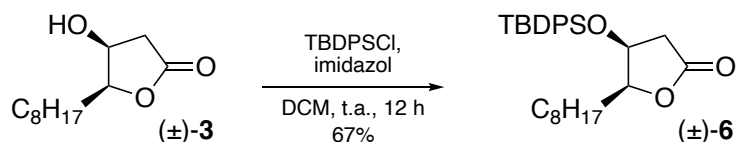
Esquema 15. Mecanismo propuesto para la formación del derivado UB009.

A pesar de no haber conseguido la síntesis del compuesto deseado, se obtuvo un interesante análogo del C75 con un doble enlace exocíclico no descrito hasta la fecha, cuya actividad biológica se desconocía. Sus propiedades farmacológicas se estudiarán más adelante.

Viendo que el grupo hidroxilo impedía la obtención del compuesto deseado, el siguiente paso en la síntesis del (\pm) -UB010 fue la protección del alcohol de la lactona (\pm) -3 con el

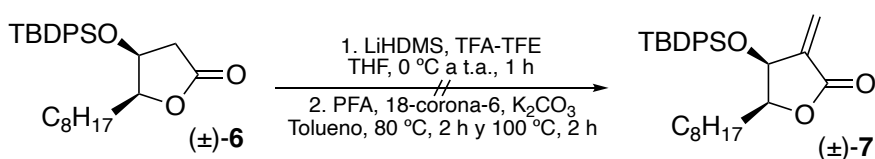
grupo *tert*-butildifenilsililo (TBDPS) por su robustez frente a las condiciones de reacción.¹⁷²

Para ello se hizo reaccionar el alcohol con el cloruro de TBDPS (TBDPSCI) usando imidazol como base en diclorometano (DCM):¹⁷³



Esquema 16. Reacción de protección de (±)-3 con TBDPS.

Se intentó entonces la metilénación del derivado con las condiciones descritas anteriormente:



Esquema 17. Intento de metilénación de la lactona protegida con TBDPS.

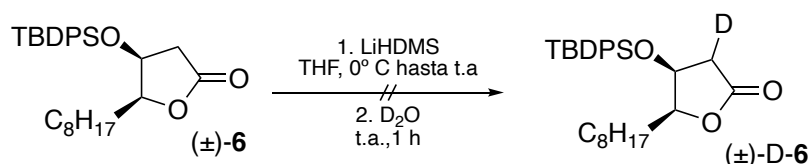
No obstante, como se muestra en el **Esquema 17**, no se obtuvo el producto. Se realizaron diferentes intentos cambiando tanto la temperatura de adición de la base, como el tratamiento posterior a la reacción (*workup*) por unos lavados neutros que no comprometieran la estabilidad del TBDPS.

Tabla 4. Condiciones de reacción y *workup* probadas en la metilénación de (±)-6.

Temperatura de adición de la base	<i>Workup</i>	Resultado
0 °C	Acuoso	No reacciona
-78 °C	Ácido	No reacciona
-78 °C	Acuoso	No reacciona

Pero tal y como se aparece en la **Tabla 4**, no se consiguió aislar el producto ni detectar su presencia por resonancia magnética de protón (RMN).

En un último intento por comprender la problemática de la metilénación, se decidió estudiar la capacidad de enolización del intermedio (±)-6, ya que se trata del primer paso de la reacción. Para ello, se trató la lactona con LiHDMS a 0 °C en THF y tras una hora de agitación a t.a. se añadió agua deuterada (D₂O) al medio de reacción, tal y como muestra el **Esquema 18**.



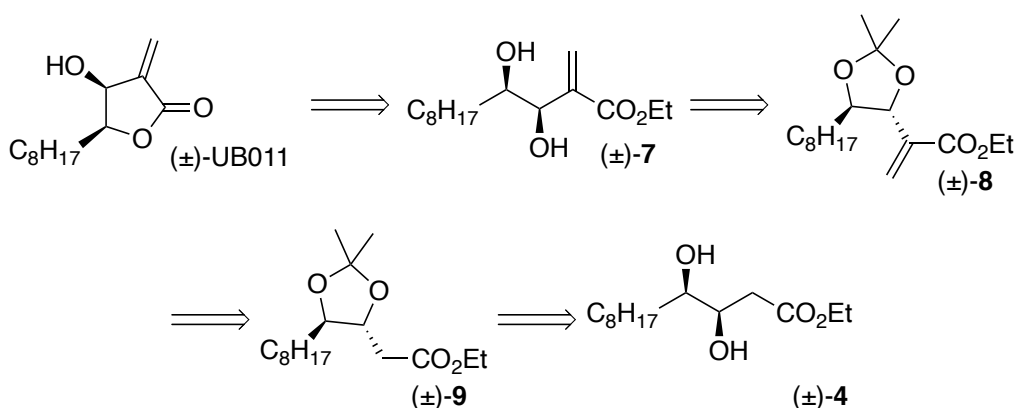
Esquema 18. Intento de introducción de un átomo de deuterio en la posición α .

En el caso de producirse la enolización, la adición de D_2O al medio incorporaría un átomo de deuterio en la posición α . Como la incorporación de los átomos de deuterio no se observan en el RMN de 1H , esta modificación provocaría la desaparición de la señal del protón sustituido y un cambio en la forma de la señal del protón remanente, que ya no acoplaría con el deuterio.

Lamentablemente los espectros de RMN obtenidos tras las diferentes pruebas no fueron concluyentes y no se pudo determinar si la enolización se había producido. En todo caso queda claro que, de estar ocurriendo, el rendimiento sería tan bajo que el producto no resulta detectable por RMN.

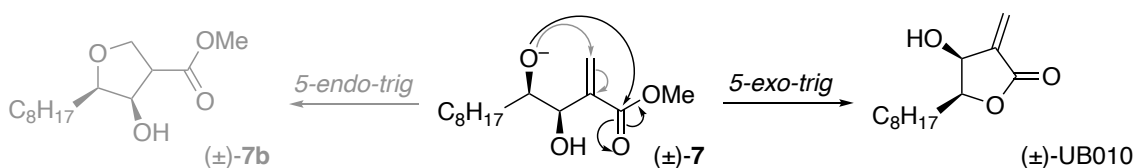
Se desconoce si los motivos por los que la lactona no enoliza aunque probablemente sean estéricos debido a la rigidez del sistema y al gran volumen del TBDPS.

Viendo que la estrategia planteada inicialmente no estaba dando resultados se decidió cambiar la ruta original e intentar la síntesis a partir del dialcohol (\pm)-4. Para ello se debía proteger los grupos hidroxilos y se intentaría metilurar la posición contigua al éster carboxílico, tal y como se muestra en el análisis retrosintético del **Esquema 19**:



Esquema 19. Análisis retrosintético alternativo propuesto para la obtención del (\pm)-UB011 a partir del diol protegido.

La molécula objetivo se podría obtener tras la ciclación del alqueno (\pm)-7 en medio básico suave como se ha hecho anteriormente con su análogo sin doble enlace. Existen dos posibles ciclaciones que darían un anillo de 5 miembros, pero la que genera el compuesto (\pm)-UB011 está favorecida cinéticamente según las reglas de Baldwin frente a la ciclación 5-*endo-trig* que generaría el compuesto (\pm)-7b (**Esquema 20**).



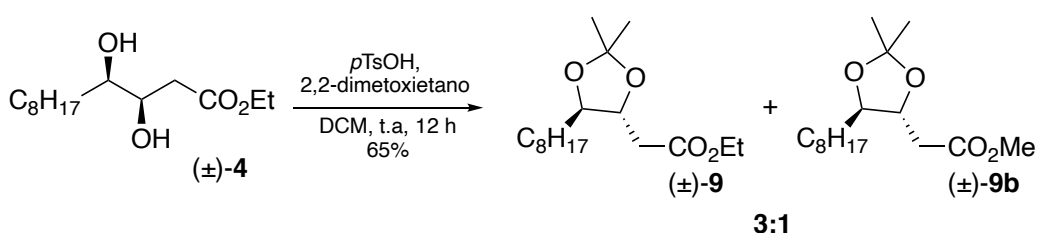
Esquema 20. Posibles ciclaciones del diol (\pm)-7 y los productos que de ellas se derivarían.

El 1,2-diol (\pm)-**7** se podría obtener por desprotección del acetónido del compuesto (\pm)-**8** y a su vez, este alqueno provendría de una reacción de metilación del compuesto (\pm)-**9** aplicando la metodología antes descrita.

Por último, el acetal (\pm)-**9** sería preparado por condensación del diol (\pm)-**4** y la acetona, quedando así los grupos hidroxilos protegidos.

En sentido sintético, el primer paso fue la protección del intermedio (\pm)-**4** en forma de acetal. Para ello se utilizó 2,2-dimetoxipropano como equivalente sintético de la acetona y ácido *p*-toluensulfónico (*p*TsOH) como catalizador.

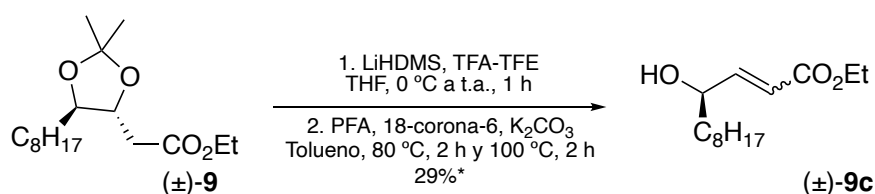
A pesar de que el disolvente más empleado en la bibliografía para este tipo de reacciones es la *N,N*-dimetilformamida (DMF)^{174,175}, en nuestro caso la presencia del disolvente dificultaba significativamente la purificación del crudo, por lo que decidimos probar con DCM obteniendo un resultado considerablemente mejor (**Esquema 21**).



Esquema 21. Protección del diol con 2,2-dimetoxietano.

Como era de esperar y tal como se muestra en el **Esquema 21**, también se obtuvo el producto de transesterificación (\pm)-**9b**, debido a la presencia de metanol en el medio generado en la reacción de acetalización. A efectos prácticos trabajar con el éster metílico o etílico no suponía ninguna diferencia, por lo que se procedió a continuar con la mezcla obtenida.

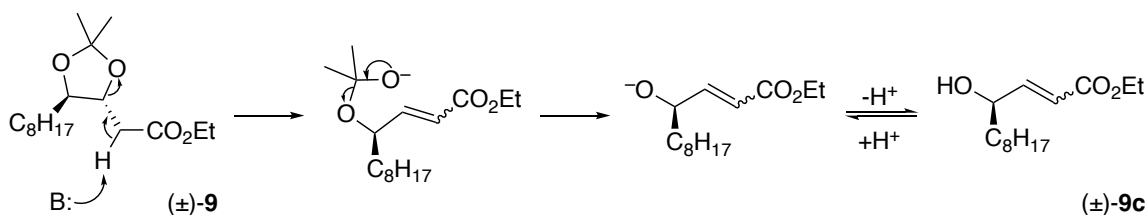
Se decidió emplear la metodología ya descrita anteriormente con LiHDMS, TFA-TFE como activador de la posición α y paraformaldehído. Como se muestra en **Esquema 22** por desgracia no se obtuvo el producto deseado.



Esquema 22. Intento de metilación del acetal (\pm)-**9**. *Rendimiento calculado por RMN.

Del crudo obtenido se aisló como compuesto mayoritario un éster α,β -insaturado. El RMN permitió la determinación de la estructura del compuesto como la correspondiente al subproducto (\pm)-**9c**, aunque la gran complejidad del crudo de reacción no permitió la elucidación segura de la estereoquímica relativa del doble enlace.

La explicación más probable de la formación de este compuesto es una β -eliminación inducida por la desprotonación del hidrógeno contiguo al grupo carbonilo, tal y como se describe en el mecanismo propuesto en el **Esquema 23**



Esquema 23. Propuesta mecanística de la formación del subproducto (±)-9c.

La eliminación intramolecular del grupo acetal estaría doblemente favorecida por la formación de un compuesto carbonílico α,β-insaturado, y la liberación al medio de una molécula de acetona.

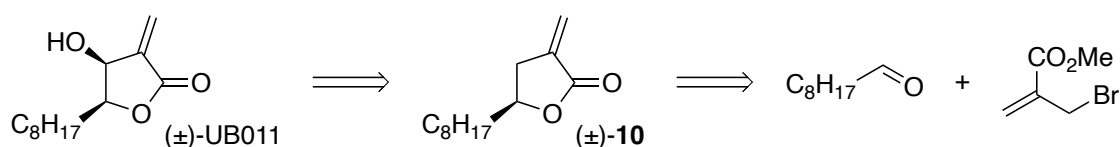
La formación de este compuesto, aunque indeseada, sería una prueba directa de la enolización del acetal en la posición deseada. Con el fin de evitar la eliminación se decidió probar a adicionar la base a baja temperatura para intentar retrasar su cinética frente a la reacción del enolato con el TFA-TFE. Asimismo, para no ver comprometida la integridad del grupo funcional tras la reacción, se optó por cambiar el *workup*, sustituyendo los lavados con una disolución saturada de NH₄Cl por lavados con agua desionizada. Los resultados se resumen en la **Tabla 5**:

Tabla 5. Condiciones de reacción y *workup* probadas en la metilénación de (±)-6.

Temperatura de adición de la base	<i>Workup</i>	Resultado
0 °C	Acuoso	Se obtiene (±)-9c
-78 °C	Ácido	Sin producto
-78 °C	Acuoso	Sin producto

Desafortunadamente en ningún caso se observó la formación del compuesto metilénado deseado (±)-8.

Tras varios intentos de obtener el compuesto (±)-UB011 con la aproximación sintética inicial, se planteó un análisis retrosintético alternativo que aparece en el **Esquema 24**:

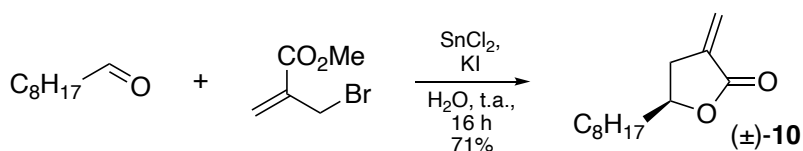


Esquema 24. Nuevo análisis retrosintético de (±)-UB011.

Esta nueva ruta permitiría obtener el producto en tan solo 2 etapas. La última de ellas sería la oxidación de la posición β de la lactona (±)-10 que ya contiene un doble enlace. Esto supone un gran cambio respecto a las rutas planteadas originalmente donde el metileno exocíclico es el último grupo en introducirse, pero es precisamente la presencia de ese doble enlace el que permitiría la oxidación alílica del ciclo de 5 con dióxido de selenio.

Por otro lado, la lactona (\pm)-**10** se podría obtener a partir del nonanal y el 2-(bromometil)acrilato de metilo en una reacción de tipo Barbier mediante el uso de algún metal que permitiese formar un compuesto organometálico compatible con un éster metílico.

Este objetivo se consiguió mediante una metodología descrita en 2011 por Lin,¹⁷⁶ donde se emplea SnCl₂ y KI catalítico para la condensación de los materiales de partida en medio acuoso:



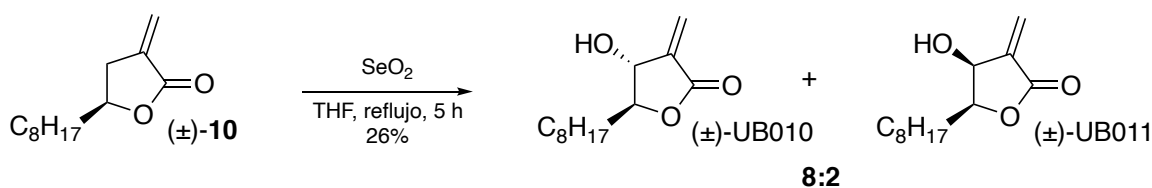
Esquema 25. Reacción de Barbier del nonanal con 2-(bromometil)acrilato empleando SnCl₂.

El mecanismo de las reacciones de Barbier no está completamente determinado. El hecho de que la reacción se pueda dar en un medio acuoso sugiere la presencia de una especie menos reactiva que un compuesto organometálico clásico y, dado que los primeros compuestos en utilizarse fueron metales puros, se postuló que la adición del haluro de alquilo al aldehído ocurriría tras la formación de un anión radicalario con la superficie del metal.

Más tarde se descubrió que este tipo de reacciones se podían llevar a cabo también con haluros metálicos, lo que sugiere la formación de algún tipo de intermedio organometálico.¹⁷⁷

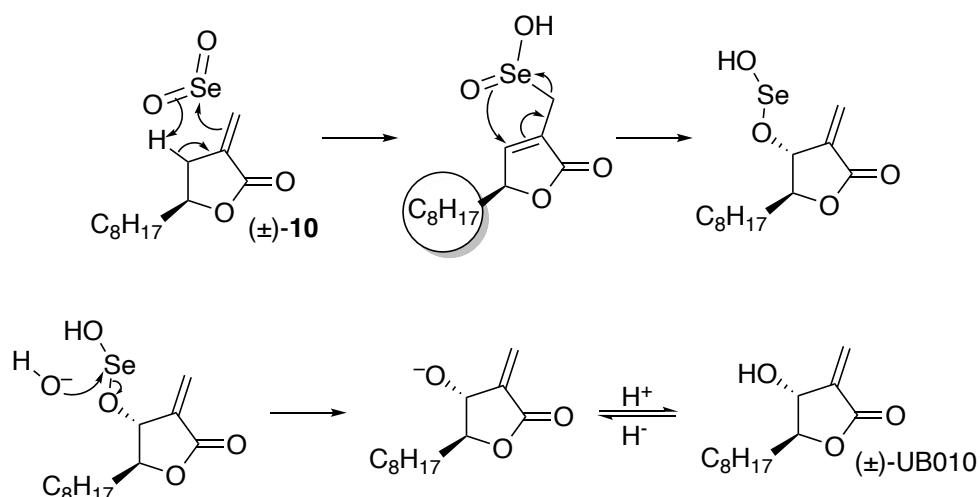
Hoy en día se acepta que el mecanismo de la reacción depende de la naturaleza del metal empleado y de los materiales de partida, pero en cualquier caso, el uso del SnCl₂ nos permitió la obtención de la lactona deseada con un buen rendimiento.

La siguiente etapa fue la oxidación alílica de la lactona para introducir un el grupo hidroxilo. Para ello se usó SeO₂ como agente oxidante a reflujo en THF¹⁷⁸ (**Esquema 26**):



Esquema 26. Oxidación de (\pm)-**10** a reflujo de THF con dióxido de selenio.

En la reacción se obtuvo el alcohol deseado en forma de una mezcla 8:2 de los isómeros *trans* y *cis*. La formación predominante del isómero *trans* podría tener su origen el mecanismo de la reacción que se muestra en el **Esquema 27**:

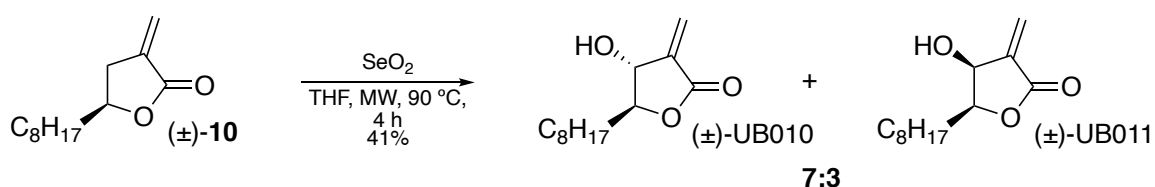


Esquema 27. Mecanismo de la oxidación alílica de la lactona.

Tras adición del SeO_2 al metileno exocíclico, el oxígeno del selenio debe atacar al doble enlace para la formación de un selenoéter. Es probable que el impedimento estérico asociado al volumen de la cadena carbonada lateral pueda favorecer que la formación del nuevo enlace ocurra preferentemente por la cara opuesta, obteniendo mayoritariamente el isómero *trans*.¹⁷⁹

En un intento de mejorar el rendimiento de la reacción se decidió probar a cambiar el THF por dioxano o mezclas de dioxano y agua, tal como Ghosh y su equipo describieron en un análisis de las oxidaciones con dióxido de selenio. No obstante, cuando se realizó la reacción solo con dioxano el rendimiento cayó hasta un 15%, y la mezcla de dioxano/ H_2O (5:1) no permitió la obtención del producto.

Por otra parte se ha sugerido que el rendimiento mejora cuando la oxidación se lleva a cabo asistida por microondas (MW). El primer intento que llevamos a cabo se realizó con THF, por ser el disolvente que mejor resultado había dado empleando la metodología clásica.



Esquema 28. Reacción de hidroxilación de la lactona en THF asistida por microondas.

Se consiguió llegar a un 41% de rendimiento, superior al 26% de la reacción térmica, sin cambio notable en la estereoselectividad en la reacción.

El buen resultado obtenido empleando microondas nos llevó de nuevo a intentar cambiar el disolvente de la reacción para emplear temperaturas de reacción superiores, pues el THF nos limitaba a 90 °C en el reactor empleado.

Los resultados se muestran en la **Tabla 6**:

Tabla 6. Rendimientos obtenidos para las diferentes condiciones en la reacción de oxidación asistida por MW.

Disolvente	Temperatura (°C)	Rendimiento** (%)
THF	90	43
THF/H ₂ O	90	0
Dioxano	60*	10
Dioxano/H ₂ O	90	0

*El reactor de microondas no permitió superar los 60 °C con dioxano. **Rendimiento calculado sobre la mezcla de isómeros.

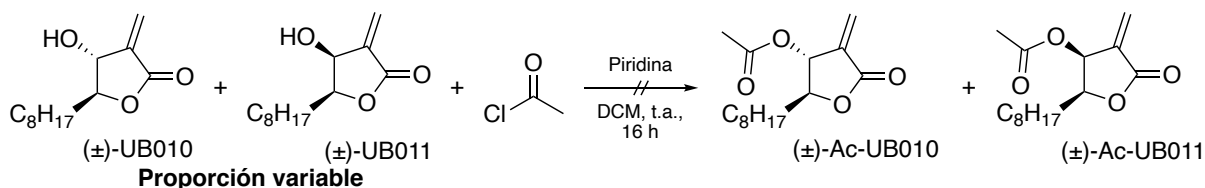
El mejor resultado fue finalmente con THF. El uso del dioxano como disolvente disminuye considerablemente el rendimiento de la reacción y la adición de agua en cualquier caso impide la obtención del producto.

3.1.3 Intentos de separación de los isómeros

Aunque la nueva ruta sintética permitió la obtención de los derivados (±)-UB010 y (±)-UB011 simultáneamente, siempre se obtuvieron mezclas en proporción variable de los isómeros. Con el fin de estudiar la actividad biológica de los compuestos convendría disponer de muestras puras de cada uno de ellos por lo que se intentó separar los isómeros.

Se realizaron diferentes intentos cromatográficos, o bien en columna o bien en cromatografía de capa fina preparativa. En ninguno de ellos en diferentes condiciones se consiguió la obtención de una muestra pura.

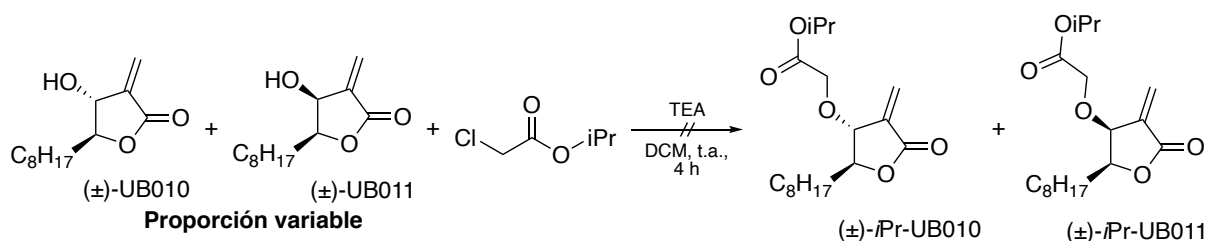
Decidimos entonces derivatizar el grupo hidroxilo con la esperanza de que los derivados permitieran la separación de los isómeros *cis* y *trans*. La primera reacción que se intentó fue la acetilación de la mezcla con cloruro de acetilo y piridina en DCM:



Esquema 29. Intento de acetilación de la mezcla de alcoholes.

Pero, tal y como se muestra en el **Esquema 29**, no se obtuvo el producto deseado.

Se intentó entonces la formación de un éter con 2-cloroacetato de isopropilo (iPr) y TEA en DCM (**Esquema 30**):

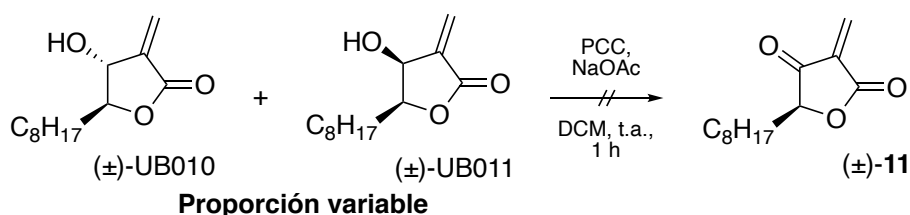


Esquema 30. Intento de reacción con 2-cloroacetato de isopropilo.

Pero de nuevo no se observó la formación de producto ni en el crudo ni tras la separación de la mezcla de reacción por cromatografía de columna. Además, en ambas reacciones se confirmó la pérdida del doble enlace exocíclico por la desaparición de las señales en el espectro de RMN.

Ante la sospecha de las condiciones de reacción estaban comprometiendo la estabilidad del doble enlace se modificó la estrategia. Se decidió oxidar el alcohol para luego intentar una reducción estereoselectiva que permitiera obtener los isómeros puros.

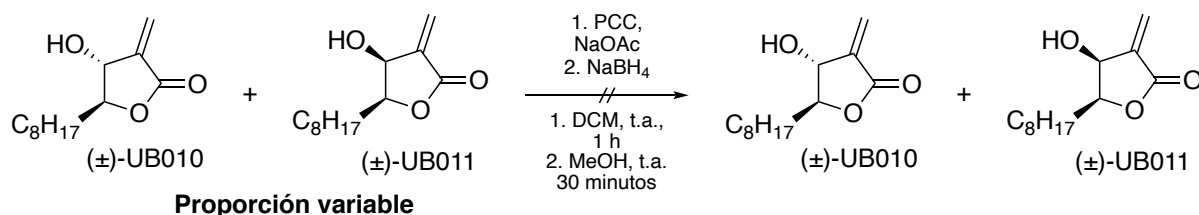
Para la oxidación del alcohol se decidió emplear un agente oxidante que funcionara en condiciones anhidras para evitar reacciones secundarias como la isomerización o hidratación del alqueno. Se optó usar clorocromato de piridinio (PCC), por ser un agente oxidante suave, en DCM en presencia de acetato sódico (NaOAc).



Esquema 31. Intento de oxidación de la mezcla de alcoholes con PCC.

Tras una hora de reacción se pudo comprobar la desaparición del material de partida por cromatografía de capa fina (TLC), pero tras la extracción de la mezcla de reacción no se pudo detectar el producto.

Ante la posibilidad de que el compuesto (±)-11 no fuera lo suficientemente estable, se intentó realizar una oxidación y la reducción posterior con NaBH₄ sin extraer la cetona intermedia. Con este experimento no se esperaba obtener uno de los isómeros puros, sino comprobar si la reacción funcionaba, para más tarde adaptarla a una versión estereoselectiva.



Esquema 32. Intento de oxidación y reducción sin aislar la cetona intermedia.

Después de varios intentos (**Esquema 32**) no se consiguió recuperar ni el material de partida ni se pudo comprobar la formación de la lactona oxidada.

A la vista de los resultados se decidió realizar unas pruebas farmacológicas preliminares con la mezcla 8:2 de los derivados (\pm)-UB010/(\pm)-UB011 por diferentes motivos:

El principal era que se desconocía si los nuevos derivados presentarían una actividad farmacológica interesante. Probarlo sobre la mezcla de que disponíamos resultaría indicativo. Si el resultado fuera negativo no tendría interés dedicar más tiempo a una separación tediosa de isómeros, que podían resultar no ser activos. Por otra parte, la obtención de los derivados (\pm)-UB010 y (\pm)-UB011 requería tiempo y la poca cantidad disponible limitaba la realización de las pruebas de derivatización. Además, la inestabilidad del doble enlace exocíclico impedía la recuperación de los derivados tras los sucesivos intentos de funcionalización.

3.2 Obtención de derivados hidroxilados en anillo de lactama

3.2.1 Antecedentes bibliográficos

Los anillos de γ -butirolactamas están presentes en múltiples compuestos de origen natural y sintético que muestran un amplio rango de diferentes actividades biológicas.¹⁸⁰⁻¹⁸² La estructura privilegiada de estos compuestos, con hasta cuatro puntos de funcionalización diferentes (**Figura 32**), los convierte en ciclos con un gran potencial en el ámbito de la química médica.

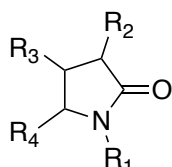


Figura 32. Esqueleto de un anillo de lactama donde se muestra la posible funcionalización en cuatro puntos distintos.

Atendiendo a los requisitos estructurales de los compuestos con capacidad inhibitoria de la FAS, tratados con detalle en la introducción, la sustitución en la posición α , β y γ están relativamente limitadas. No obstante, la presencia de un átomo de nitrógeno en la estructura nos permite disponer de un punto extra de funcionalización.

En el caso particular de la inhibición de la FAS y la exploración de nuevos derivados con propiedades antitumorales basados en el (\pm)-UB006, el átomo de nitrógeno nos dispone de 3 principales opciones a explorar.

- El estudio de la actividad de un derivado hidroxilado de la lactama sin sustituyentes sobre el nitrógeno y el análisis de los efectos de la presencia de este farmacóforo en la actividad de los compuestos.
- La introducción de diferentes grupos funcionales sobre el nitrógeno de la lactama y el estudio de sus efectos en las potenciales propiedades farmacológicas.
- El anclaje del compuesto a soportes poliméricos, grupos fluorescentes, marcadores, facilitadores de paso de membrana, etc...

En esta parte de la tesis, nos hemos centrado principalmente en la síntesis de lactamas derivadas del (\pm)-UB006 con diferentes sustituyentes sobre el nitrógeno con el fin de estudiar sus propiedades citotóxicas.

3.2.2 Síntesis

3.2.2.1 Obtención del (±)-UB013

Durante el desarrollo de su Trabajo de Final de Máster Marta Font Felip sintetizó con éxito el primer derivado de tipo lactama del (±)-UB006, mostrado en la **Figura 33**.

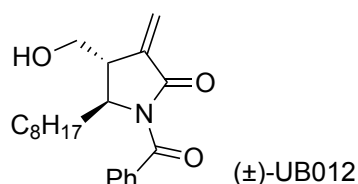


Figura 33. Estructura del derivado (±)-UB012 preparado por M. Font.

Su actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares fue estudiada por el Dr. Santos durante el desarrollo de su tesis, encontrando que el IC₅₀ para la inhibición del crecimiento celular en OVCAR-3 era de 11,9 μM y demostrando así que las lactamas podían ser buenos inhibidores de la FAS.¹⁸³

Basándonos en estos resultados, nuestro primer objetivo de tipo lactama fue la síntesis de la *N*-(3-hidroxi-4-metilen-2-octil-5-oxopirrolidin-1-il)benzamida, de ahora en adelante (±)-UB013 (**Figura 34**).

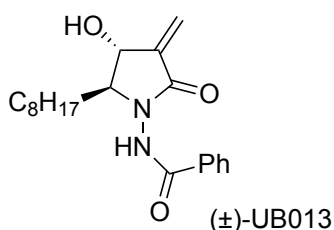
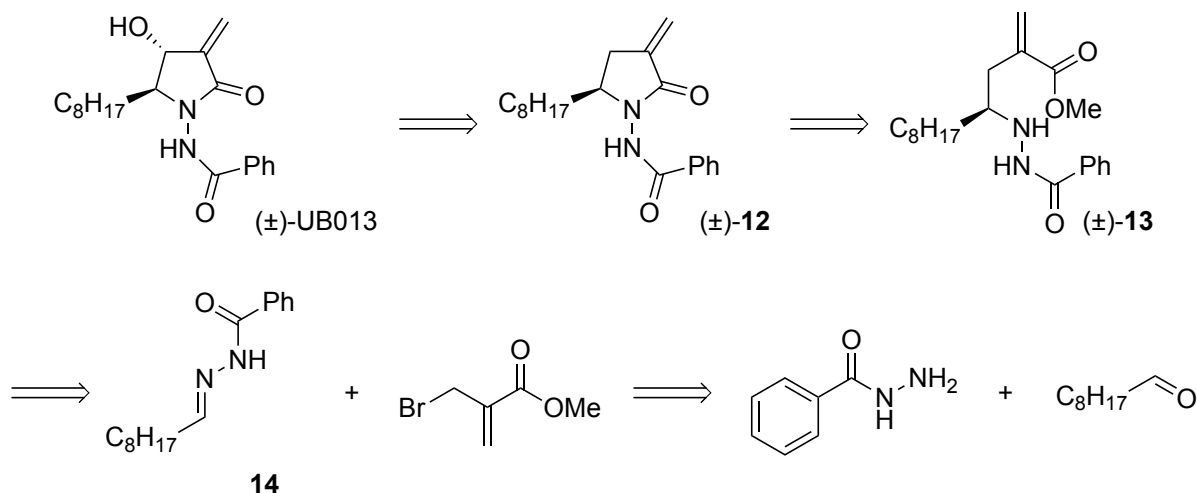


Figura 34. Estructura del (±)-UB013.

Se trata de un compuesto similar al (±)-UB012 donde el -OH se encuentra directamente unido al ciclo y que contiene un sustituyente aromático sobre el átomo de nitrógeno. En este caso, decidimos sustituir el grupo benzoilo por un derivado formal de hidracina, con la esperanza de que al aumentar la electronegatividad del sustituyente se incrementara la electrofilia del doble enlace, haciendo de este derivado un inhibidor enzimático más potente.

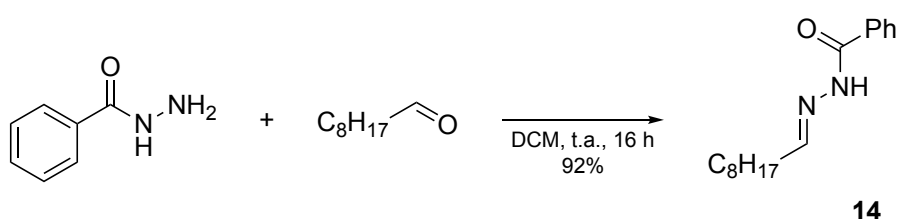
Para su obtención se propuso el siguiente análisis retrosintético (**Esquema 33**):



Esquema 33. Análisis retrosintético inicial del (±)-UB013.

En la síntesis nos basaríamos en la experiencia previa en la preparación de los compuestos (±)-UB010 y (±)-UB011 donde la oxidación de la lactama (±)-**12** se conseguiría con SeO_2 . A su vez, esta lactama intermedia se podría obtener por ciclación del compuesto (±)-**13** en medio básico. El alqueno (±)-**13** se podría preparar mediante la condensación de la imina **14** y el 2-(bromometil)acrilato de metilo en una reacción de tipo Barbier. Por último, la obtención de la imina se intentaría por una reacción entre el nonanal y la benzohidrazida.

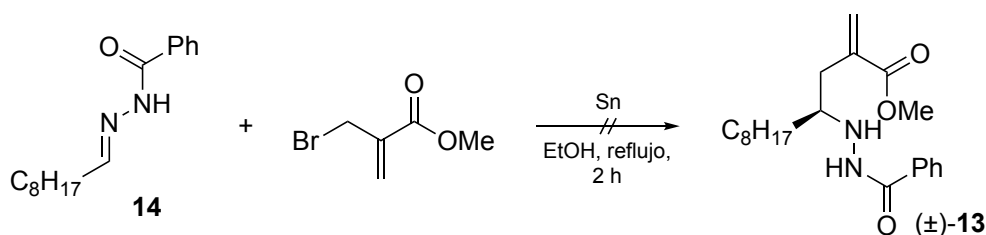
Comenzando con la ruta sintética, el primer compuesto obtenido fue la imina **14** mediante la condensación del nonanal purificado con *N*-benzohidrazina, como se muestra en el **Esquema 34**:



Esquema 34. Reacción de formación de la imina.

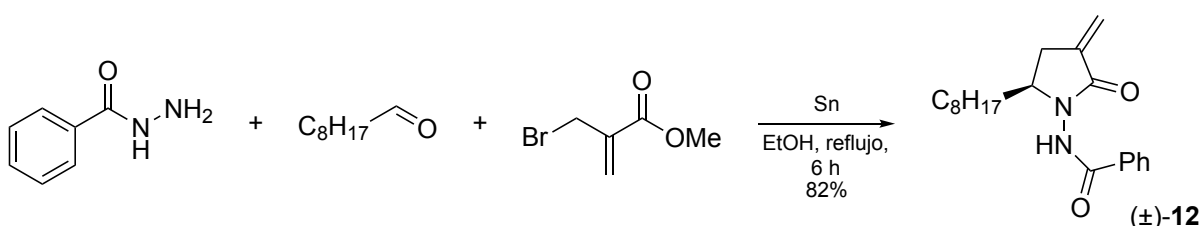
Las condiciones empleadas permitieron la obtención de la molécula con buen rendimiento y una pureza lo suficientemente elevada como para continuar con la síntesis sin necesidad de purificación.

El siguiente paso fue la reacción de Barbier entre la imina y el bromoacrilato. En el primer intento se utilizó estaño metálico a reflujo en etanol,¹⁸⁴ pero tal y como se muestra en el **Esquema 35**, no se consiguió el producto esperado.



Esquema 35. Intento de reacción de Barbier con estaño.

Se realizaron también varios intentos con Zn metálico, más reactivo que el estaño, también sin éxito. Decidimos entonces probar la metodología *one-pot* descrita por Xu y col.¹⁸⁵ en la obtención de la molécula (±)-**12** a partir del reflujo en etanol de una mezcla nonanal, benzohidrazida y 2-(bromometil)acrilato de metilo (**Esquema 36**).



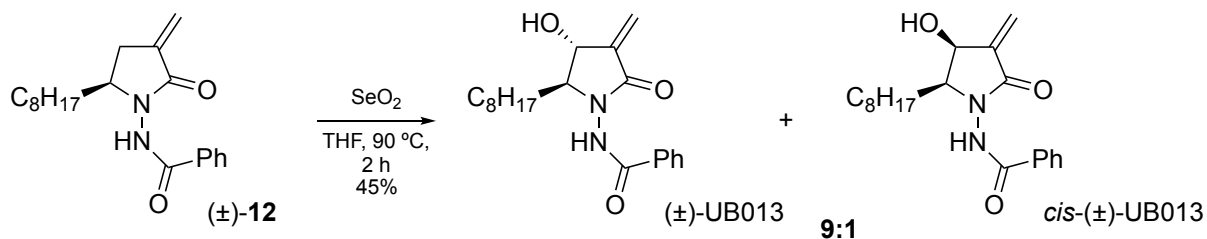
Esquema 36. Reacción *one-pot* de formación de la lactama (±)-**12**.

Como puede verse la lactama se obtuvo con un excelente rendimiento en un solo paso sin necesidad de aislar el intermedio abierto (±)-**13**. Es posible que la mayor nucleofilia del nitrógeno favorezca la formación de la lactama en el medio de reacción.

Por otro lado, resulta sorprendente que la reacción *one-pot* diera tan buen resultado mientras que los intentos de condensación de la imina aislada con el bromacrilato no. Una posible explicación para este hecho sería el secuestro del metal por su coordinación con la imina, que impediría la formación del compuesto organometálico con el 2-(bromometil)acrilato de metilo.

En el caso de llevar a cabo la reacción de manera simultánea, el organometálico se va generando paralelamente a la formación de la imina, por lo que ya no hay estaño libre susceptible de coordinación. En cualquier caso, la reacción permitió la obtención de la lactama requerida para la continuación de la ruta sintética.

El siguiente paso fue la oxidación del ciclo con SeO₂ asistida por microondas, con la metodología usada en apartados anteriores (**Esquema 37**).



Esquema 37. Oxidación alílica de la α -metileno- γ -butirolactona.

Se consiguió obtener el compuesto deseado como una mezcla de los isómeros *cis* y *trans* en una proporción 9:1 tal y como ocurrió con los derivados lactónicos. La separación mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice también resultó infructuosa en este caso.

De nuevo, decidimos realizar las pruebas farmacológicas con una mezcla de los isómeros, en este caso de proporción 9:1 en (±)-UB013/*cis*-(±)-UB013 y abordar la separación si la actividad de la mezcla fuera prometedora.

3.2.2.2 Obtención del UB015

El siguiente objetivo fue la 4-hidroxi-1-metil-3-metileno-5-octilpirrolidin-2-ona, UB015 de ahora en adelante, cuya estructura se encuentra representada en la **Figura 35**.

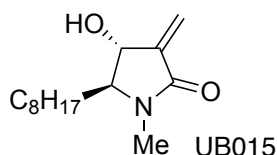


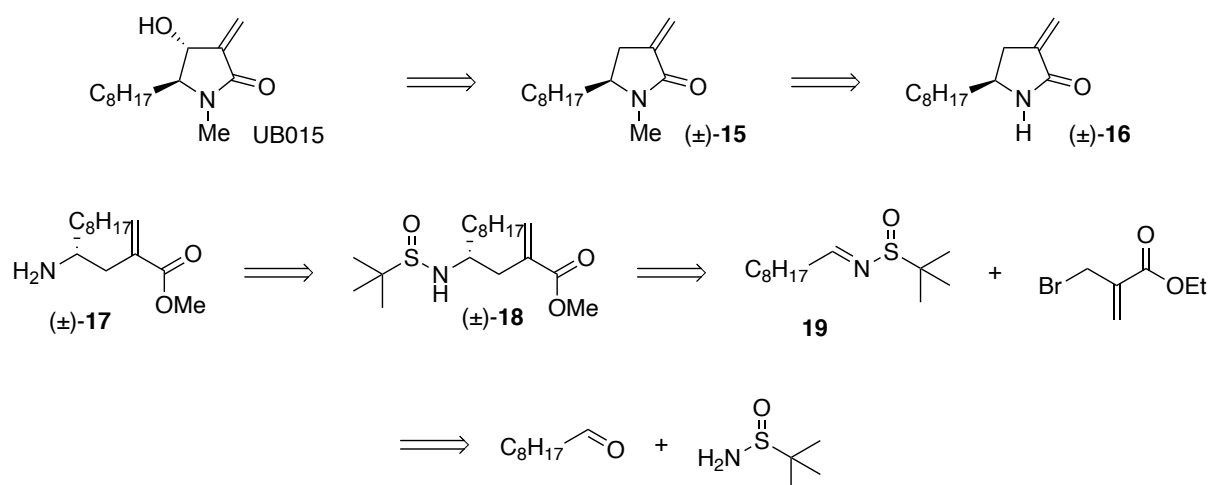
Figura 35. Estructura del derivado UB015.

Desde el punto de vista estructural, nos encontramos con una estructura que recuerda (\pm)-UB006 pero con un ciclo de lactama.

El grupo metilo fue seleccionado por ser la cadena carbonada menos voluminosa, permitiendo lograr una molécula estructuralmente similar a su equivalente no sustituida sobre el nitrógeno, sin enfrentar los desafíos sintéticos que supondría la presencia de un grupo N-H en la estructura.

En el caso de que el estudio farmacológico de este derivado fuera favorable, se podría abrir una nueva línea en el proyecto para la obtención de derivados de C75 y (\pm)-UB006 de tipo lactama no *N*-sustituidos.

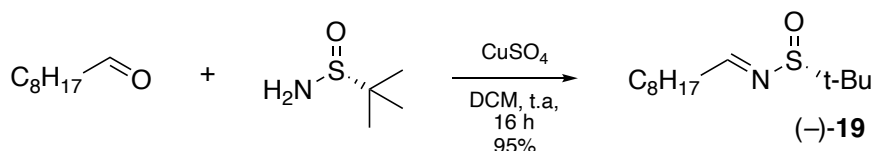
Con estas consideraciones en mente se planteó la obtención del nuevo derivado, según el **Esquema 38**:



Esquema 38. Esquema retrosintético de la obtención del UB015.

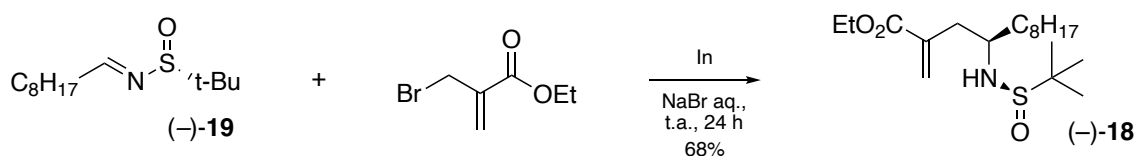
El producto deseado derivaría de la oxidación de la lactama (\pm)-**15** con SeO₂ como en casos anteriores. El paso clave para la obtención de la lactama sería una reacción de Barbier entre el 2-(bromometil)acrilato y la imina *N*-sustituida **19** empleando el metal adecuado. La presencia de un grupo *tert*-butilo (*t*Bu) sobre un azufre quiral supondría la posibilidad de la obtención estereoselectiva del compuesto. La imina **19** podría prepararse mediante la condensación del nonanal con la *tert*-butil sulfonamida.

La ruta sintética se inició con la condensación entre la (*R*)-2-metilbutanosulfinimida y nonanal en presencia de CuSO₄,¹⁸⁶ como se recoge en el **Esquema 39**. El compuesto **19** se obtuvo en un 92% de rendimiento, obteniendo exclusivamente el isómero (-) de la imina.



Esquema 39. Obtención del intermedio quiral (-)-**19**.

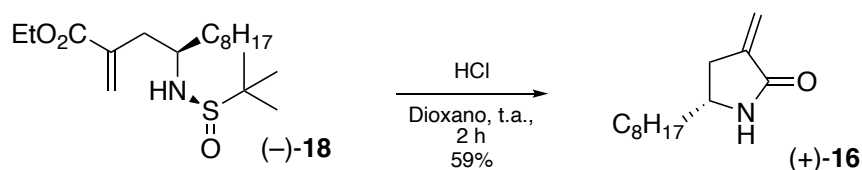
El siguiente paso fue la reacción de Barbier entre el (-)-**19** y el 2-(bromometil)acrilato de etilo. Se llevó a cabo con indio metálico en una disolución acuosa saturada de NaBr¹⁸⁷ (**Esquema 40**).



Esquema 40. Obtención del alqueno (-)-**18**.

La reacción permitió la obtención del alqueno (-)-**18** con buen rendimiento y solo se observó la presencia de un estereoisómero por lo que la reacción transcurre con muy buena estereoselectividad. Pese a los intentos, no fue posible determinar la estereoquímica relativa de los dos centros quirales, pero muy probablemente se trate del producto de adición -, - según los precedentes bibliográficos de este tipo de adiciones.¹⁸⁷

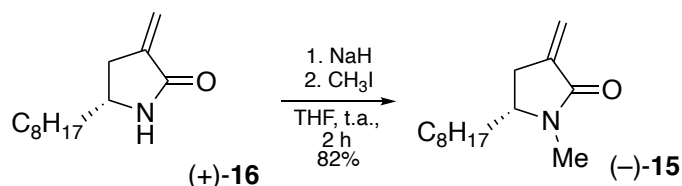
La desprotección del nitrógeno se llevó a cabo con éxito mediante el tratamiento de la *N-tert*-butilsulfinimida con ácido clorhídrico en metanol. Además, tal y como se describe en el **Esquema 41**, el intermedio lineal cicló *in situ*, aislándose exclusivamente la lactama.



Esquema 41. Obtención de la lactama (+)-**16**.

Considerando que el material de partida era enantioméricamente puro y que la desprotección del nitrógeno y posterior ciclación deben ocurrir con retención de la configuración, es altamente probable que se tratara exclusivamente de un único isómero de la lactama. La determinación de la rotación específica de una disolución del compuesto permitió comprobar que se trataba de la molécula (+)-**16**.

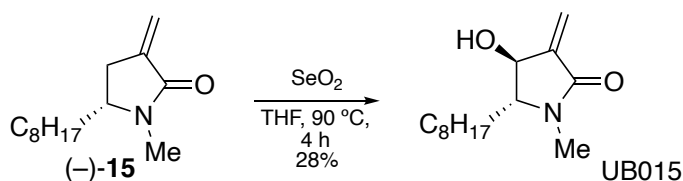
A continuación, se procedió a la metilación del nitrógeno con CH_3I y NaH como base en THF (**Esquema 42**) con un excelente rendimiento. El motivo de metilar la lactama era proteger el nitrógeno de las condiciones de oxidación de la última etapa.



Esquema 42. Metilación del nitrógeno con yoduro de metilo en medio básico.

El análisis de la rotación específica de una disolución del compuesto permitió determinar que se trataba de la lactama (-)-15 y, aunque su configuración absoluta no ha sido confirmada, suponemos la reacción transcurre con retención de la configuración y que el producto se trata del isómero *R*.

El último paso de la síntesis fue la reacción de oxidación con SeO_2 asistida por microondas. Se aisló el producto final con un rendimiento discreto del 28% (**Esquema 43**), suficiente para la obtención de cantidades necesarias para los estudios farmacológicos que se querían realizar.



Esquema 43. Oxidación de la lactama (-)-15 con SeO_2 asistida por microondas.

Cabe destacar que en este caso solo se obtuvo uno de los estereoisómeros. Atendiendo al mecanismo de la reacción, donde el SeO_2 oxida preferentemente por el lado menos impedido del anillo, podemos suponer que se trata del isómero *trans*. No obstante, la estereoquímica relativa de los dos sustituyentes no ha podido ser confirmada por RMN.

Se decidió realizar los ensayos biológicos empleando el UB015.

3.3 Estudio de la actividad antitumoral de los nuevos derivados.

3.3.1 Resultados previos

Durante la tesis del Dr. Makowski, se estudió el efecto inhibitor de los nuevos compuestos en la acción enzimática de la FAS con extractos proteicos. A pesar de que el (±)-UB006 reportó un valor de IC_{50} ligeramente superior al del C75, el estudio de la actividad del compuesto con diferentes líneas celulares demostró que su citotoxicidad frente a las células OVCAR-3, de cáncer de ovario, era 20 veces superior al del C75.

Una manera de determinar la inhibición del crecimiento celular es el ensayo de MTT. En este experimento, una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT) se añade a las células cultivadas en una placa. Las células viables reducen el MTT a formazán (Figura 36), un producto de color morado cuya absorbancia se puede medir en un lector de placas y se utiliza para estimar el número de células vivas. Cuanto mayor sea la inhibición del crecimiento celular tras incubar las células con los nuevos compuestos, menor será la cantidad de formazán producido durante el ensayo, y, por tanto, menor será la absorbancia medida.

Para evaluar la actividad farmacológica de las nuevas moléculas, se realiza una comparación entre las células tratadas con los compuestos y un grupo de control sin inhibidor. Esto permite obtener valores de IC_{50} , que permiten estimar la potencia de los compuestos.

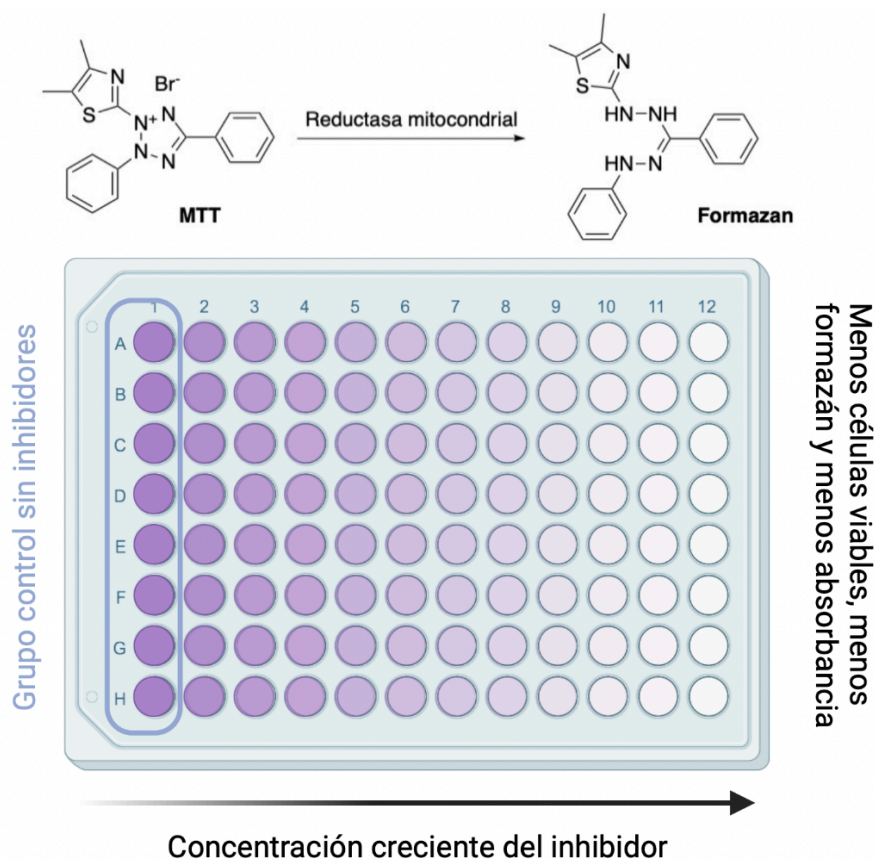


Figura 36. Ensayo de viabilidad celular con MTT.

En vista de este precedente, donde la inhibición enzimática de la FAS no se correspondía directamente con el carácter citotóxico de los compuestos, se decidió probar la eficacia de los sustratos directamente sobre la línea celular OVCAR-3.

Como criterio para la continuación del proyecto de derivados hidroxilados del C75 se estableció superar la actividad antitumoral del (\pm)-UB006. Si se lograra una mejor actividad, se trataría de aislar los isómeros de los compuestos, de lo contrario, se daría prioridad a otros proyectos.

3.3.2 Estudio de los derivados UB009, (\pm)-UB010 y (\pm)-UB011

El primer estudio se realizó con el derivado del (\pm)-UB006 cuyo grupo hidroxilo está unido directamente al ciclo de la lactona. Merece la pena recordar que no se consiguió separar la mezcla de isómeros *cis* y *trans*, por lo que los resultados de los resultados biológicos se refieren a una mezcla 8:2 de los compuestos (\pm)-UB010 y (\pm)-UB011.

Los valores obtenidos para la viabilidad celular de las OVCAR-3 con concentraciones crecientes de la mezcla de isómeros se muestran en la **Figura 37**:

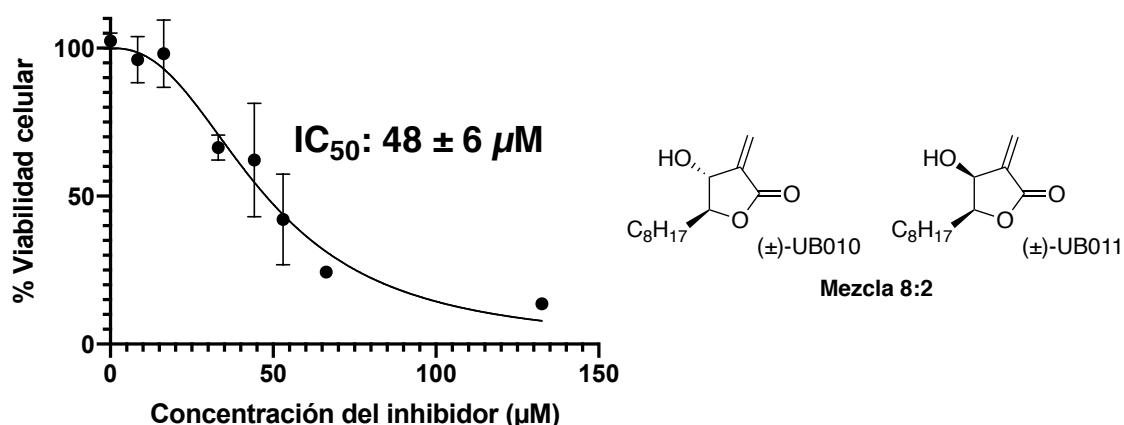


Figura 37. Efecto citotóxico de la mezcla 8:2 del (\pm)-UB010 y (\pm)-UB011 frente a las células tumorales OVCAR-3. Representación del % de viabilidad celular resultante del ensayo de MTT tras tres días de incubación con concentraciones crecientes de los inhibidores. Cada ensayo se realizó por triplicado y el resultado se expresa como la media \pm S.E.M.

Como demuestran los valores de IC_{50} obtenidos para los derivados (\pm)-UB010 y (\pm)-UB011, la unión directa entre el grupo hidroxilo y el ciclo se traduce en una pérdida considerable de la actividad citotóxica de los compuestos.

El análisis de la actividad de los derivados de C75 con cadenas hidroxiladas de diferentes longitudes, ha permitido determinar que los mejores resultados en la inhibición del crecimiento en líneas celulares tumorales se dan cuando la distancia entre el alcohol y la lactona es de un metileno ($-CH_2-$).

Por otro lado, se trató de evaluar la actividad antitumoral del derivado UB009, que fue generado como un subproducto durante la obtención del (\pm)-UB010 y (\pm)-UB011 (ver **Esquema 13**, página 49).

Sin embargo, su actividad era tan baja que solo se pudo determinar que el valor de IC₅₀ para la inhibición del crecimiento en las células OVCAR-3 era mayor a 100 μM. Esto significa que, cuando las células se trataron con esa concentración del inhibidor, su viabilidad no disminuyó significativamente.

3.3.3 Estudio de los derivados (±)-UB013 y UB015

El primer derivado del (±)-UB006 con estructura de lactama estudiado fue el UB015, donde el nitrógeno se encuentra metilado (**Figura 38**).

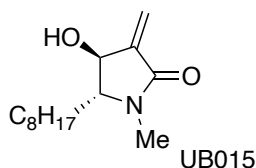


Figura 38. Estructura del derivado UB015.

Pese a que para el ensayo se emplearon concentraciones del inhibidor entre 8 y 125 μM, no se pudo determinar el valor del IC₅₀ de la molécula, ya que a la concentración máxima utilizada la viabilidad de las células no se había visto alterada significativamente respecto al control. Es por ello, que solo podemos afirmar que el IC₅₀ del UB015 es superior a 125 μM.

Los siguientes compuestos estudiados fueron los derivados (±)-UB013 y *cis*-(±)-UB013 en los que el nitrógeno se encuentra sustituido por un grupo más electronegativo y voluminoso en comparación con la lactama metilada.

El ensayo se realizó con la mezcla de isómeros (±)-UB013 y *cis*-(±)-UB013 en una proporción 9:1. Los resultados valores de viabilidad celular obtenidos con las OVCAR-3 a valores crecientes de concentración de los inhibidores se encuentran representados en la **Figura 39**:

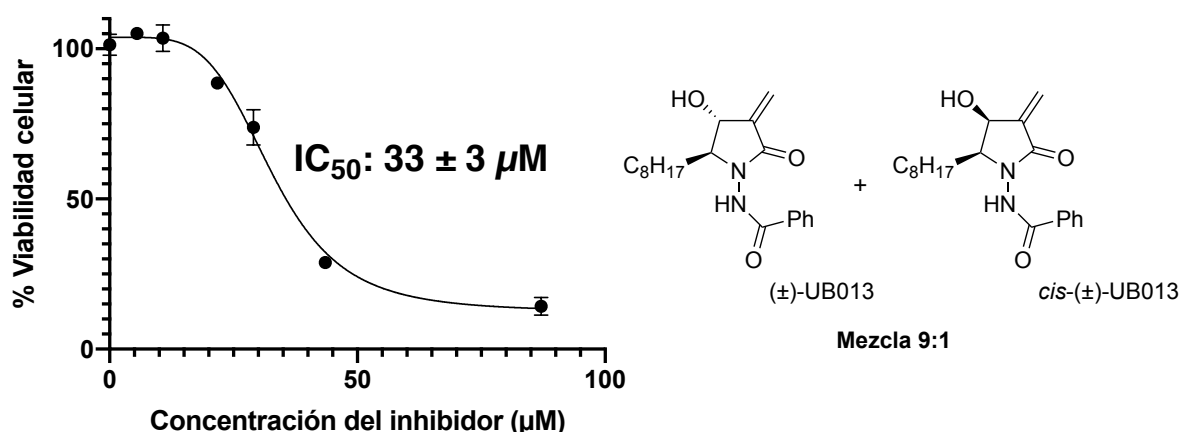


Figura 39. Efecto citotóxico de la mezcla de isómeros (±)-UB013 y *cis*-(±)-UB013 frente a las células tumorales OVCAR-3. Representación del % de viabilidad celular resultante del ensayo de MTT tras tres días de incubación con concentraciones crecientes de los inhibidores. Cada ensayo se realizó por triplicado y el resultado se expresa como la media ± S.E.M.

La citotoxicidad de estas moléculas, aunque inferiores a las del (\pm)-UB006, presentan una mejor actividad que los derivados (\pm)-UB010 y (\pm)-UB011, manifestando que los compuestos de tipo lactama también pueden presentar actividad inhibitoria del crecimiento celular en células tumorales.

3.4 Discusión de los resultados biológicos

3.4.1 Lactonas

Se ha podido determinar la actividad de los nuevos análogos del (±)-UB006 frente al crecimiento celular de la línea tumoral OVCAR-3. Sus valores de IC_{50} se resumen en la **Tabla 7**:

Tabla 7. Valores de IC_{50} para la inhibición del crecimiento celular de la línea tumoral OVCAR-3.

Derivado	IC_{50} (μM)
(±)-UB010/(±)UB011 (8:2)	44 ± 12
UB009	>100
(±)-UB013/ <i>cis</i> -(±)-UB013 (9:1)	33 ± 3
UB015	>125

Respecto a los derivados hidroxilados con estructura de lactona, los resultados obtenidos con la mezcla de isómeros del (±)-UB010 y (±)-UB011 muestra una actividad menor que el (±)-UB006 donde el alcohol está separado de la lactona por una unidad de carbono (**Figura 40**).

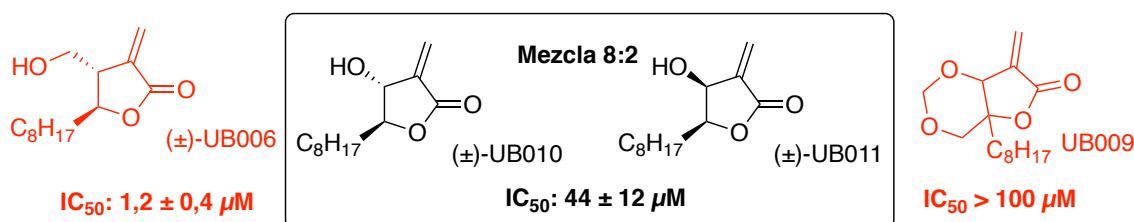


Figura 40. Valores de IC_{50} para la inhibición del crecimiento celular en la línea tumoral OVCAR-3 de los derivados (±)-UB006 y la mezcla de isómeros de (±)-UB010, (±)-UB011 y UB009.

Asimismo, el estudio de la actividad del compuesto UB009 demuestra que la presencia de un grupo hidroxilo es fundamental para la citotoxicidad del compuesto, y que la modificación de este en forma de éter se traduce en una pérdida de la actividad biológica.

Aunque no existe un modelo de la interacción de la FAS con el (±)-UB006, se han realizado estudios de docking con el C75, los cuales muestran la importancia del grupo ácido como un elemento clave en la estructura para la actividad farmacológica.

Pese a que el centro activo del dominio TE de la FAS no está bien descrito, diferentes trabajos bioinformáticos sugieren la existencia de un bolsillo que podría alojar tanto al palmitato como a los derivados sintéticos C75 y Orlistat.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ En concreto, el artículo de Cheng y col.¹⁹⁰ describe la presencia de dos regiones dentro del centro activo. La

primera, de naturaleza hidrofóbica, aloja la cadena alifática tanto del palmitato como del C75.

En la segunda región, con mayor presencia de residuos hidrofílicos, se encuentran los tres aminoácidos responsables de catalizar la reacción: serina 2308, asparagina 2338 e histidina 2481, siendo con esta última con la que el grupo ácido de la molécula interactúa.

El estudio publicado por nuestro grupo demostró que la reducción del ácido carboxílico a alcohol aumenta la actividad citotóxica de la molécula²⁹ por lo que la interacción entre la enzima y el inhibidor probablemente ocurra mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno con la histidina y que la presencia del carbonilo es prescindible de cara a su actividad.

La falta de actividad antitumoral del UB009 podría ser atribuida precisamente a su incapacidad de establecer una interacción efectiva con el centro activo del dominio TE de la FAS, además de tener un difícil acceso al centro activo de la enzima debido a su tamaño.

Por otro lado, la comparación de los resultados obtenidos con los derivados hidroxilados de tipo lactona demuestran que la distancia óptima para la inhibición de la enzima es de un metileno entre el hidroxilo y el ciclo.

Comparando las estructuras del C75 y el (±)-UB006, puede apreciarse que la distancia entre el -OH y el ciclo es más similar en el caso de este último, en comparación con los compuestos (±)-UB010 y (±)-UB011 (**Figura 41**).

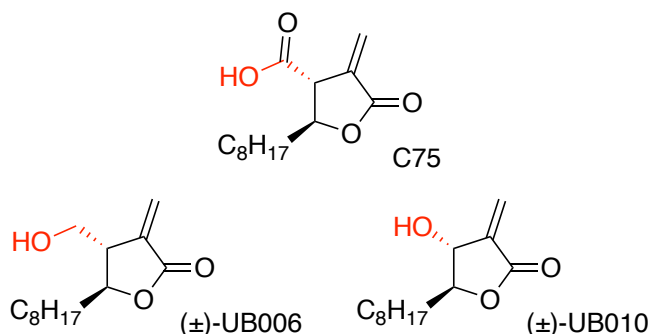


Figura 41. Comparación estructural del C75 y los derivados (±)-UB006 y (±)-UB010 donde se destaca la similitud en la distancia entre el grupo OH y el ciclo de la lactona.

Este acortamiento en la distancia puede suponer una peor interacción entre el alcohol y el aminoácido que impacte negativamente en la capacidad inhibitoria de las moléculas.

3.4.2 Lactamas

Está descrito que muchas lactamas presentan actividad biológica¹⁹¹⁻¹⁹⁴ lo que nos impulsó a sintetizar el derivado UB015, que consiste en una γ -lactama *N*-metilada (Figura 42).

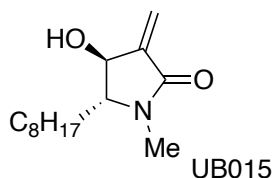


Figura 42. Estructura del derivado UB015.

Debe tenerse en cuenta que se han descrito diferentes derivados de tipo pirrolidona basados en la estructura del orlistat con actividad inhibitoria de la FAS.¹⁹⁵

El nitrógeno en los anillos de estos derivados no está funcionalizado, pero la presencia de un enlace N-H podría dificultar la obtención desde un punto de vista sintético. Como solución, se optó por metilar el nitrógeno con la idea de protegerlo con un grupo poco voluminoso para obtener el mayor parecido estructural con una lactama no *N*-sustituida.

Por desgracia, los resultados obtenidos tras la incubación de las células OVCAR-3 con el UB015 mostraron que el compuesto carecía de actividad citotóxica.

Por otro lado, se estudió la actividad de una mezcla de los compuestos (\pm)-UB013 y *cis*-(\pm)-UB013, cuya estructura presenta una benzohidrazida (Figura 43).

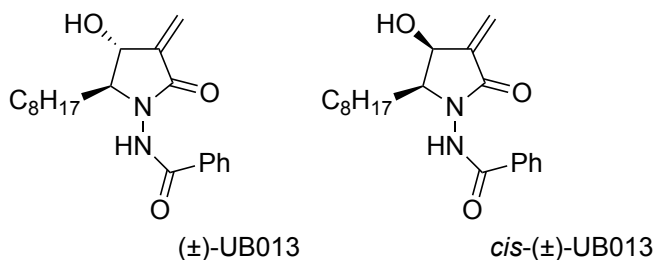


Figura 43. Estructura de los derivados (\pm)-UB013 y *cis*-(\pm)-UB013.

Comparado con el derivado (\pm)-UB012 la funcionalización fuertemente electronegativa sobre el nitrógeno podría provocar un mayor carácter electrófilo al sistema insaturado, facilitando la unión covalente de la molécula a la enzima.

No obstante, la mezcla de isómeros reportó un IC_{50} de $33 \pm 3 \mu M$ para la inhibición del crecimiento de la línea celular OVCAR-3, siendo un valor significativamente superior al del compuesto (\pm)-UB012 con un IC_{50} de $11,9 \mu M$.

Si comparamos los resultados con la mezcla de (\pm)-UB010 y (\pm)-UB011 podemos ver que la actividad citotóxica de lactamas puede ser superior a la de lactonas.

Este hecho pone de manifiesto que probablemente la menor actividad de los nuevos inhibidores respecto al (\pm)-UB012 son a causa del acortamiento de la distancia entre el

grupo hidroxilo y el ciclo, y no por el cambio de sustituyente sobre el nitrógeno, que sigue conteniendo un anillo de tipo benceno en su estructura.

Con estos resultados podemos concluir que las estructuras de tipo lactama son potenciales candidatos a inhibidores de FAS con capacidades citotóxicas. Además, parece ser que la presencia de un grupo insaturado sobre el átomo de nitrógeno puede tener efectos positivos sobre su actividad biológica. No obstante, se trata de ensayos limitados e incipientes que necesitan más trabajo sobre la relación entre la estructura y la actividad de estos compuestos. Sin duda sería interesante realizar estudios de docking con este tipo de compuestos y los centros activos de la FAS para comprobar si el anillo aromático puede estar favoreciendo la unión entre el sustrato y la enzima mediante algún tipo de interacción hidrofóbica o aromática.

4 Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de C75

4.1 Obtención de derivados con azufre del C75

4.1.1 Precedentes bibliográficos

Existen referencias en la literatura científica de múltiples compuestos orgánicos con átomos de azufre en su estructura que presentan propiedades biológicas muy variadas y que se han asociado con una amplia gama de efectos farmacológicos, incluyendo antibióticos y antiinflamatorios.^{196–199}

Entre ellos queremos destacar la tiolactomicina, ya citada en la introducción (**Figura 9**), y el derivado de tipo tiolactona del C75 (**Figura 44**) preparado por Xiaokui Wang y su equipo que han demostrado poseer capacidad inhibitoria de la FAS.^{121,189}

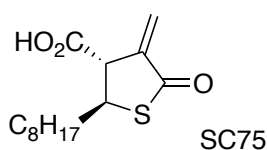


Figura 44. Estructura del SC75, descrita por Wang como un inhibidor de la FAS.

Los resultados positivos obtenidos en la inhibición de la FAS con anillos de tiolactona y la evidente similitud estructural entre el C75 y el SC75 nos impulsaron al estudio de la actividad del SC75 como potencial inhibidor de la CPT1 y la síntesis de dos análogos inéditos más de C75 con un átomo de azufre; el tioácido (\pm)-UB019 y la tiolactona (\pm)-UB020, cuyas estructuras se muestran en la **Figura 45**:

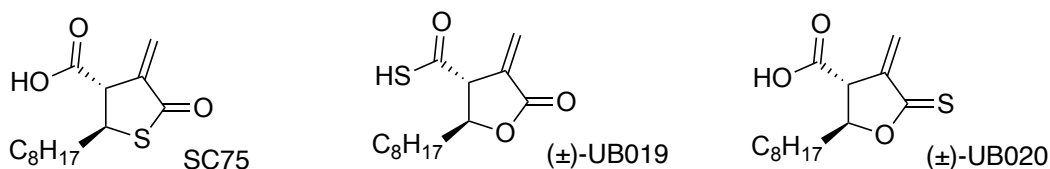


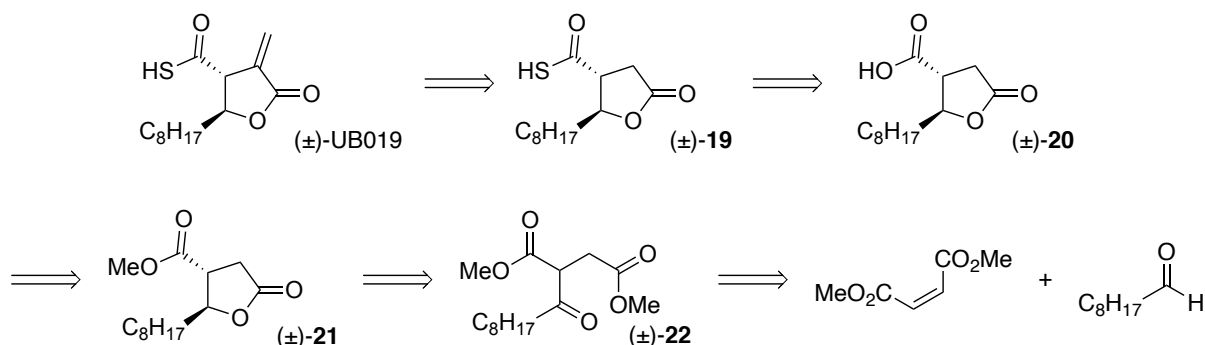
Figura 45. Estructuras de los nuevos posibles análogos sulfurados del C75.

El efecto de reemplazar un átomo de oxígeno por azufre en el C75 sobre la inhibición de CPT1 no se había estudiado hasta entonces. Sin duda la modificación estructural es pequeña y era presumible que la actividad no difiriera mucho a la del C75, pero la mayor lipofilia del azufre podía ayudar a la biodisponibilidad. Por otra parte, podría tratarse de compuestos más inestables debido a la mayor labilidad del enlace C-S en comparación con el enlace C-O, lo que podría reducir su toxicidad al más fácilmente metabolizados.^{200,201}

4.1.2 Intento de síntesis del (±)-UB019

Nuestra andadura por la síntesis de análogos del C75 con azufre se inició con el intento de síntesis del (±)-UB019 por suponer una mayor simplicidad sintética respecto a los otros análogos.

Nuestro análisis retrosintético se muestra en el **Esquema 44**.

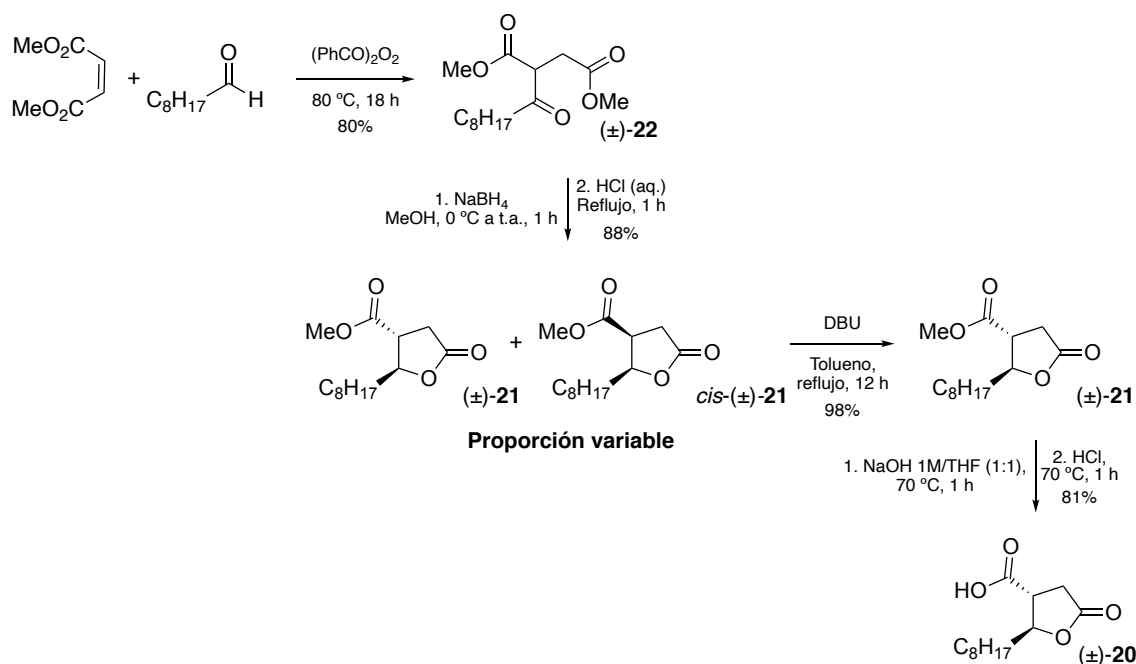


Esquema 44. Análisis retrosintético del (±)-UB019.

El tioácido deseado se podría obtener por la metilación de **19** con alguna de las metodologías empleadas con anterioridad en el grupo. A su vez, dicho intermedio (±)-**19** podría prepararse mediante el intercambio del átomo de oxígeno del ácido por un azufre, empleando el reactivo de Lawesson.

La lactona (±)-**20** se podría obtener de acuerdo a protocolos ya descritos a partir de la hidrólisis del éster metílico (±)-**21**, y este a su vez, se podría preparar mediante la reducción y ciclación *in situ* de la cetona (±)-**22**. Finalmente, el intermedio (±)-**22** se aislaría tras la condensación del nonanal con el maleato de dimetilo, ambos disponibles comercialmente.

Debe tenerse en cuenta que en nuestro grupo se había optimizado previamente la síntesis del ácido (±)-**20**, ya que se trata de un intermedio común en la síntesis del C75 y del (±)-UB006. Por lo tanto, para su síntesis se siguió la metodología descrita por el Dr. Makowski en su tesis doctoral y que se resume en el **Esquema 45**:



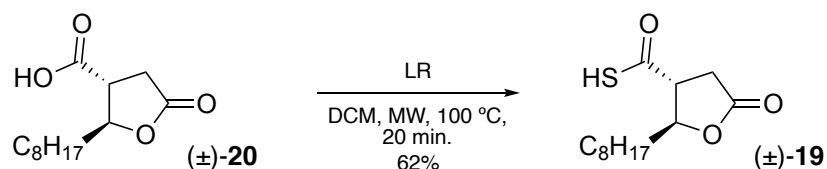
Esquema 45. Ruta sintética para la obtención del intermedio (±)-20.

La primera reacción consistió en la adición radicalaria de nonanal al maleato de dimetilo empleando peróxido de benzoilo ((PhCO)₂O₂) como iniciador. La cetona obtenida se reduce empleando borohidruro de sodio y se cicla *in situ* mediante calentamiento a reflujo en medio ácido.

La lactonización conduce a una mezcla de diastereoisómeros en proporción variable. Dado que nuestra experiencia previa indica que las lactonas *trans* presentan una mayor actividad biológica, se isomerizó la mezcla empleando la base no nucleófila, el 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) y se obtuvo exclusivamente el isómero deseado por ser más estable termodinámicamente. Esta isomerización se explica por el equilibrio entre lactona y su enolato que la base provoca.

Por último, la obtención del ácido se consigue mediante hidrólisis del éster metílico por agitación en una mezcla de THF y NaOH 1M (1:1) a 70 °C.

A partir de este punto, las rutas sintéticas divergen. Para la obtención del nuevo derivado de C75 solo se requerirían dos pasos adicionales. El primero de ellos fue el intercambio del átomo de oxígeno del ácido carboxílico por un átomo de azufre, empleando el reactivo de Lawesson (LR) en una reacción asistida por microondas. Este tipo de transformaciones están descritas en la literatura.²⁰²



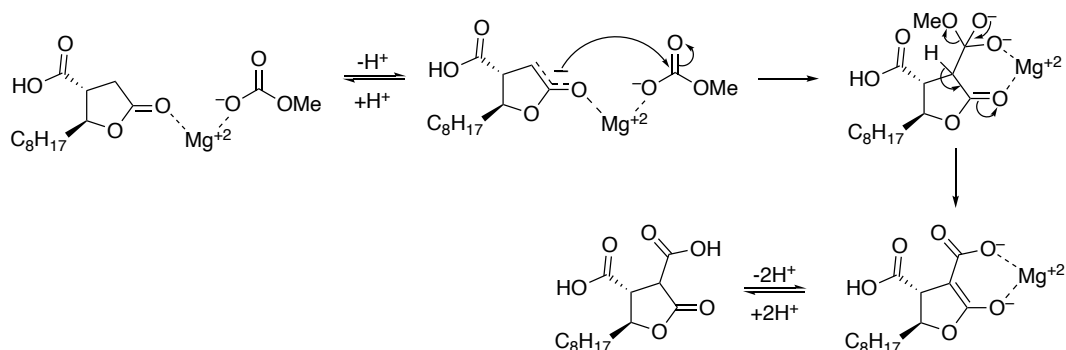
Esquema 46. Obtención del tioácido (±)-19.

A pesar de la complicada purificación del tioácido por cromatografía de columna debido a su alta polaridad, tal y como se ve reflejado en el **Esquema 46**, la metodología descrita por Rao y col.²⁰³ permite la obtención del producto con un buen rendimiento.

El último paso de la obtención del nuevo derivado sería la metilación del tioácido mediante alguna de las metodologías previamente empleadas por el grupo. La primera aproximación que se realizó empleando carbonato de metilmagnesio (MMC) siguiendo el método desarrollado por Greene.²⁰⁴

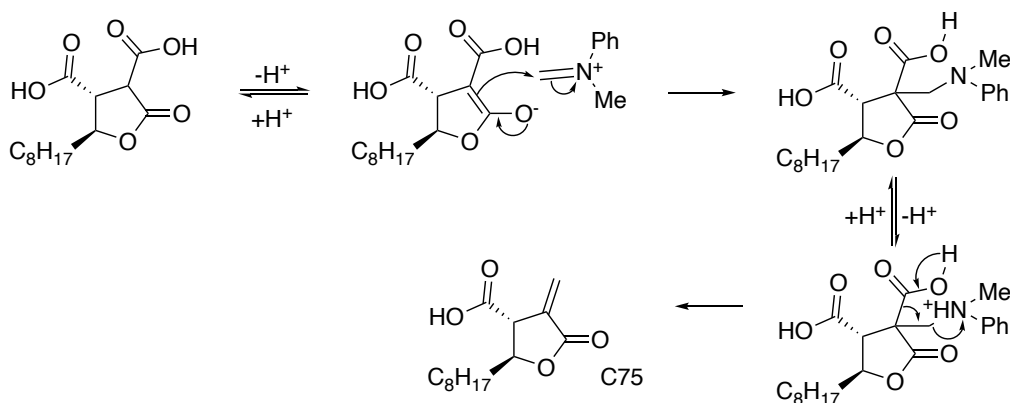
La metilación con esta técnica es alternativa a la mencionada en el capítulo anterior, que usa trifluoroacetato de 2,2,2-trifluoroetilo. Ambos procedimientos se basan en la activación de la posición α de la lactona para obtener un enolato que reaccione con un equivalente sintético del formaldehído. En nuestro caso el reactivo MMC es el encargado de activar el carbono añadiendo un ácido carboxílico contiguo al carbonilo de la lactona, y el carbono del formaldehído se introduce en forma de ion iminio. La descarboxilación-eliminación de este intermedio genera de manera irreversible el doble enlace exocíclico.

Mecanísticamente, la coordinación del ion magnesio (II) con el carbonilo facilita la desprotonación del hidrógeno en α de la lactona, generando un enolato estabilizado que puede reaccionar con el carbonato de metilo presente en el medio. El intermedio resultante elimina una molécula de metanol obteniéndose un enolato, que tras su protonación genera un diácido altamente reactivo como se describe en el **Esquema 47**:



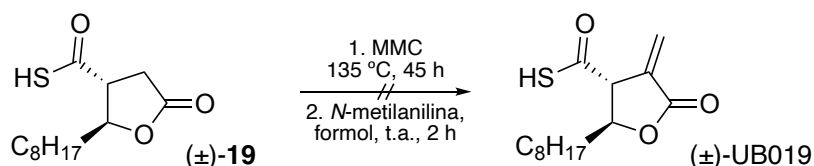
Esquema 47. Mecanismo de la activación de la posición α de la lactona con MMC.

En el protocolo descrito este intermedio no se llega a aislar nunca, y su tratamiento con la sal de iminio formada entre la *N*-metilanilina y el formaldehído en el medio de reacción, permiten obtener el doble enlace exocíclico tras una descarboxilación-eliminación de la *N*-metilanilina (**Esquema 48**).



Esquema 48. Mecanismo de la obtención del metileno a partir del intermedio diácido tras la descarboxilación-eliminación.

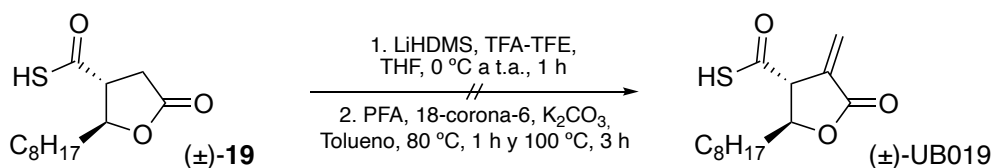
No obstante, cuando se intentó la metilénación del tioácido (\pm)-**19**, no se consiguió obtener el producto deseado (**Esquema 49**) ni recuperar el material de partida obteniéndose un crudo complejo.



Esquema 49. Intento de metilénación del tioácido (\pm)-**19** con MMC.

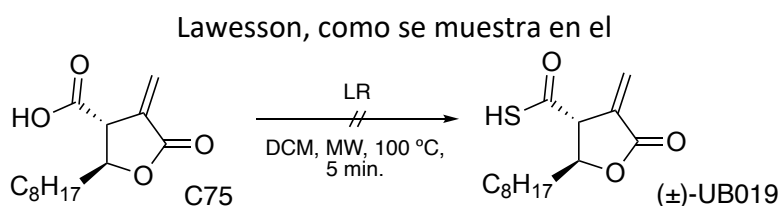
Decidimos intentar entonces la metilénación empleando TFA-TFE, dado que se lleva a cabo a baja temperatura y en condiciones de reacción más suaves que en la metilénación con MMC.

Pero, tal y como se muestra en el **Esquema 50**, tampoco se consiguió aislar el derivado (\pm)-UB019.

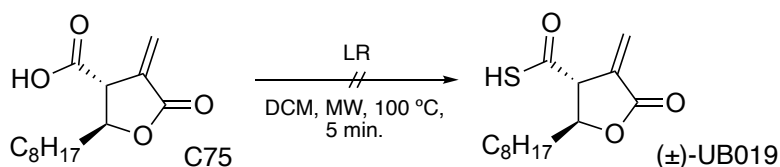


Esquema 50. Intento de metilénación empleando TFA-TFE.

Tras comprobar que la estabilidad del tioácido no era compatible con las condiciones de la reacción empleadas en las diferentes pruebas llevadas a cabo, se decidió invertir el orden de la ruta sintética introduciendo el azufre después del doble enlace. Para ello se intentó la introducción del azufre al grupo ácido del C75 con el reactivo de



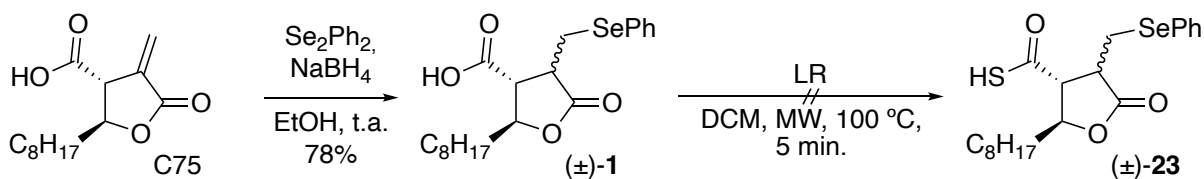
Esquema 51.



Esquema 51. Intento de sulfuración del C75.

No obstante, tampoco en este caso se consiguió aislar el producto ni determinar la composición del crudo de reacción.

En un último intento decidimos proteger el doble enlace con un éter de selenio (estrategia que ya habíamos utilizado en nuestro grupo anteriormente) y llevar a cabo la sustitución del átomo de oxígeno, como se muestra en el **Esquema 52**.



Esquema 52. Intento de protección del doble enlace y sulfuración del C75.

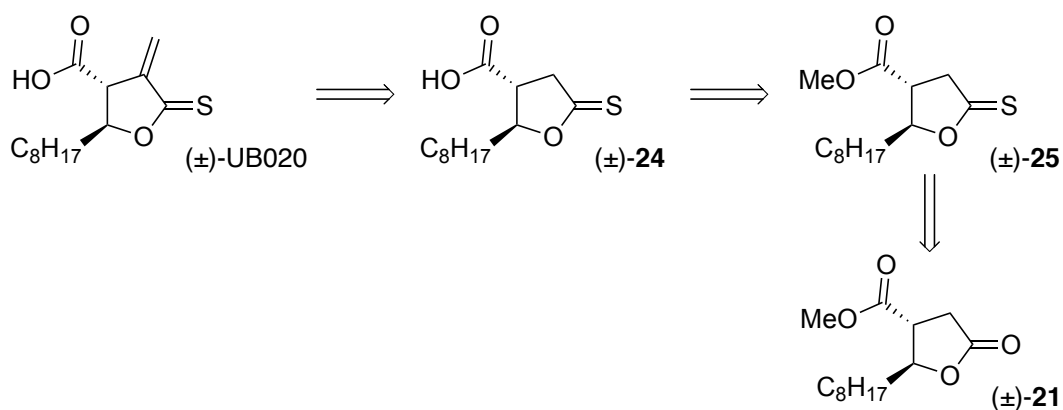
Pese a nuestros esfuerzos, tras el tratamiento final y la separación del crudo no se obtuvo producto ni se recuperó material de partida.

La síntesis del derivado (±)-UB019 estaba dando más problemas de los esperados. Al tratarse de una lactona con dos grupos funcionales delicados, las dos estrategias intentadas se basaban en la introducción de estos grupos en las últimas etapas de la síntesis, de manera que su integridad no se viese comprometida.

Concluimos entonces que la obtención de la cantidad necesaria del derivado (±)-UB019 para las pruebas farmacológicas no iba a ser posible en la presente tesis. Por tanto, decidimos centrar nuestros esfuerzos y recursos en la obtención de otros derivados de azufre del C75.

4.1.3 Intento de síntesis del (±)-UB020

El siguiente análogo con azufre del C75 que intentamos obtener fue la tionolactona (±)-UB020. Pensamos que para su síntesis se podría partir del éster (±)-21, tal y como propone el análisis retrosintético inicial mostrado en el **Esquema 53**:

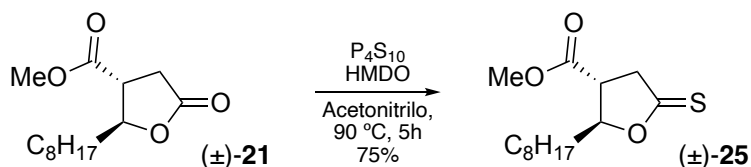


Esquema 53. Análisis retrosintético del (±)-UB020 partiendo del éster (±)-21 como material de partida.

Nuestro planteamiento se basaba en la metilación de la tionolactona (±)-24, la cual esperábamos que fuera lo suficientemente robusta como para soportar alguna de las metodologías de metilación discutidas anteriormente.

El ácido se podría obtener hidrolizando el éster metílico en unas condiciones suaves que impidieran la apertura del ciclo. El éster, a su vez, se podría preparar mediante la sustitución del átomo de oxígeno por azufre, empleando algún compuesto descrito en la literatura que permitiera la transformación a partir de la lactona (±)-21, ya citada en el apartado anterior de este mismo capítulo.

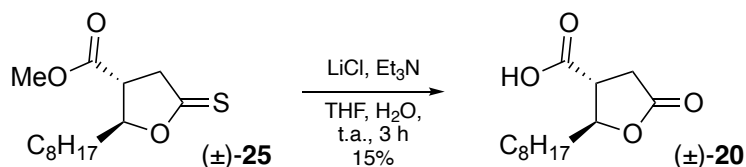
La tionación de la lactona (±)-21 se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Curphey y col.²⁰⁵ donde descubrió que la combinación de hexametildisiloxano (HMDSO) con P₄S₁₀ permitía la obtención de tionolactonas con mejor rendimiento que empleando el reactivo de Lawesson incluso en presencia de grupos éster, tal y como se muestra en el **Esquema 54**.



Esquema 54. Tionación de la lactona (±)-21.

Las condiciones empleadas nos permitieron obtener el compuesto deseado con total quimioselectividad, sin afectar al grupo éster exocíclico.

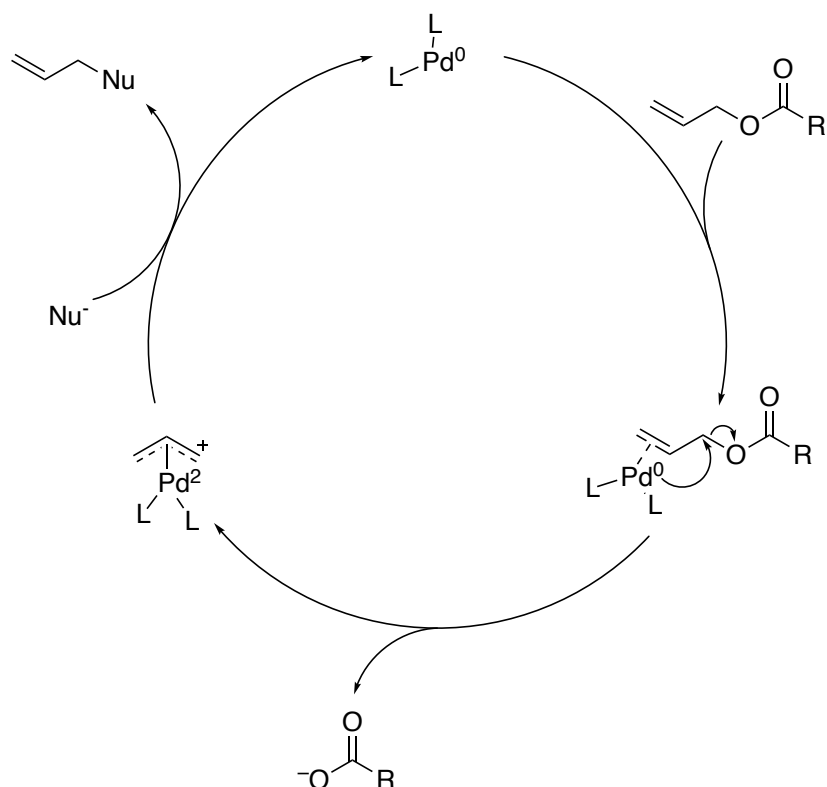
Se requería entonces la hidrólisis del éster metílico para obtener el ácido carboxílico. Para ello se optó por una hidrólisis en condiciones suaves, intentando evitar la apertura del anillo de la tionolactona, que podría ser sensible al tratamiento con bases nucleófilas. Para ello tratamos el material de partida con LiCl, que actúa aumentando la electrofilia del carbonilo mediante la coordinación con el ion Li^+ , y Et_3N como base no nucleofila²⁰⁶, siguiendo las condiciones descritas en el **Esquema 55**.



Esquema 55. Intento de hidrólisis de la tionolactona (±)-25.

No obstante, en los sucesivos intentos de obtener el ácido (±)-24, lo único que se consiguió aislar fue material de partida y la lactona (±)-20, fruto de la hidrólisis del anillo de tionolactona.

Ante la imposibilidad de hidrolizar el éster metílico en presencia del átomo de azufre, decidimos sintetizar un éster alílico, que puede ser eliminado en presencia de paladio siguiendo el ciclo catalítico que se muestra en el **Esquema 56**:

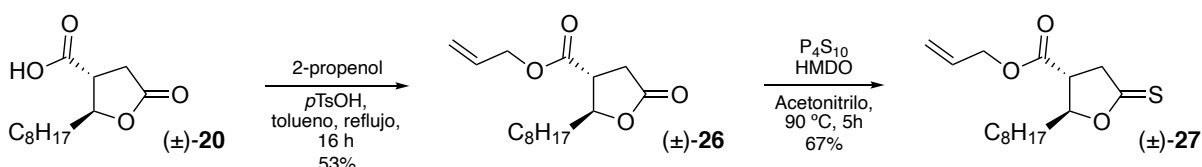


Esquema 56. Ciclo catalítico de la eliminación del éster alílico con paladio.

El $\text{Pd}(0)$ es capaz de coordinarse con los electrones π del doble enlace e insertarse liberando el anión carboxilato. El complejo π -alílico de paladio (II) resultante reacciona

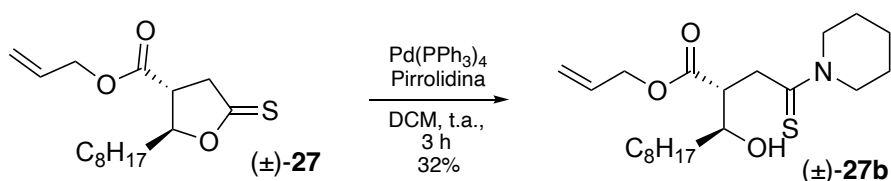
con un nucleófilo (Nu^-), siendo agua en este caso, liberándose una molécula de 2-propenol y regenerándose el paladio metálico.

El éster alílico se consiguió por calentamiento a reflujo en un montaje de Dean-Stark del ácido (\pm)-**20** y el 2-propenol con ácido *para*-toluensulfónico (*p*-TsOH) como catalizador. La introducción del átomo de azufre se realizó con éxito empleando P_4S_{10} y HMDO como ocurrió antes con la lactona (\pm)-**21**. Los resultados se recogen en el **Esquema 57**.



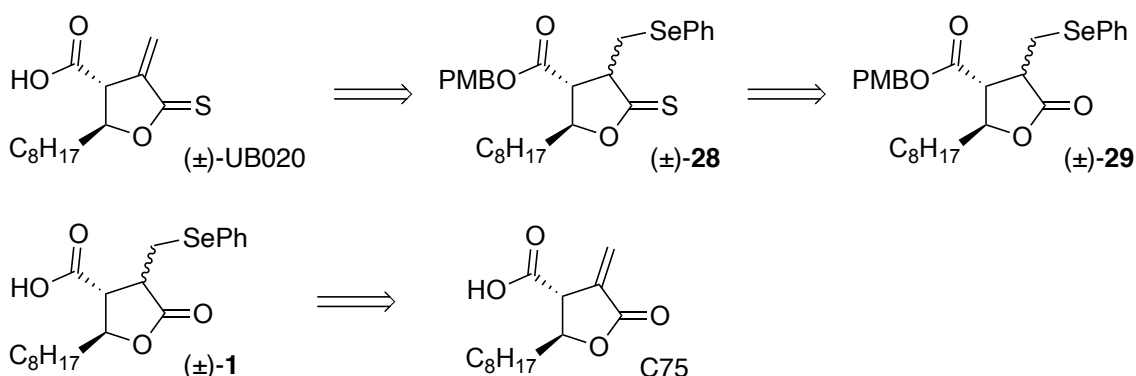
Esquema 57. Obtención del compuesto (\pm)-**27**.

Pese a los buenos resultados obtenidos en la preparación del nuevo intermedio, cuando se intentó desproteger el ácido mediante el uso de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, el único compuesto que se pudo aislar e identificar fue el resultante de la apertura del anillo con pirrolidina, tal y como se refleja en el **Esquema 58**.



Esquema 58. Intento de desprotección del ácido (\pm)-**27**.

Tras comprobar que, de nuevo, la estabilidad de la tionolactona se veía comprometida al someter el compuesto a condiciones mínimamente nucleófilas se planteó una nueva aproximación al derivado (\pm)-UB020 basada en la tionación de un intermedio doblemente protegido, tal y como muestra análisis retrosintético del **Esquema 59**.

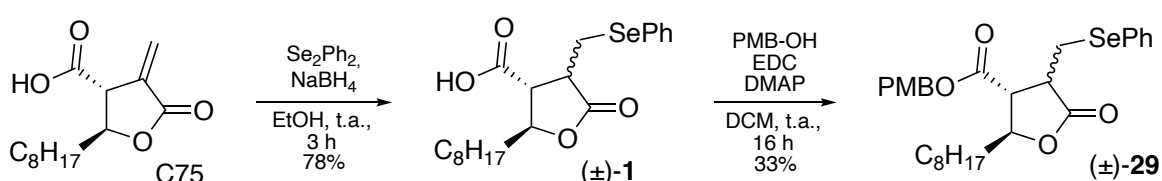


Esquema 59. Análisis retrosintético para la obtención del (\pm)-UB020 a partir del C75.

Para la obtención del (±)-UB020 se requiere la síntesis de un intermedio de tipo tionolactona doblemente protegido como (±)-**28**. Esta molécula presenta un éter de selenio que protege al doble enlace, y un éster de *p*-metoxibencilo que protege al grupo ácido. Ambos grupos protectores podrían eliminarse tras una oxidación suave para generar el derivado (±)-UB020.

La síntesis del intermedio (±)-**28** se podría llevar a cabo mediante la tionación de la lactona (±)-**29** empleando P₄S₁₀ y HMDO, como se ha realizado anteriormente en sustratos similares. A su vez, la lactona (±)-**29** se podría preparar en dos etapas; la protección del doble enlace y la protección del éster con los grupos ya mencionados.

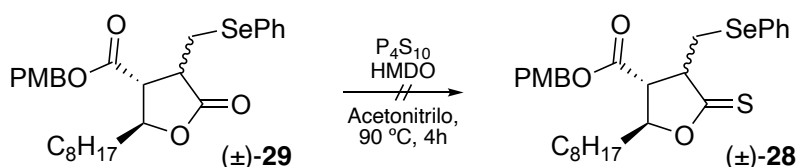
La síntesis del compuesto (±)-**29** se llevó a cabo, aunque con rendimiento mediocre, tal y como se muestra en el **Esquema 60**:



Esquema 60. Obtención del intermedio (±)-**29**.

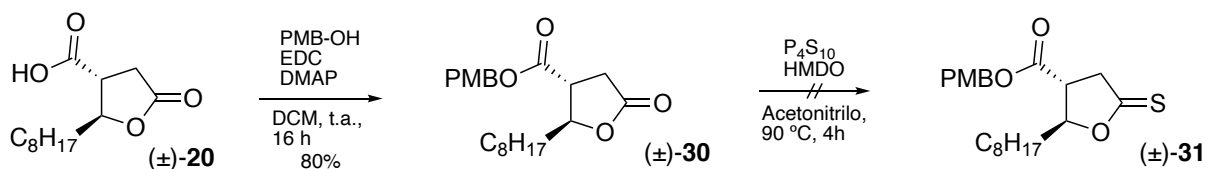
La protección del doble enlace ya ha sido descrita anteriormente, y se volvió a conseguir empleando la mezcla Se₂Ph₂/NaBH₄. Una vez purificado el compuesto, se llevó a cabo la esterificación de Steglich²⁰⁷ modificada, empleando el activador de carboxilos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y dimetilaminopiridina (DMAP) como base.²⁰⁸ La principal ventaja de este método es que permite la esterificación suave ácido, sin comprometer la estabilidad del compuesto (±)-**1** y como subproductos se obtiene un subproducto de la urea que puede ser fácilmente eliminado junto al DMAP mediante lavados acuosos.

Cuando se abordó la tionación de la lactona (±)-**29** con la metodología que nos había permitido la obtención de las tionolactonas (±)-**27** y (±)-**25** no se obtuvo el producto deseado (**Esquema 61**).



Esquema 61. Intento de tionación de la lactona (±)-**29**.

De entrada pensamos que el éter de selenio interfería en la reacción de sustitución con el P₄S₁₀. Para comprobarlo se protegió la lactona (±)-**20** con el PMB y se intentó su tionación, pero no se consiguió llevarla a cabo (**Esquema 62**).



Esquema 62. Síntesis de la lactona (±)-30 e intento de su tiónación.

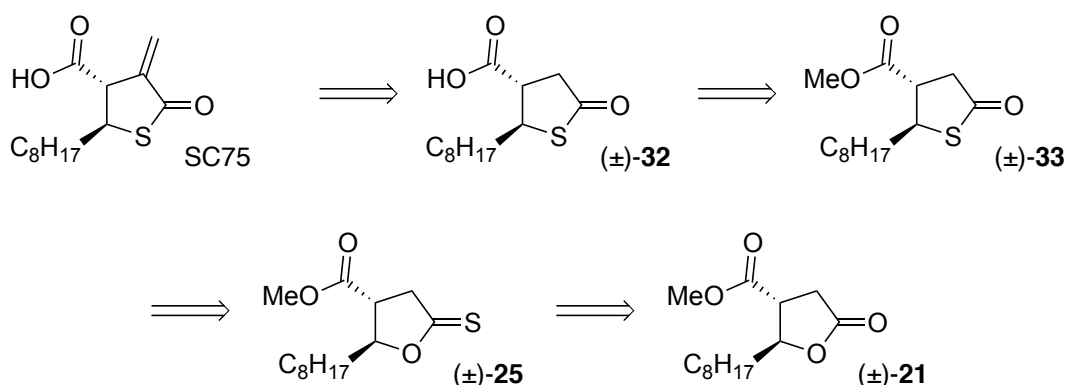
Llegados a este punto y debido a las dificultades encontradas en la manipulación de sus precursores se decidió no continuar con la síntesis del (±)-UB020 y dirigir nuestros esfuerzos otros proyectos más fértiles que se llevaban a cabo paralelamente.

4.1.4 Síntesis del SC75

El derivado SC75 fue originalmente descrito por Wangy y col. en 2009 y se estudió su actividad biológica como inhibidor de la FAS.¹⁸⁹

A pesar de que los autores del artículo describen la obtención del compuesto, nosotros planteamos una metodología alternativa que nos permitiese la obtención del SC75 partiendo de un compuesto común en la síntesis del C75 y el (±)-UB006, el éster metílico (±)-**21**. Este intermedio común para la preparación de los tres derivados de C75 haría su preparación más eficiente y versátil para cubrir futuras necesidades del grupo.

El análisis retrosintético inicial se muestra en el **Esquema 63**.



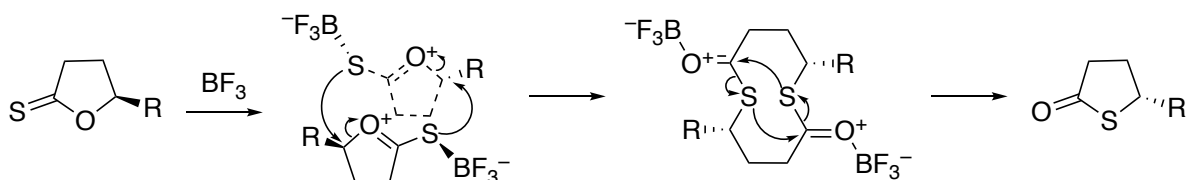
Esquema 63. Análisis retrosintético para la obtención del (±)-SC75 a partir del intermedio común (±)-**21**.

El SC75 se intentaría obtener a partir de la metilación de la tiorlactona (±)-**32**, a partir de alguna de las metodologías ya descritas anteriormente, con la esperanza de que el compuesto fuera más robusto que su análogo de tipo tiorlactona.

El compuesto (±)-**33**, a su vez, se podría obtener por la isomerización de la tiorlactona (±)-**25**. Existen referencias en la literatura que aseguran que la conversión se puede realizar empleando una base de Lewis como el BF_3 .

Por último, la síntesis de la tiorlactona (±)-**25** se obtendría, como ya se ha hecho anteriormente, a partir del tratamiento del intermedio común (±)-**21** con P_4S_{10} y HDMO.

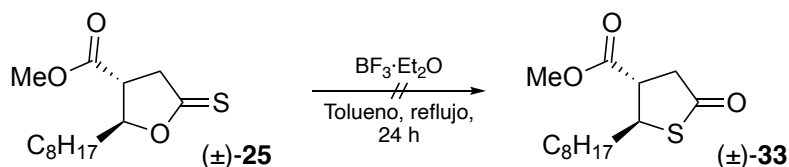
Filippi y col. describieron en 2006 que el tratamiento de diferentes tionolactonas con eterato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) a reflujo de tolueno favorecía la isomerización a tiolactonas.²⁰⁹ Aunque *a priori* puede pensarse que la isomerización ocurre mediante la apertura del ciclo y posterior cierre catalizado por el ácido de Lewis, en el artículo se describe una inversión de configuración en el carbono unido al azufre (**Esquema 64**) en ciertos casos. Para explicar este hecho proponen el mecanismo del esquema.



Esquema 64. Mecanismo de isomerización catalizado por BF_3 .

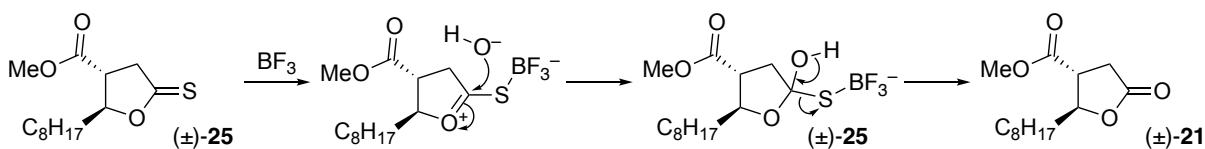
Según los autores, tras la coordinación del BF_3 , dos ciclos reaccionarían entre sí mediante un ataque nucleófilo simultáneo de los átomos de azufre, provocando la inversión de configuración. Los dos ciclos se orientarían en el espacio de forma opuesta, evitando así la tensión estérica de la cercanía del grupo funcional R. El intermedio cíclico formado sería lo suficientemente inestable como para descomponer *in situ*, generando en el proceso dos tiolactonas con inversión de configuración.

Basándonos en los resultados esperanzadores reportados en el artículo, intentamos nosotros la isomerización del intermedio (\pm)-**25** como se muestra en el **Esquema 65**.



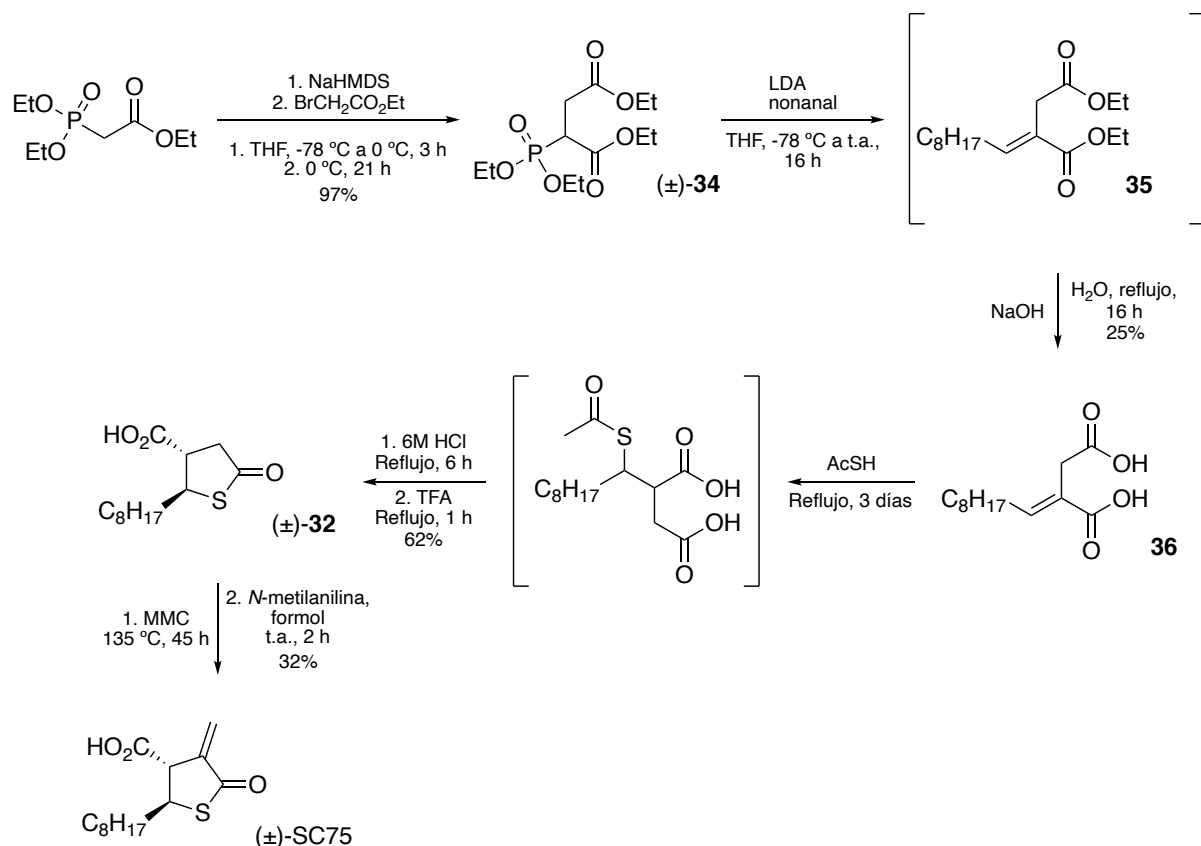
Esquema 65. Intento de isomerización de la tionolactona a tiolactona.

No obstante, no se consiguió obtener el producto en los diferentes intentos realizados y el único compuesto que se consiguió identificar fue el producto de hidrólisis que podría haberse generado por la presencia de agua residual en el tolueno (**Esquema 66**).



Esquema 66. Posible mecanismo de la hidrólisis de la tionolactona con BF_3 que explica la formación del compuesto (\pm)-**21**.

A la vista del resultado negativo, retomamos la metodología descrita por Wang,¹⁸⁹ para la obtención del compuesto como se muestra en el **Esquema 67**.



Esquema 67. Obtención del SC75.

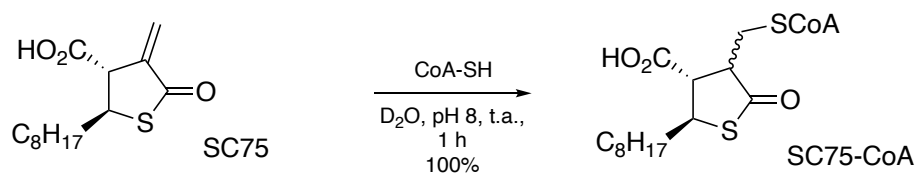
El primer paso fue la condensación del 2-acetoxi-2-(dietoxifosforil)acetato de etilo con 2-bromoacetato de etilo. El artículo original describía la reacción empleando NaH, pero nosotros encontramos que el uso de LiHDMS permitía la obtención del diéster (±)-**34** de manera más limpia.

La reacción condensación del compuesto (±)-**34** con nonanal empleando LDA permite la obtención del compuesto carbonílico β,γ-insaturado. El tratamiento de éste con NaOH acuoso permite la hidrólisis de los dos ésteres etílicos obteniendo el diácido (±)-**36**.

Posteriormente, el reflujo del diácido durante 3 días con ácido tioacético (AcSH) provoca la adición conjugada del grupo tioacetilo al doble enlace. Este intermedio es tratado, sin aislarse, primero con HCl y luego con TFA a reflujo para hidrolizar el tioéster y ciclar el compuesto, obteniéndose así la tiolactona (±)-**32**.

Finalmente, la metilenación de la tiolactona empleando MMC y formol, permite la obtención del derivado sulfurado SC75 con un buen rendimiento y la pureza adecuada para el correcto desarrollo de las pruebas farmacológicas.

Con el fin de poder estudiar la actividad biológica del compuesto con extractos mitocondriales enriquecidos en CPT1A se preparó también el aducto SC75-CoA por la reacción del SC75 con coenzima A a pH 8 en agua deuterada monitorizada por RMN de ^1H , tal y como se muestra en el **Esquema 68**:



Esquema 68. Síntesis del SC75-CoA con el que se realizarán las pruebas de inhibición *in vitro* de CPT1A.

4.2 Obtención de lactamas derivadas del C75

4.2.1 Precedentes bibliográficos

Como ya se ha comentado, los anillos de γ -butirolactamas son subestructuras interesantes en la búsqueda de nuevos fármacos. Comparando con las lactonas análogas, encontramos que este tipo de derivados presentan un punto de funcionalización extra sobre el átomo de nitrógeno, permitiendo una mayor variabilidad estructural en estos derivados de C75 no explorada frente a la inhibición de la CPT1.

En apartados anteriores ya se ha comentado que, para asegurar una capacidad inhibitoria de la CPT1, las moléculas deben tener un metileno exocíclico, un grupo ácido carboxílico y una cadena alifática de al menos 8 átomos de carbono. Por tanto, los nuevos derivados de lactama de C75 con potencial inhibición de CPT1 deberán estar basados en la estructura que se muestra en la **Figura 46**:

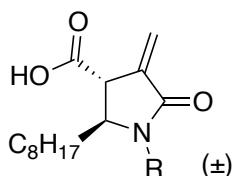


Figura 46. Estructura base de los nuevos derivados de C75 de tipo lactama. El grupo R representa la posibilidad de funcionalización sobre el átomo de nitrógeno.

Teniendo en mente los resultados obtenidos previamente con el compuesto (\pm)-UB012, y la actividad de los derivados (\pm)-UB013 y *cis*-(\pm)-UB013 estudiados en el capítulo anterior, decidimos plantear como nuevo objetivo la obtención de un nuevo derivado del C75 con estructura de lactama, el ácido (\pm)-*trans*-1-benzoil-4-metilen-2-octil-5-oxopirrolidin-3-carboxílico, (\pm)-UB021 (**Figura 47**).

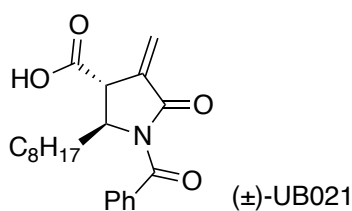
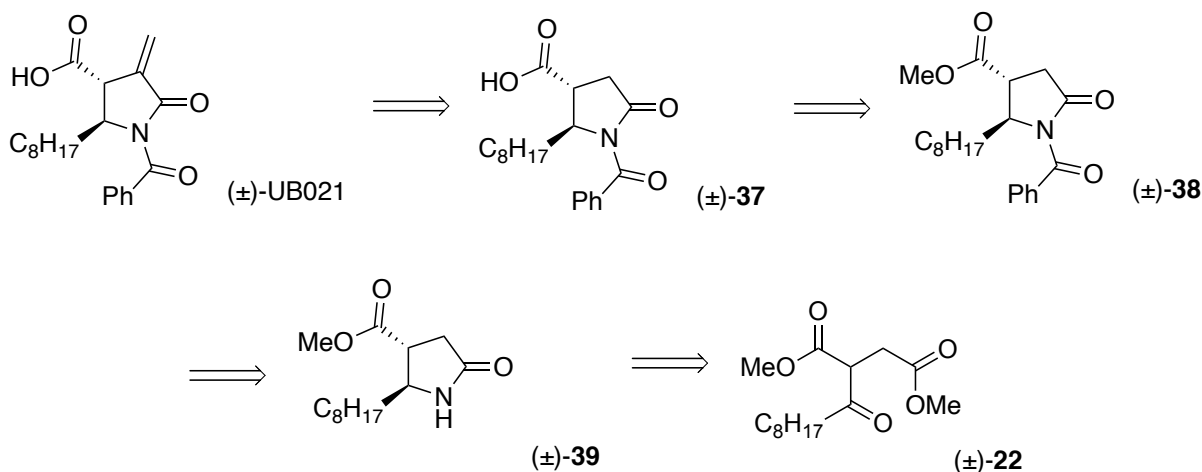


Figura 47. Estructura del nuevo derivado del C75 de tipo lactama.

4.2.2 Intento de síntesis del (±)-UB021

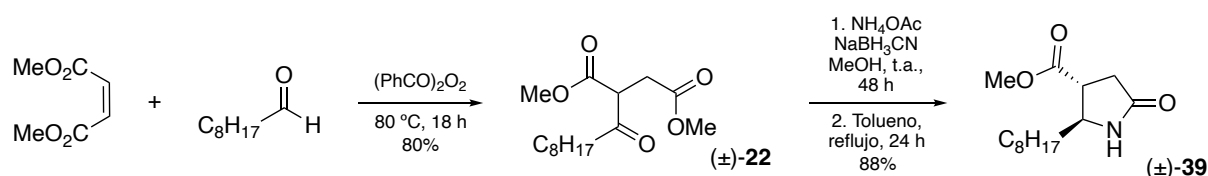
En el Trabajo de Final de Máster de la alumna Marta Font Feliu se abordó la síntesis del derivado (±)-UB012, ya mencionado en el capítulo anterior, como un agente citotóxico e inhibidor de la FAS. Durante la obtención del inhibidor, se aisló un intermedio avanzado [(±)-39] que nos podía servir para desarrollar la ruta sintética de la obtención del (±)-UB021.

Se propuso el análisis retrosintético que se muestra en el **Esquema 69**:



Esquema 69. Análisis retrosintético inicial de la obtención del (±)-UB021.

Suponíamos que el ácido (±)-37 era susceptible de ser metilenoado empleando alguna de las metodologías ya discutidas en apartados anteriores, pudiendo así obtener el derivado (±)-UB021. Este compuesto podría derivar de la lactama (±)-39. La cetona (±)-22 ya ha aparecido en apartados anteriores obtenida por condensación del nonanal con el maleato de dimetilo. La obtención de la lactama (±)-39 se muestra el **Esquema 70**:



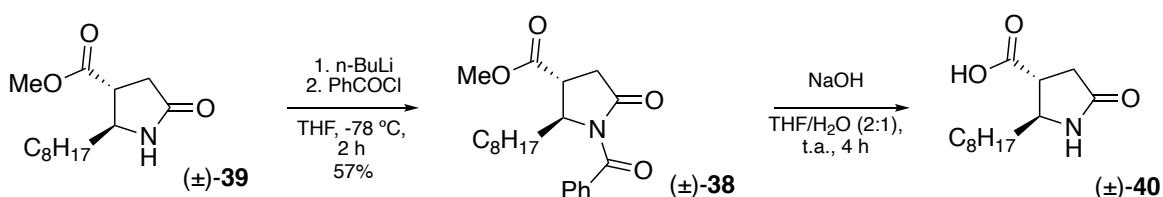
Esquema 70. Síntesis de la lactama (±)-39.

La condensación radicalaria del nonanal sobre malonato de dimetilo empleando $(\text{PhCO})_2\text{O}_2$ como iniciador conduce a la cetona (±)-22, como ya se describió en el apartado anterior (Apartado 1.1.2).

Para obtener la lactama deseada se debe introducir un enlace simple C-N en la estructura y una manera sencilla de hacerlo es una aminación reductiva. Se trata de una metodología sintética que permite la formación de una imina y su reducción *in situ*²¹⁰ empleando un agente reductor como el cianoborohidruro de sodio²¹¹. En este caso empleamos la sal NH_4OAc como fuente de NH_3 , obteniendo el compuesto deseado con

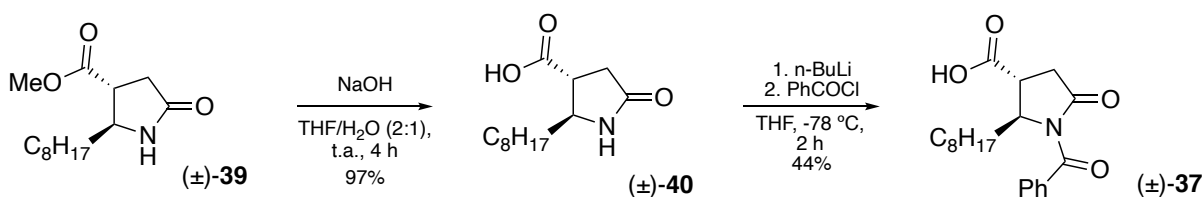
un elevado rendimiento tras la ciclación del amino diéster intermedio en reflujo de tolueno.

A continuación, tuvimos que decidir si realizar antes la hidrólisis del éster metílico o la benzoilación del nitrógeno y optamos por probar primero la benzoilación del nitrógeno. La transformación se llevó a cabo con rendimiento moderado empleando *n*-butil litio (*n*-BuLi) y cloruro de benzoilo (PhCOCl) a baja temperatura, pero cuando se intentó la hidrólisis selectiva del éster metílico no se obtuvo el producto deseado (**Esquema 71**) sino una mezcla compleja de compuestos. No obstante, pudimos determinar la presencia del compuesto (\pm)-**40**, producto de la hidrólisis del éster y el grupo benzoilo aunque en una cantidad tan baja que su cuantificación no fue posible.



Esquema 71. Benzoilación e intento de hidrólisis del éster metílico.

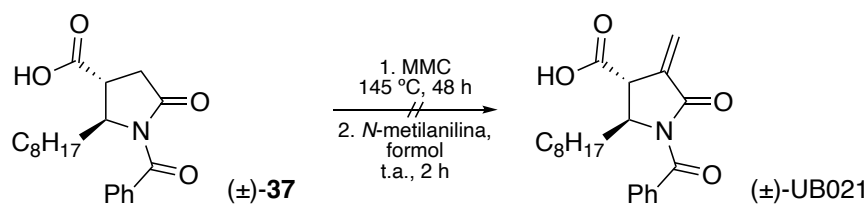
Decidimos entonces probar el orden inverso, realizando la benzoilación sobre el ácido, tal y como se muestra en el **Esquema 72**.



Esquema 72. Obtención del compuesto (\pm)-**37**.

De esta manera se pudo obtener satisfactoriamente el compuesto (\pm)-**37** sin problemas de regioselectividad en la benzoilación del nitrógeno en presencia del ácido carboxílico.

El último paso (y el más delicado) para la obtención del nuevo derivado de C75 era la metilación del ácido (\pm)-**37**. Se llevaron a cabo varios intentos mediante la metodología de Greene²⁰⁴ empleando MMC y formol (**Esquema 73**), pero desafortunadamente ninguna de las réplicas realizadas permitió la obtención del producto final.



Esquema 73. Intento de metilación del (\pm)-**37** con MMC.

El análisis del crudo de reacción por RMN permitió observar la presencia de ácido benzoico en la mezcla, fruto de la desprotección del nitrógeno durante las condiciones de reacción. No obstante, se observaron dos señales de tipo singulete a 6,26 y 5,80 ppm que podrían corresponder al metileno exocíclico del subproducto (\pm)-**37b** (Figura 48).

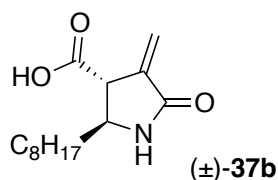


Figura 48. Posible estructura del subproducto obtenido durante la metilación del compuesto (\pm)-**36**.

A pesar de que el compuesto (\pm)-**37b** no era un objetivo inicial, se trataba de interés en sí mismo o como precursor en la síntesis del (\pm)-UB021 tras la benzoilación del nitrógeno. Sin embargo, a pesar de varios intentos de separación cromatográfica, no se consiguió aislar el producto.

Viendo que la integridad del grupo benzoilo se veía comprometida en las condiciones de reacción empleadas para la metilación, consideramos llevar a cabo la transformación empleando un tratamiento más suave, como el descrito en apartados anteriores con trifluoroacetilo de 2,2,2-trifluoroetilo y LiHDMS, que se lleva a cabo a baja temperatura.

Pero previamente realizamos un estudio de reactividad para comprobar si el hidrógeno en α de la lactama (\pm)-**37** era lo suficientemente ácido como para poder generar el enolato necesario para la metilación:



Esquema 74. Intento de enolización y deutерización de la lactama (\pm)-**37**.

Tras el tratamiento de la lactama con LiHDMS a -78 °C y adición posterior de D_2O al medio de reacción no se observó el intercambio del hidrógeno por deuterio en la estructura de la lactama por RMN. No obstante, se pudo observar la formación de la lactama desbenzoilada (\pm)-**40**.

Debe tenerse en cuenta que la pérdida del grupo benzoilo dificulta la formación del enolato, ya que debe desprotonarse un dianión. La formación de un intermedio con tres cargas negativas en una estructura tan pequeña (Figura 49) no debe ser fácil a bajas temperaturas.

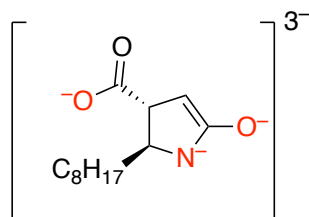


Figura 49. Intermedio con tres cargas negativas necesario para la obtención del subproducto (\pm)-**37b** cuya formación solo se ha podido comprobar indirectamente en la reacción con MMC a 145 °C.

En cualquier caso, el grupo benzoilo no resultaba lo suficientemente estable como para permitir la olefinación del compuesto. En este punto fuimos conscientes de que la obtención de cantidades suficientes del derivado (\pm)-UB021 no iba a ser posible en un tiempo razonable en el marco de esta tesis, por lo que decidimos redirigir nuestros esfuerzos hacia la síntesis del compuesto (\pm)-UB022.

4.3 Estudio de la actividad biológica del SC75

4.3.1 Resultados previos

Pese a ser un compuesto ya aislado y descrito en la literatura científica por Wang y col.¹⁸⁹, el estudio descrito de su actividad biológica se limita a la determinación de la inhibición *in vitro* de extractos proteicos enriquecidos en FAS. Los autores obtuvieron un IC_{50} de $2,56 \pm 0,13 \mu\text{M}$ para el derivado de azufre frente al valor del C75 que reportan en el artículo de $15,53 \pm 0,78 \mu\text{M}$.

Los resultados positivos en la inhibición de la FAS nos alentaron a explorar en mayor profundidad la actividad biológica del SC75 como agente citotóxico y como potencial inhibidor de la CPT1.

4.3.2 Estudio del (\pm)-SC75 como agente citotóxico

Estudiamos primero la capacidad citotóxica del derivado de azufre de C75 frente a la línea celular OVCAR-3, de cáncer de ovario.

Para ello, se cultivaron las células con concentraciones crecientes del inhibidor durante 3 días y se cuantificó la viabilidad celular en base al ensayo de MTT ya descrito en el capítulo 1. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 50**:

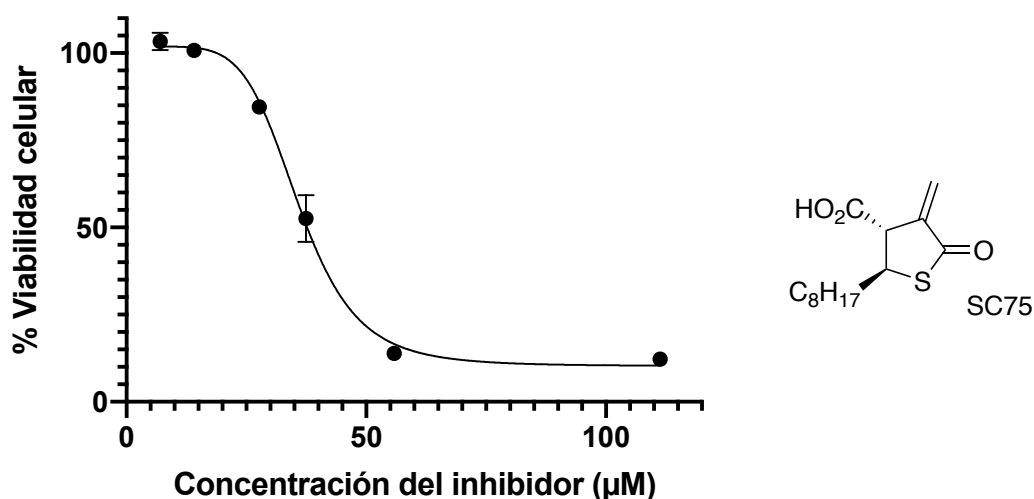
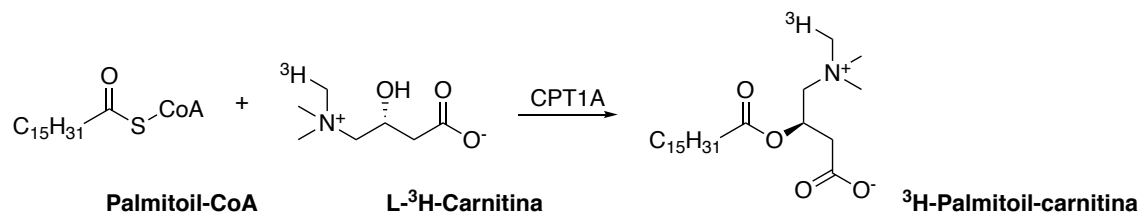


Figura 50. Efecto citotóxico del SC75 frente a las células tumorales OVCAR-3. Representación del % de viabilidad celular resultante del ensayo de MTT tras tres días de incubación con concentraciones crecientes del inhibidor. Cada ensayo se realizó por duplicado y el resultado se expresa como la media \pm S.E.M.

Se obtuvo un valor de IC_{50} de $36 \pm 2 \mu\text{M}$, superior al $21,8 \pm 3,9 \mu\text{M}$ del C75, reflejando que el compuesto presenta una actividad citotóxica algo menor.

4.3.3 Estudio del SC75 como inhibidor de la CPT1A

Para la determinación de la actividad de CPT1A se empleó el método radiométrico basado en la siguiente reacción (**Esquema 75**) que cataliza dicha enzima:



Esquema 75. Reacción de formación de la ³H-Palmitoil-carnitina catalizada por la CPT1.

El ensayo, descrito originalmente en el artículo de Morillas y col.,²¹² se basa en la cuantificación de la ³H-palmitoil-carnitina formada por la enzima CPT1A. La determinación de la concentración se puede realizar mediante la separación del producto, soluble en disolventes orgánicos, y posterior medición del centelleo producido por la desintegración radioactiva del tritio en el medio adecuado, que es directamente proporcional a la concentración de esta.

Para el ensayo se llevó a cabo la reacción con extractos de levaduras enriquecidos en CPT1A con concentraciones crecientes del inhibidor, obteniéndose los resultados representados en la **Figura 51**:

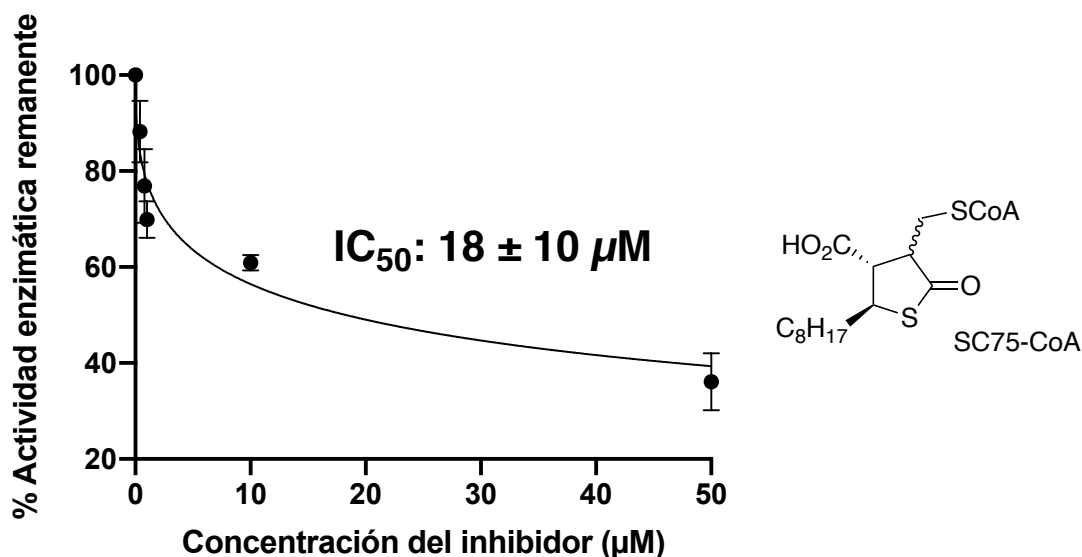


Figura 51. Efecto inhibitorio *in vitro* del SC75-CoA frente extractos proteicos enriquecidos en CPT1A. Representación del % de actividad enzimática remanente tras el ensayo a concentraciones crecientes de inhibidor. Cada ensayo se realizó por triplicado y el resultado se expresa como la media ± S.E.M.

Por desgracia, el valor de IC₅₀ obtenido fue de 18 ± 10 µM, muy por encima del valor de 1,1 ± 0,36 µM del C75-CoA.

4.4 Discusión de los resultados biológicos

4.4.1 SC75 como agente citotóxico

La actividad del inhibidor C75 como agente citotóxico resulta superior a la observada para su análogo tiolactónico, obteniéndose los valores de IC_{50} que se muestran en la **Figura 52**.

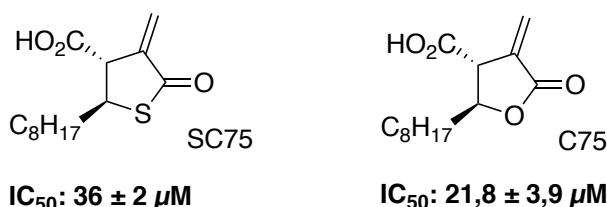


Figura 52. Estructura y valores del IC_{50} para la inhibición de la línea celular OVCAR-3 del SC75 y el C75.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en la inhibición *in vitro* de la FAS con extractos proteicos reportados por Wang,¹⁸⁹ donde el IC_{50} del SC75 es de $2,56 \pm 0,13 \mu M$ frente a los $15,53 \pm 0,78 \mu M$ del C75.

La diferencia con los resultados obtenidos en la línea celular puede ser debida a que los ensayos enzimáticos, aunque eficaces como primera aproximación al estudio de la actividad biológica de los compuestos, no son más que un modelo extremadamente simplificado respecto a estudios realizados con células vivas.

En primer lugar, el medio de reacción para un ensayo enzimático suele estar optimizado en términos de salinidad, concentración y pH para el correcto funcionamiento de la enzima y asegurar la estabilidad de los sustratos a estudiar. En contraposición, un ensayo *in vitro* con células no permite este nivel de ajuste y se trabaja con medios de cultivo (generalmente a un pH de 7,4) y con una fuerza iónica y concentraciones de los sustratos altamente variable.

Por otro lado, la inhibición de la enzima aislada ocurre con mayor facilidad, dado que la molécula no tiene que atravesar la membrana celular para llegar a su objetivo ni se ve sometida a procesos metabólicos que pueden provocar fluctuaciones incluso dentro de las réplicas del mismo ensayo bajo las mismas condiciones, algo que se acentúa incluso más por a la heterogeneidad inherente a las células cancerígenas.²¹³

Es precisamente el metabolismo de las células lo que puede explicar que la citotoxicidad del SC75 sea menor a la del C75. Como ya se ha descrito con anterioridad en este mismo capítulo, la mayoría de los compuestos sulfurados preparados durante los intentos de síntesis de los diferentes inhibidores han resultado ser lábiles a las condiciones de reacción empleadas, sobre todo cuando se sometían a transformaciones que ocurrían a pH no neutro.

Es posible que dicha inestabilidad más elevada de la tiolactona se traduzca en una metabolización más rápida del compuesto haciendo que su concentración efectiva real sea menor a la del C75, reportando así un valor de IC_{50} superior a lo esperado. No obstante, en el caso de querer demostrar esta hipótesis se debería estudiar la posible

degradación del compuesto en cultivos celulares. Para ello se podría realizar un ensayo de cuantificación del sustrato en el citosol por HPLC-MS tras haber incubado las células con el inhibidor a diferentes tiempos, y comparar los resultados con los del C75.

No obstante, como el objetivo principal de esta tesis era encontrar agentes citotóxicos más efectivos que el (±)-UB006, se descartó la continuidad del uso de derivados de azufre del C75 como potenciales agentes anticancerígenos.

4.4.2 SC75 como inhibidor de CPT1

También se estudió la capacidad inhibitoria del aducto SC75-CoA, la forma activa del SC75, frente a la CPT1A. Se comprobó que la actividad del nuevo derivado es significativamente inferior a la del C75-CoA, obteniéndose un valor de IC_{50} de $18 \pm 10 \mu\text{M}$ frente al $1,1 \pm 0,36 \mu\text{M}$.

En este caso, la diferencia de la actividad entre los dos compuestos no se ve afectada por factores como la capacidad de atravesar la membrana celular ni su estabilidad frente al metabolismo celular, por lo que podemos interpretar que seguramente la menor actividad del compuesto se deba a una peor interacción entre la enzima y el sustrato.

Ya que no se disponen de estudios de docking que permitan justificar esta hipótesis, se podría intentar realizar una prueba de estabilidad del compuesto tras someter al SC75-CoA a las condiciones del ensayo sin presencia de la enzima para estudiar si se produce una reducción significativa del compuesto que indique que no es estable en el medio, reduciendo de manera aparente su actividad.

De nuevo, como el objetivo planteado era explorar inhibidores de la CPT1A mejores que el C75, se decidió no continuar con los compuestos con azufre obtenidos.

5 Nueva aproximación sintética al UB207 y estudio de su actividad biológica

5.1 Síntesis del UB207

5.1.1 Precedentes bibliográficos

En su tesis doctoral, el Dr. Makowski desarrolló diferentes análogos del C75 donde el grupo ácido carboxílico variaba en su distancia al anillo de la lactona, dando lugar a los compuestos (±)-UB207 y (±)-UB244.

Como ya se ha descrito en la introducción, el estudio biológico de los aductos con coenzima A de los compuestos demostraron en estudios *in vitro* que el (±)-UB244-CoA era menos activo en la inhibición de la CPT1 en comparación con el C75-CoA, mientras que el (±)-UB207-CoA mejoraba un poco los resultados, tal y como se resume en la **Figura 53**.

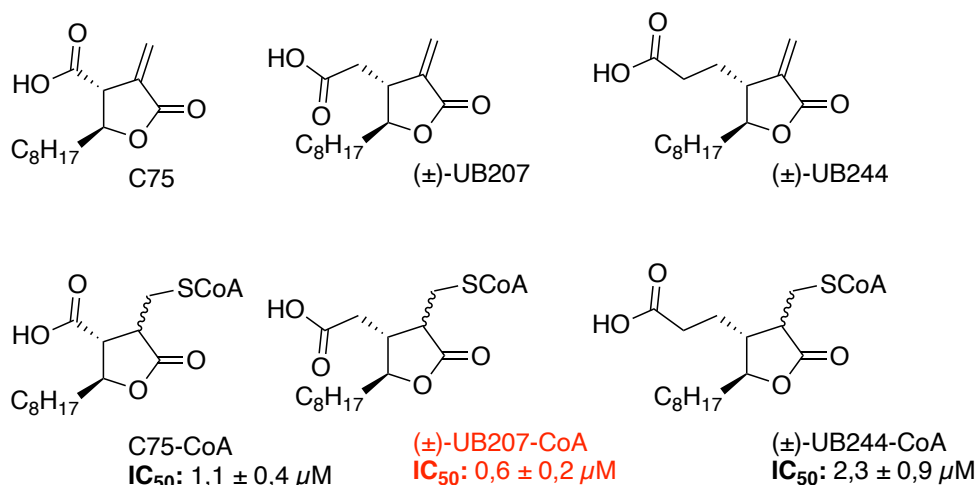
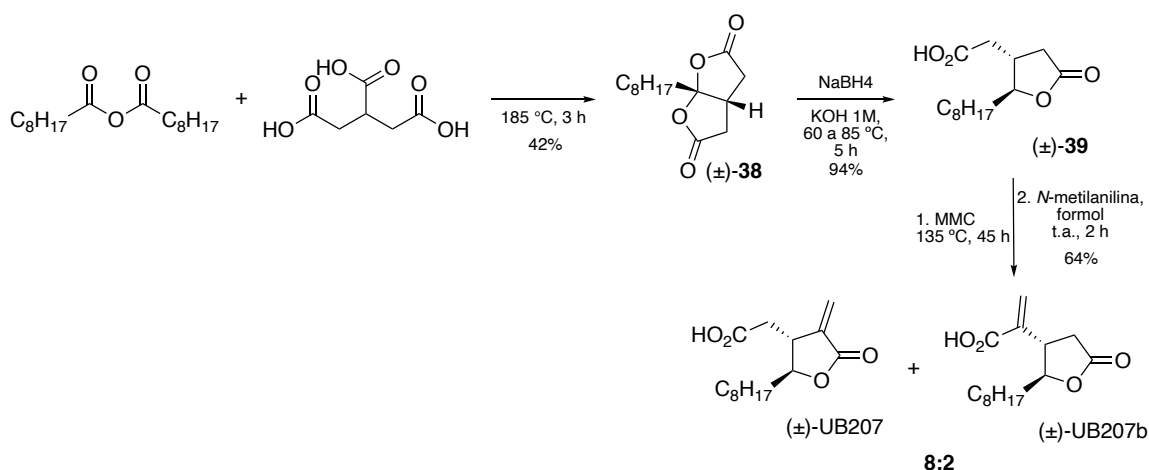


Figura 53. Estructura del C75 y de los dos derivados ácidos preparados en la tesis del Dr. K. Makowski y los valores de IC_{50} en la inhibición *in vitro* de la actividad CPT1 de sus formas -CoA.

El nuevo derivado UB207 se obtuvo originalmente en una ruta sintética que consta de solo 3 etapas, que se muestra en el **Esquema 76**:



Esquema 76. Obtención del (±)-UB207.

En el primer paso se obtiene el biciclo (±)-**12** a partir del anhídrido nonanoico y el ácido tricarbálico siguiendo el procedimiento descrito por Parker.²¹⁴ Mecánicamente se trata de una acilación descarboxilativa favorecida en las altas temperaturas alcanzadas en el medio de reacción que permiten obtener la *bis*-lactona de manera irreversible con un rendimiento razonable.

La siguiente etapa consiste en la reducción del grupo cetona (que se encuentra en **38** como cetal) y ciclación posterior *in situ* para formar la lactona (±)-**39**. Esta transformación se consigue por calentamiento a 85 °C del biciclo en una disolución acuosa 1M de KOH en presencia de NaBH₄, obteniéndose el compuesto deseado con un excelente rendimiento.

El último paso, y el más delicado de la síntesis, es la metilación empleando la metodología explicada con anterioridad donde el MMC es el agente activador de la posición α-carboxílica mediante la introducción de un grupo carboxílico. Este grupo favorece la reacción posterior con formaldehído en medio básico, que tras una eliminación intramolecular acaba generando un doble enlace exocíclico.

El problema de esta aproximación radica en la competencia de dos posiciones α-carboxílicas en la estructura del intermedio (±)-**39** susceptibles de ser metiladas, que dan lugar a los compuestos (±)-UB207 y (±)-UB207b tal y como se muestra en la **Figura 54**.

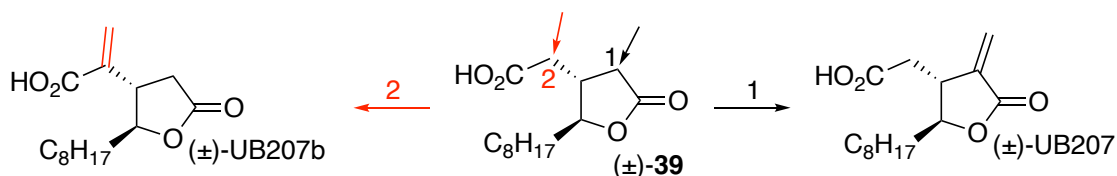


Figura 54. Metilación de (±)-**39**.

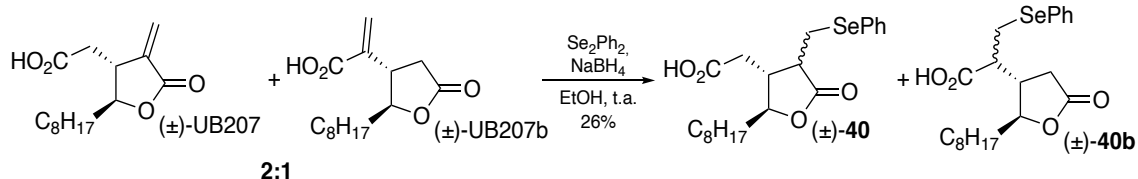
Teniendo en cuenta los resultados preliminares obtenidos en la inhibición de la actividad CPT1A con el (±)-UB207, encontrar un método de purificación era imperativo para poder llevar a cabo el estudio de la actividad biológica en mayor profundidad con modelos animales para analizar su capacidad de inhibición de la ingesta. Es por ello por lo que en

la primera parte de este capítulo se describirá la obtención del derivado puro y el intento de resolución de sus enantiómeros.

5.1.2 Intento de separación de la mezcla de productos

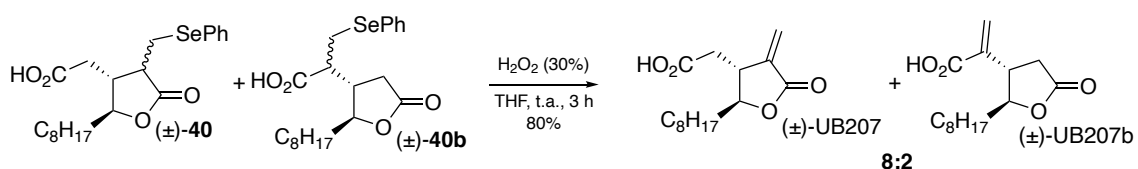
La ruta descrita (**Esquema 76**) pudo reproducirse, pero la posterior purificación del producto por cromatografía de columna en gel de sílice no fue posible. La alta polaridad del compuesto y la estabilidad del doble enlace exocíclico impidieron la separación satisfactoria del crudo de reacción.

Decidimos llevar a cabo la protección del metileno mediante la reacción del (\pm)-UB207 con Ph_2Se_2 y NaBH_4 para formar el selenoéter, tal y como ya se ha descrito en apartados anteriores. Los resultados se muestran en el **Esquema 77**.



Esquema 77. Protección del doble enlace del (\pm)-UB207 y (\pm)-UB207b en forma de selenoéter.

Se procedió entonces a la separación del crudo por columna *flash* en gel de sílice empleando una mezcla de DCM/MeOH de proporción 97:3 como eluyente. El análisis del espectro RMN de ^1H realizado de la fracción más pura obtenida parecía mostrar un enriquecimiento en el compuesto (\pm)-40 respecto al (\pm)-40b, pero tras la eliminación del grupo de selenio con H_2O_2 , se recuperó una mezcla de compuestos no muy diferente de la proporción original, tal y como se describe en el **Esquema 78**.

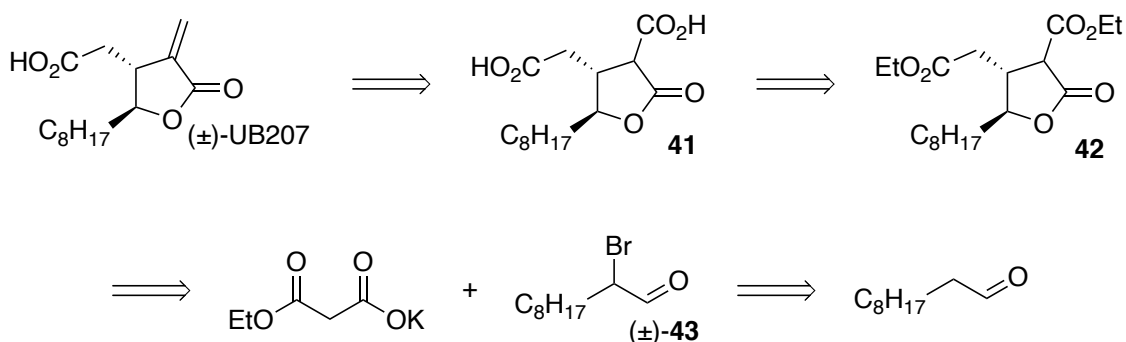


Esquema 78. Eliminación del selenoéter de la mezcla de compuestos.

No se realizaron más esfuerzos en la separación cromatográfica de ambos isómeros porque una ruta sintética alternativa que habíamos iniciado de forma paralela estaba dando resultados más prometedores.

5.1.3 Nueva aproximación sintética al (\pm)-UB207

Para la nueva síntesis del (\pm)-UB207 nos planteamos el análisis retrosintético que se muestra en el **Esquema 79**:



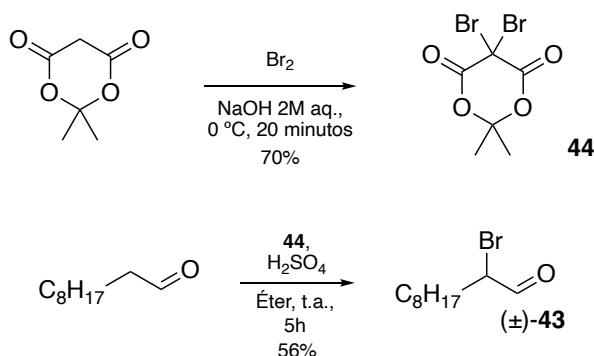
Esquema 79. Análisis retrosintético para la obtención del (±)-UB207.

El producto deseado derivaría de la metilación del intermedio (±)-**41**, el cual ya está funcionalizado con un grupo ácido carboxílico en la posición α de la lactona, lo que nos activaría esa posición para su reacción con el formaldehído y formar el producto deseado, sin los problemas de regioselectividad que el MMC involucra al existir dos posiciones α -carboxílicas.

El intermedio **41** se podría preparar a partir de la hidrólisis del diéster **42** que, a su vez, se podría sintetizar a partir de la condensación del etil malonato de potasio con 2-bromononanal en lo que sería la etapa clave de la propuesta sintética. Por último, el 2-bromononanal podría ser preparado a partir del decanal comercial mediante una bromación.

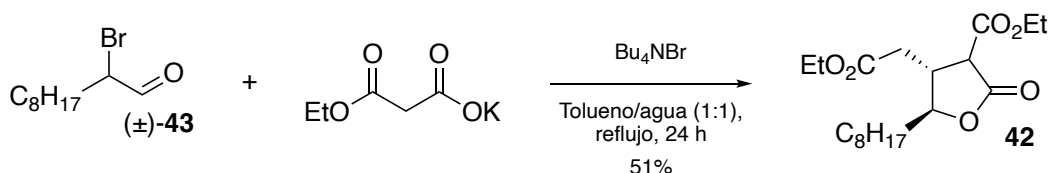
Para comenzar la síntesis tuvimos que elegir, en primer lugar, una metodología de bromación que nos permitiera obtener exclusivamente el compuesto (±)-**43**. La aproximación sintética más sencilla sería emplear bromo molecular (Br_2), pero en compuestos tan reactivos como los aldehídos se suelen obtener mezclas de productos di y tri-bromados. Para solventar este problema decidimos emplear la 5,5-dibromo-2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona, un compuesto menos reactivo que el Br_2 que nos permitiría obtener el compuesto deseado.

El agente halogenante se pudo preparar satisfactoriamente mediante la bromación en medio básico del ácido de Meldrum²¹⁵, empleando Br_2 en cantidades estequiométricas. Una vez aislado el sólido, se consiguió mono-bromar el decanal por la agitación de los reactivos en medio ácido en rendimiento aceptable siguiendo la metodología descrita por Bloch y col.²¹⁶ (**Esquema 80**).



Esquema 80. Síntesis del 2-bromodecanal.

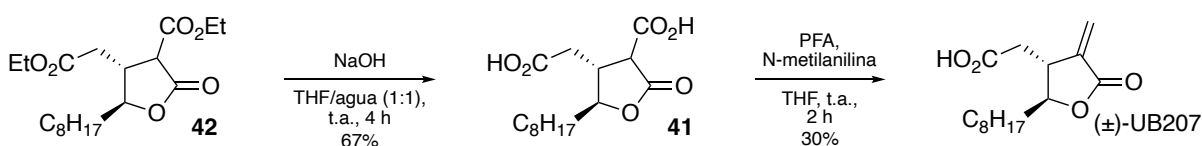
El siguiente paso fue la condensación del (\pm)-2-bromo-decanal recién preparado con el etil malonato de potasio empleando bromuro de tetrabutilamonio (Bu_4NBr) como agente de transferencia de fase, tal y como se describe en el artículo de Takashi Sakai y col.²¹⁷ (**Esquema 81**).



Esquema 81. Obtención de **42**.

Las condiciones de reacción permitieron obtener el compuesto deseado. El artículo original describe la estereoquímica *trans* respecto a las posiciones β y γ del ciclo y, aunque no hicimos una comprobación mediante experimentos bidimensionales de RMN, pudimos ver que los desplazamientos químicos de estos dos protones eran muy similares a los de la lactona (\pm)-**39**.

Finalmente, las últimas dos reacciones llevadas a cabo fueron la hidrólisis de los dos grupos éster etílico en medio básico y la formación del doble enlace exocíclico, que se consiguió mediante la reacción del intermedio con paraformaldehído en medio básico, tal y como se resume en el **Esquema 82**.



Esquema 82. Obtención del (\pm)-UB207.

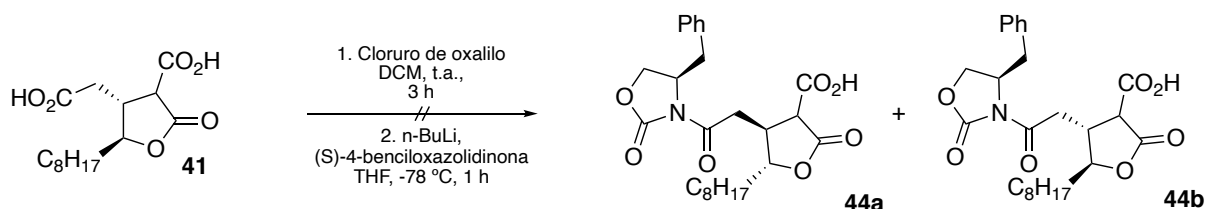
El estudio de las señales de ^1H y ^{13}C del RMN del crudo de reacción permitió determinar que el producto obtenido era el compuesto (\pm)-UB207 con su estereoquímica *trans*. La nueva aproximación sintética permitió la síntesis del inhibidor deseado con la pureza necesaria para la realización de su estudio farmacológico evitando la formación de la impureza (\pm)-UB207b, que podría interferir con los resultados.

5.1.4 Intento de separación de los isómeros

Como ya se ha comentado con anterioridad, los estereoisómeros del C75 presentan actividades biológicas diferentes. Por extrapolación al recién sintetizado derivado, pensamos que sería interesante realizar la resolución de los enantiómeros del (\pm)-UB207 para estudiar sus propiedades biológicas por separado.

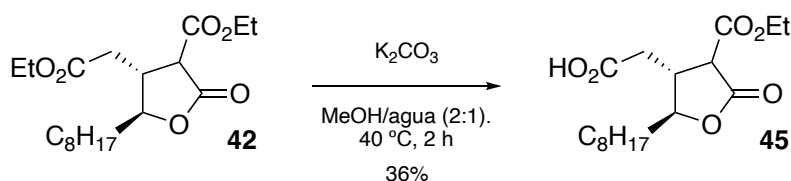
Para ello se abordó la síntesis de la amida de (\pm)-UB207 y un auxiliar quiral de Evans por acoplamiento con la (*S*)-4-benciloxazolidinona, con la esperanza de que las diferencias en las propiedades físicas de los diastereoisómeros formados permitieran separar por cromatografía de columna en gel de sílice.

Para la síntesis del compuesto, primero se trató **41** con un exceso de cloruro de oxalilo. Pese a tener un compuesto intermedio con dos grupos carboxílicos, se intentó realizar el acoplamiento del intermedio con un equivalente de (S)-oxazolidinona esperando que reaccionara preferentemente el cloruro de ácido de la cadena lateral al encontrarse menos impedido estéricamente. No obstante, tal y como se especifica en el **Esquema 83**, no se consiguió aislar el producto.



Esquema 83. Intento de síntesis de la amida de Evans del precursor del UB207.

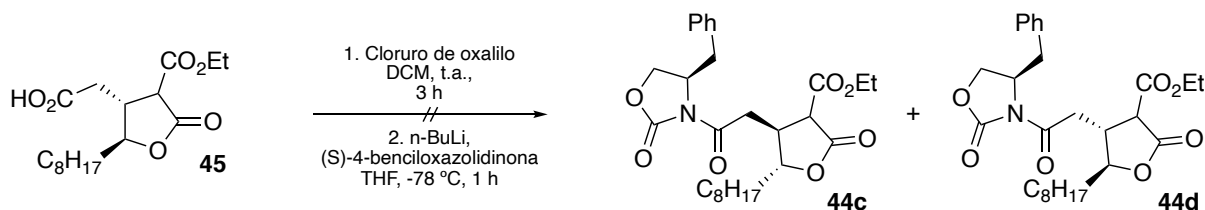
Presumiblemente, la presencia del otro grupo carboxílico presente en la estructura podría estar interfiriendo con la reacción de formación del enlace C-N, por lo que decidimos intentar hidrolizar selectivamente el éster etílico en la cadena lateral del intermedio **42** mediante su agitación en una mezcla de metanol y agua con K_2CO_3 como base suave (**Esquema 84**).



Esquema 84. Hidrólisis parcial de la lactona **42**.

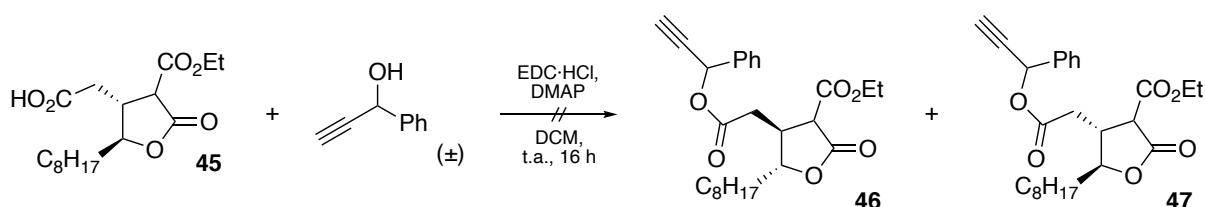
Para evitar la hidrólisis total de la molécula llevamos a cabo la monitorización de la reacción mediante cromatografía de capa fina. En los momentos iniciales se comprobó la formación del compuesto **45**, pero a partir de las 2 horas se observó la aparición de un segundo producto con un menor R_f , correspondiente a la lactona **41**. Es por ello por lo que la reacción se tuvo que detener anticipadamente y el rendimiento de la hidrólisis es relativamente bajo. No obstante, esta metodología permitió la hidrólisis selectiva del éster deseado.

Una vez aislado el producto se procedió al intento de derivatización del ácido carboxílico mediante su acoplamiento con la oxazolidinona quiral de Evans, pero tampoco se consiguió determinar la presencia de los productos esperados (**Esquema 85**).



Esquema 85. Intento de formación de la amida de Evans a partir del ácido **45**.

Viendo que la nueva aproximación tampoco daba resultados, se decidió intentar la síntesis de otro tipo de derivado mediante el acoplamiento del ácido carboxílico con el 1-fenil-prop-2-in-1-ol. La elección del fenilpropanol surge de la idea de realizar una resolución enzimática del compuesto, ya que estos grupos funcionales se han empleado con anterioridad para la separación de mezclas empleando lipasa de la *Candida antarctica* (Novozym 435), que es capaz de hidrolizar el enlace de tipo éster discriminando entre los diferentes enantiómeros.²¹⁸



Esquema 86. Intento de síntesis del derivado de fenilpropanol de la lactona 45.

Para la síntesis de los compuestos deseados se intentó la reacción del ácido **45** con el alcohol empleando EDC y DMAP como agentes de acoplamiento. Se decidió realizar la prueba con una mezcla racémica del fenilpropanol por su menor precio, y en caso de que la reacción funcionase realizar la síntesis con alguno de sus estereoisómeros puros que son comerciales. No obstante, pese a los diferentes intentos llevados a cabo, no se consiguió la formación de los compuestos **44c** y **44d**, como se refleja en el **Esquema 86**.

Estos resultados negativos en la funcionalización del monoéster **45** podían estar relacionados con una escala de trabajo de pocos miligramos fácilmente sensible a trazas de humedad, aunque se tomaron las precauciones razonables.

Este hecho, sumado al tiempo limitado disponible para la realización de los estudios farmacológicos hicieron que decidiéramos realizar las pruebas biológicas con la mezcla racémica del UB207, y en caso de obtener los resultados esperados, continuar con los intentos de resolución de la mezcla de enantiómeros para el estudio de sus enantiómeros por separado.

5.2 Estudio de la actividad biológica del (±)-UB207

5.2.1 Resultados previos

Durante su trabajo experimental, el Dr. Makowski estudió la actividad biológica del (±)-UB207-CoA obteniendo un valor de IC_{50} para la inhibición *in vitro* de la actividad de CPT1A de $0,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$, un valor inferior al reportado por el C75-CoA, de $1,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$. Aunque se asumió que los buenos resultados obtenidos se debían exclusivamente al (±)-UB207-CoA, no se podía ignorar que la metodología empleada para su obtención producía mezclas no resueltas del compuesto deseado y el subproducto (±)-UB207b, por lo que era primordial la obtención del inhibidor sin impurezas presentes en la mezcla para estudiar si la actividad biológica de la mezcla era completamente atribuible al UB207 o si la impureza estaba afectando de alguna manera.

5.2.2 Estudio *in vitro* de inhibición de la actividad CPT1A

Lo primero que hicimos fue llevar a cabo el ensayo de inhibición *in vitro* con extractos de levaduras enriquecidos en mitocondrias con expresión de CPT1A mediante el método radiométrico descrito con anterioridad en el **Apartado 4.3.3**.

Para ello se dejó reaccionar una cantidad constante de proteína con diferentes concentraciones de (±)-UB207-CoA empleando el medio de reacción adecuado. La ^3H -palmitoil-carnitina formada por la CPT1A se extrajo de la mezcla y se cuantificó mediante la medición del centelleo provocado por el tritio en el disolvente adecuado. Los valores se expresan como porcentaje de actividad enzimática remanente y han sido calculados en base a cuantificación de ^3H -palmitoil-carnitina aislada del medio de reacción con extractos mitocondriales sin inhibidor. Los resultados se muestran en la **Figura 55**:

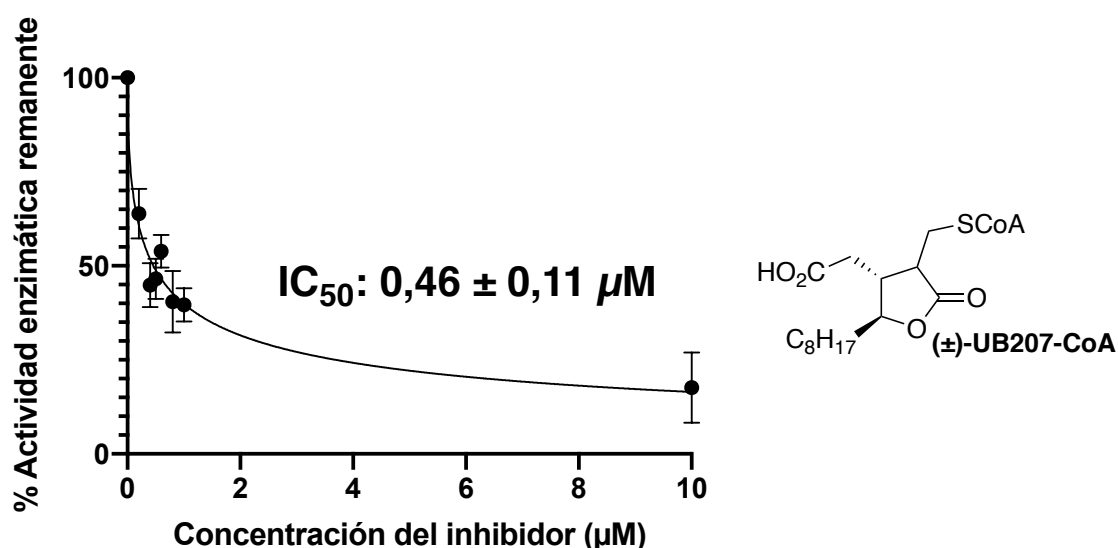


Figura 55. Efecto inhibitorio *in vitro* del (±)-UB207-CoA frente extractos mitocondriales enriquecidos en CPT1A. Representación del % de actividad enzimática remanente tras el ensayo a concentraciones crecientes de inhibidor. Cada ensayo se realizó por triplicado y el resultado se expresa como la media \pm S.E.M.

Se obtuvo un valor de IC_{50} de $0,46 \pm 0,11 \mu M$, por debajo incluso del (+)-C75-CoA con un IC_{50} , $0,68 \pm 0,21 \mu M$ y ligeramente inferior a la mezcla de productos probada por Kamil, que reportó un valor de $0,6 \pm 0,2 \mu M$.

5.2.3 Estudio sobre la ingesta y el peso en roedores tras la administración central del (\pm)-UB207

Se realizó un estudio de los efectos sobre la ingesta y el peso en ratones con la cepa de ratones aquí también tras la administración ICV del compuesto (\pm)-UB207. Para ello se hicieron 3 grupos distintos; un grupo tratado con (+)-C75 como control positivo, otro con (\pm)-UB207 y un grupo de control al que solo se inyectó vehículo cada uno de ellos con 8 animales.

Los animales se estabularon a su llegada en una sala con el ciclo de luz-oscuridad de 12 horas cambiado, de forma que su oscuridad comenzaba a las 9 AM, y se dejaron durante 4 semanas en adaptación antes de empezar con el experimento.

Para la administración central del compuesto se tuvo que realizar una intervención en los ratones en la cual se les introdujo una cánula en el cerebro, concretamente en el tercer ventrículo, de manera que los compuestos administrados pudiesen llegar al núcleo arcuato del hipotálamo, con el que conecta, y actuar sobre las neuronas AgRP y NPY encargadas de la regulación del apetito.

Basándonos en experimentos realizados con anterioridad, decidimos realizar una sola administración de $3 \mu L$ de los inhibidores a una concentración de $30 \mu M$, dosis que fue suficientemente alta para estudiar los efectos del (+)-C75 sobre la ingesta.

Los resultados muestran en la **Figura 56**, donde se encuentra representada la ingesta acumulada, obtenida por pesada del pellet, a 1, 2, 3, 4 y 24 horas.

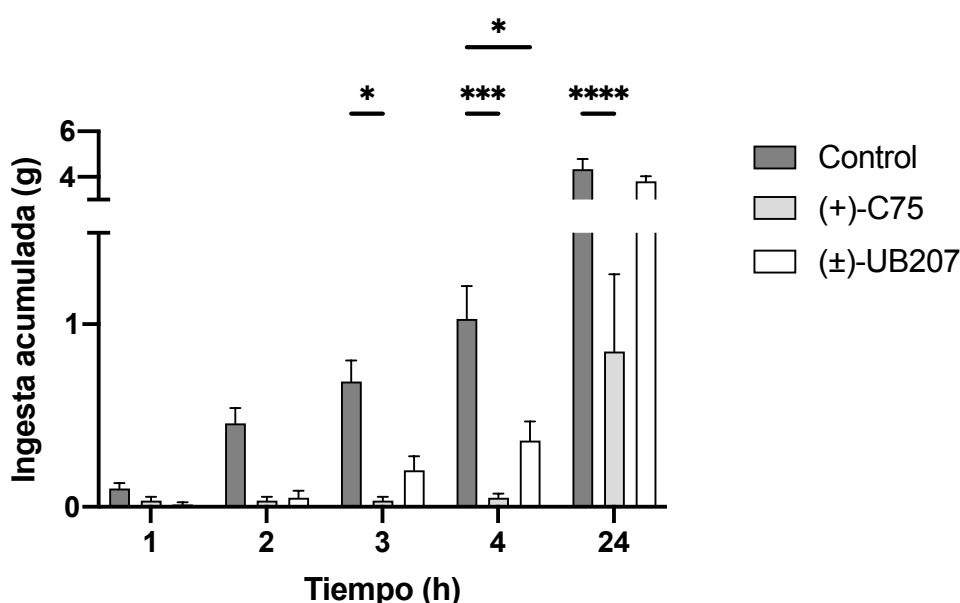


Figura 56. Ingesta acumulada a distintas horas. Las medidas se realizaron tras la inyección ICV de $3 \mu L$ de vehículo, (+)-C75 y (\pm)-UB207 $30 \mu M$ media hora antes del inicio de su ciclo de actividad. $n = 8$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$.

En el caso del (+)-C75 se puede ver que la diferencia con el grupo control empieza a ser significativa a partir de las 3 horas y se mantiene hasta las 24 horas. En contraposición, el efecto del (\pm)-UB207 comienza a ser estadísticamente significativo a partir de las 4 horas y los ratones han recuperado su apetito normal a las 24 h. Además, los efectos del (+)-C75 son más acusados en todas las horas registradas.

En lo referente al peso, se midieron los cambios a las 24 horas, comprobándose una disminución de más de 2 gramos de media en el caso de los ratones tratados con el (+)-C75, pero sin diferencias significativas en el caso del (\pm)-UB207, tal y como se muestra en la **Figura 57**:

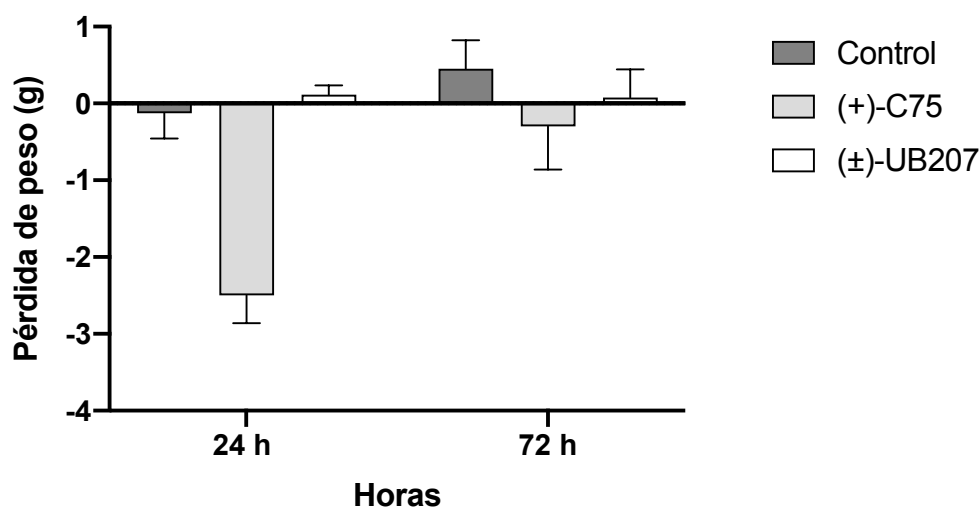


Figura 57. Variación del peso medio en los diferentes grupos de ratones tras 24 h y 72 h. Se representan los valores individuales (puntos) y la media de cada grupo (barras). $n > 6$. ****: $p < 0,0001$.

Se puede observar también que los ratones tratados con el (+)-C75 recuperan los valores de peso medio iniciales a los 3 días de la inyección. Paralelamente, el peso de los animales a los que se les ha administrado (\pm)-UB207 no cambia significativamente durante el experimento.

5.2.4 Estudio sobre la ingesta y el peso en roedores tras la administración intraperitoneal del (\pm)-UB207

El siguiente experimento consistió en estudiar las diferencias entre los compuestos tras su administración intraperitoneal (IP) con una doble finalidad; comprobar la capacidad de las moléculas de cruzar la barrera hematoencefálica e inhibir la CPT1 hipotalámica, y analizar los efectos sistémicos que los compuestos pueden tener a nivel de otros órganos como el hígado o el tejido adiposo marrón (BAT). Dado que la administración IP es menos invasiva que la administración central, se decidió alargar la duración del experimento y realizar 3 administraciones IP de los compuestos. Esto nos permitiría analizar si el (\pm)-UB207, que es capaz de reducir la ingesta, tiene la capacidad de reducir el peso de los roedores tras ser administrado de una manera continuada.

El diseño experimental consistió en la administración de una dosis de 15 mg/kg de ratón durante 3 días consecutivos media hora antes del inicio de la fase oscura, que es la fase de actividad de los roedores. Los animales se pesaron durante 3 días consecutivos a las 12 horas de la inyección, así la cantidad de pellet ingerida por los mismos, tal y como se ilustra en la **Figura 58**:

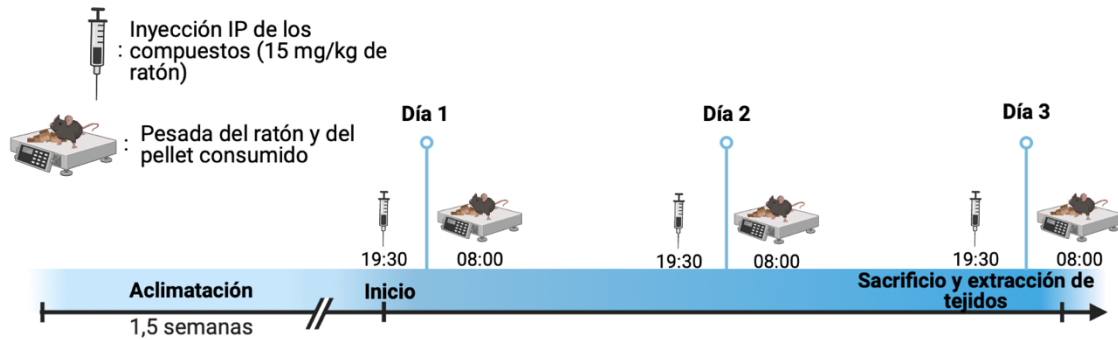


Figura 58. Representación gráfica del diseño experimental para el estudio de los efectos de los compuestos tras su administración IP.

De nuevo, se dispuso de 3 grupos diferentes: el grupo control y los tratados con (+)-C75 y (±)-UB207, cada uno de ellos con 8 animales. Los resultados obtenidos para la ingesta de pellet se encuentran representados en gramos y se muestran en la **Figura 59**:

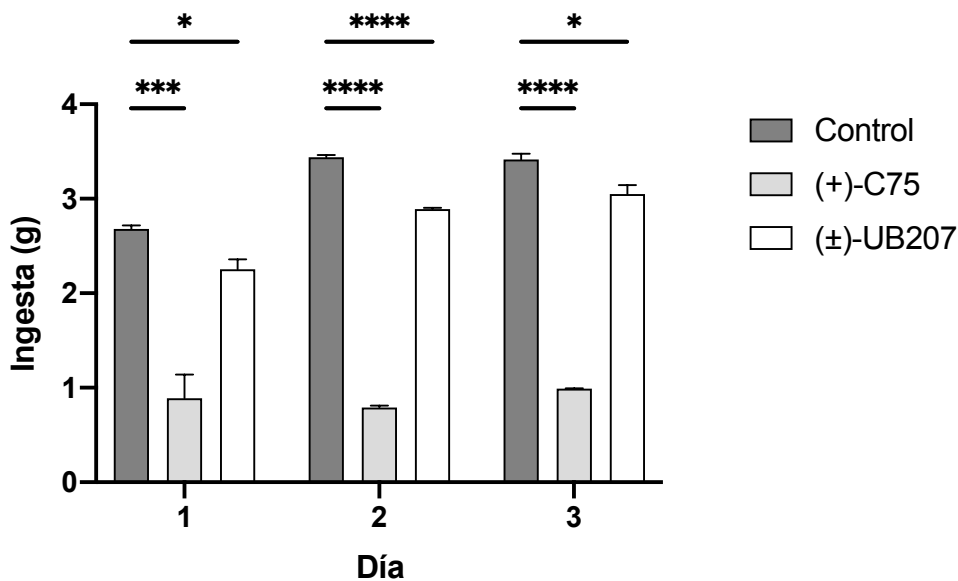


Figura 59. Ingesta media de los ratones medida 12 h tras la administración intraperitoneal de vehículo, (+)-C75 y (±)-UB207 (15 mg/kg ratón en los 3 días de duración del experimento). La inyección de los compuestos se realizó media hora antes del inicio del tiempo de actividad de los roedores. $n > 6$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$.

Se comprobó que la administración IP de los compuestos era capaz de producir una reducción significativa de la ingesta de los roedores tanto con el (+)-C75 como con el (±)-

UB207, demostrando que las moléculas son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y ejercer su efecto a nivel hipotalámico.

Comparando los dos inhibidores podemos comprobar, de nuevo, que los efectos del (+)-C75 son más drásticos que los registrados para el (±)-UB207. No obstante, cabe destacar que, durante la realización del experimento, se observó que los animales tratados con el (+)-C75 presentaban signos de malestar (piloerección y encorvamiento), y se encontraron restos de heces líquidas en el lecho de las jaulas cosa que no ocurría con el compuesto (±)-UB207.

Cuando se analizó el cambio de peso en los roedores durante la duración del experimento el resultado fue similar (**Figura 60**):

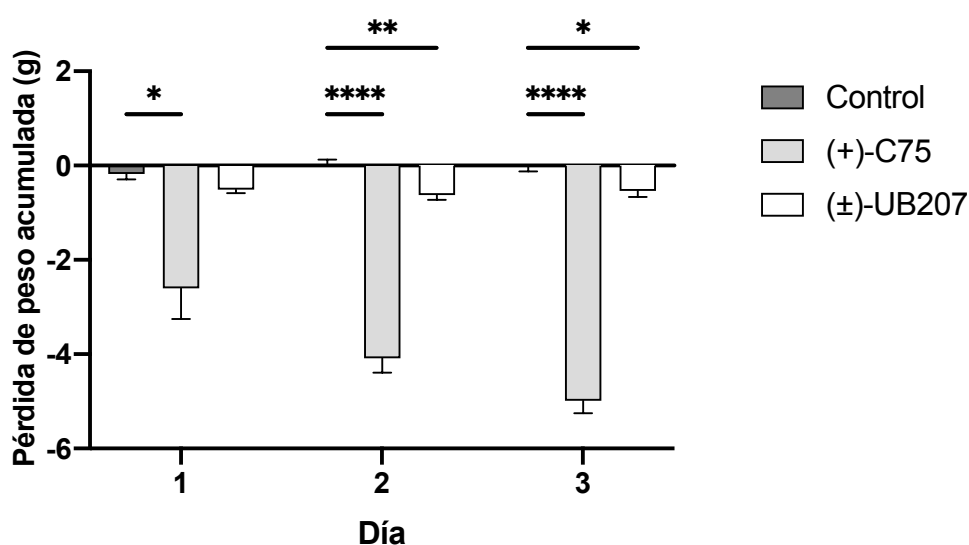


Figura 60. Variación acumulada del peso de los roedores medidos durante 3 días consecutivos a las 12 h de la administración intraperitoneal de; vehículo, (+)-C75 y (±)-UB207 (15 mg/kg de ratón). La inyección de los compuestos se realizó media hora antes del inicio del tiempo de actividad de los roedores. $n > 6$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$.

Las diferencias entre el grupo control y los animales tratados son estadísticamente significativas desde el segundo día para el (±)-UB207 y desde el primero para el (+)-C75. La administración de este último, además, supuso una drástica reducción media del peso de los roedores de más de 5 g a día 3 del experimento, aproximadamente un 20% del peso inicial. Por otro lado, la pérdida de masa corporal inducida por el (±)-UB207 fue de menos de 1 g.

A pesar de esta menor reducción del peso de los ratones se pudo observar que, contrariamente a lo observado con la administración central del inhibidor, la administración IP del (±)-UB207 fue capaz de reducir el peso de los ratones y mantener esta pérdida durante la duración del experimento.

5.2.5 Estudio de la expresión génica tras la administración intraperitoneal del (\pm)-UB207

A pesar de que nos hemos centrado en los efectos hipotalámicos de la inhibición de la CPT1A y el papel que estos ejercen sobre la ingesta, es interesante también conocer qué sucede a nivel periférico y estudiar cómo estas moléculas pueden afectar a diferentes tejidos.

Como ya se ha descrito en la introducción, la CPT1 existe en diferentes isoformas llamadas CPT1A, CPT1B y CPT1C. La primera se expresa mayoritariamente en tejidos lipogénicos como el hígado y tejidos adiposos blancos de ratones y la CPT1B se encuentra principalmente en tejidos con una mayor tasa de oxidación de ácidos grasos como el músculo esquelético o el tejido adiposo marrón (BAT).

Por último, la CPT1C, última en ser descubierta, se encuentra en el retículo endoplasmático y además, es exclusiva del cerebro y testículos.

Teniendo en cuenta que los derivados de C75 no presentan especificidad en la inhibición de las isoformas de la enzima, era interesante estudiar el efecto que estos podían provocar sobre el hipotálamo, hígado y el tejido adiposo marrón.

Ya conocemos que los efectos macroscópicos de los inhibidores sobre el hipotálamo se manifiestan en forma de una reducción del apetito por parte de los animales a los que se les administran los compuestos, pero un estudio de la expresión génica de este órgano permitiría profundizar en el mecanismo de acción de este tipo de moléculas y los efectos que pueden causar sobre el metabolismo celular.

5.2.5.1 Hipotálamo

En primer lugar analizamos cómo los inhibidores afectan a los niveles de RNA mensajeros de genes implicados en la ingesta, metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos en hipotálamo.

Los resultados obtenidos se encuentran representados en la **Figura 61** en forma de cambio relativo de los niveles de mRNA respecto al gen constitutivo *Rpl7*:

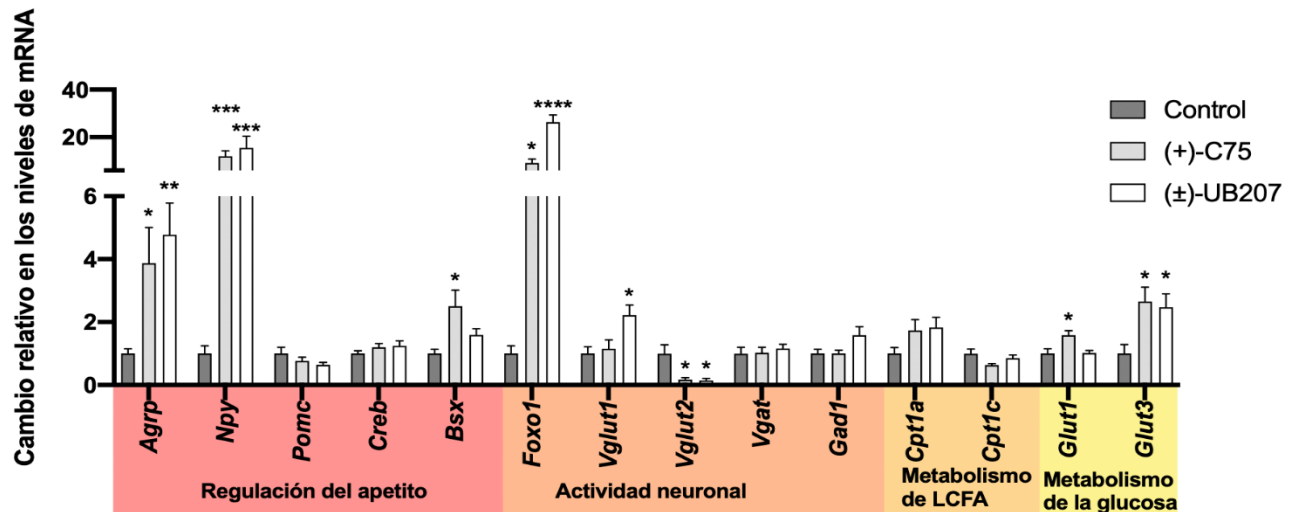


Figura 61. Cambios en los niveles de mRNA normalizados con el gen constitutivo *Rpl7* en el hipotálamo. $n > 6$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$.

Se encontró un aumento significativo de la expresión de los neuropéptidos orexigénicos *Agrp* y *Npy* así como de factores de transcripción, como el *forkhead-box* O1 (*Foxo1*) y el *homeobox* específico de cerebro (*Bsx*) en el caso del (+)-C75, que activan la transcripción de los neuropéptidos orexigénicos.^{219,220} Por otro lado, no se encuentran cambios significativos en los niveles de mRNA de *Pomc*, relacionada con la saciedad,³⁴ ni de del *cAMP response element-binding protein* (*Creb*). Todo ello lleva a pensar que los ratones activan la expresión de los genes orexigénicos como efecto rebote a una disminución de la ingesta causada por la acción de los inhibidores.

Respecto a las proteínas relacionadas con la actividad neuronal se encontró un aumento significativo de los niveles de mRNA del transportador vesicular de glutamato 1 (*Vglut1*) por el (±)-UB207. Esta proteína juega un papel importante en el intercambio sináptico de glutamato, un importante neurotransmisor, y su expresión se relaciona con la capacidad de adaptar la comunicación neuronal en respuesta a estímulos, lo que se conoce como plasticidad neuronal.²²¹ No obstante, encontramos el efecto contrario en los niveles del transportador de glutamato 2 (*Vglut2*), que difiere en su distribución en el cerebro respecto al *Vglut1*,²²² que se encuentran disminuidos en las neuronas de ratones tratados con ambos inhibidores. Dado que *Glut2* es el transportador más abundante en las neuronas del ARC, su aumento sugiere una mayor actividad sináptica. Por último, podemos observar que no hubo cambios significativos en el transportador vesicular del ácido gamma-aminobutírico (*Vgat*), responsable del transporte neuronal del neurotransmisor inhibitorio que se encuentra en neuronas GABAérgicas,²²³ además tampoco se vieron cambios en la ácido glutámico descarboxilasa 1 (*Gad1*), enzima responsable de la síntesis del mencionado neurotransmisor.²²⁴

Continuando con los niveles de mRNAs de genes involucrados en vía metabólica de la oxidación de ácidos grasos estudiamos la expresión de las isoformas de la *Cpt1a* y *Cpt1c*, sin encontrarse diferencias significativas respecto al grupo de control.

Por último, se estudiaron los niveles de mRNAs de los transportadores de glucosa 1 y 3 (*Glut1* y *Glut3*) cuya función es la captación de la glucosa por las neuronas a través de la membrana celular. En este caso encontramos diferencias entre los dos compuestos; el *Glut3*, con una afinidad por la glucosa menor,²²⁵ se encuentra aumentado en el hipotálamo de los roedores tratados con ambos compuestos, mientras que los niveles de expresión del *Glut1* solo se ven afectados en el caso del (+)-C75, lo que sugiere una captación de glucosa aumentada en este tratamiento.

5.2.5.2 Hígado

El siguiente tejido que se analizó fue el hígado. Se conoce que la CPT1A se encuentra ampliamente expresada en el hígado, y se ha comprobado que su silenciamiento mediante micro-RNA favorece la aparición de la enfermedad de hígado graso no alcohólico en modelos animales,²²⁶ atribuyéndole efectos negativos a la inhibición de la enzima en este órgano. En cambio, estudios realizados por nuestro grupo han mostrado que su sobreexpresión revierte la obesidad en ratones.²²⁷

Teniendo en cuenta que no se dispone de estudios sobre la distribución del C75 o de sus derivados en el organismo, se consideró importante estudiar el efecto que la administración de los inhibidores de CPT1 tiene sobre el hígado y determinar si existía la aparición de algún efecto secundario indeseado sobre el órgano.

Con este fin se eligió estudiar los niveles de mRNAs de diferentes genes relacionados con el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos. Los resultados obtenidos se encuentran representados en la **Figura 62**:

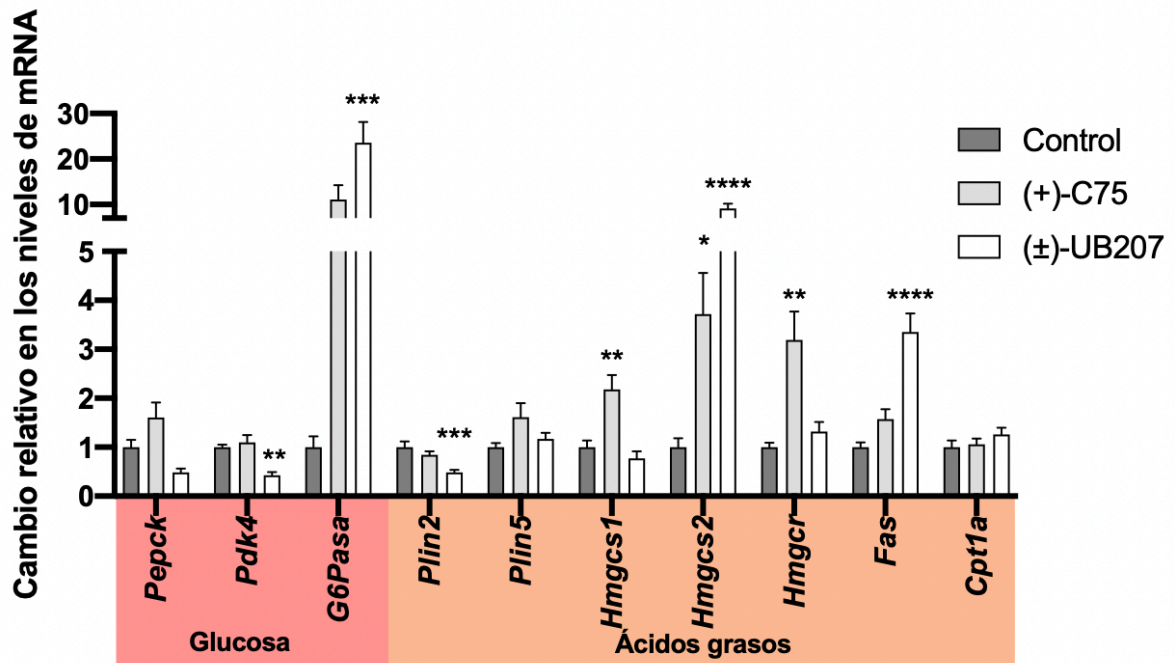


Figura 62. Figura 63. Cambios en los niveles de mRNA relativos al gen constitutivo (*Ppia*) en el hígado. $n = 7-8$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$.

En los ratones tratados con el (\pm)-UB207 se encontró un cambio significativo de los mRNAs de los genes relacionados con el metabolismo de la glucosa celular. Así, se analizaron los niveles de mRNA la piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (*Pdk4*), enzima que disminuye la actividad de la piruvato deshidrogenasa encargada de transformar el piruvato en acetil-coA para su ingreso al ciclo de Krebs y posterior producción de energía a partir de la glucosa. Los niveles de mRNA de este gen resultaban disminuidos indicando un aumento de la transformación de piruvato en acetil-CoA y con ello un aumento de la glucólisis. Por otro lado, se encontró un marcado aumento en los niveles de mRNA de la Glucosa-6-fosfatasa (*G6Pasa*) que cataliza la conversión de la glucosa-6-fosfato en glucosa libre en la última etapa de la síntesis de glucosa o gluconeogénesis. Y, por último, no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*Pepck*), enzima clave en la gluconeogénesis que cataliza la conversión del oxalacetato a fosfoenolpiruvato.

En el estudio de los genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos se vio una disminución en los niveles de perilipina 2 (*Plin2*), proteína involucrada en la regulación del almacenamiento de grasas celulares mediante la estabilización de las gotas lipídicas al unirse a ellas. En cambio, los niveles de la perilipina 5 (*Plin5*) no se ven afectados por los compuestos.

Por otro lado, el estudio de los niveles de mRNA de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 1 y 2 (*Hmgcs1* y *Hmgcs2*), que son enzimas relacionadas con la biosíntesis del colesterol y formación de cuerpos cetónicos respectivamente, reveló que ambos compuestos aumentaban significativamente los niveles de mRNA de *Hmgcs2* indicando un aumento en la vía de formación de cuerpos cetónicos. Los niveles de mRNA de la proteína *Hmgcs1* solo aumentaron con el tratamiento con el (+)-C75 que junto con los aumentos de los niveles de mensajeros de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, enzima clave de la síntesis de colesterol sugiere una activación de la vía de síntesis *de novo* de colesterol.

Por último, se estudiaron los efectos de los inhibidores sobre la FAS, enzima ya descrita ampliamente en apartados anteriores que se encarga de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, encontrando que el nuevo inhibidor (\pm)-UB207 aumentaba significativamente su expresión en el hígado.

5.2.5.3 Tejido adiposo marrón (BAT)

Nuestro experimento concluyó con el análisis del tejido adiposo marrón. Cuando se realizó la extracción del tejido de los animales se observó una gran diferencia en el tamaño del BAT entre los 3 grupos de ratones; los animales que fueron administrados con los inhibidores redujeron considerablemente su tamaño, siendo el caso del (+)-C75 el que manifestaba un mayor cambio. No obstante, en ambos casos se pudo comprobar visualmente la disminución de los niveles de grasa (**Figura 64**).

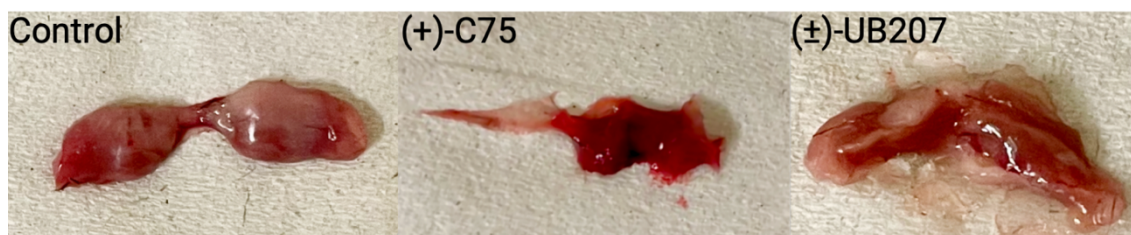


Figura 64. BAT extraído de un ratón de cada grupo del experimento. De izquierda a derecha: grupo control, y ratones tratados con (+)-C75 y (±)-UB207.

Tras haber comprobado que los inhibidores de la CPT1 habían provocado una disminución de las grasas en el BAT, decidimos realizar un estudio más profundo de la expresión de diferentes genes involucrados en la regulación de este tejido para intentar determinar si la pérdida de peso provocada por los compuestos podía ocurrir mediante la activación de la termogénesis en este tejido.

Los resultados se muestran en la **Figura 65**:

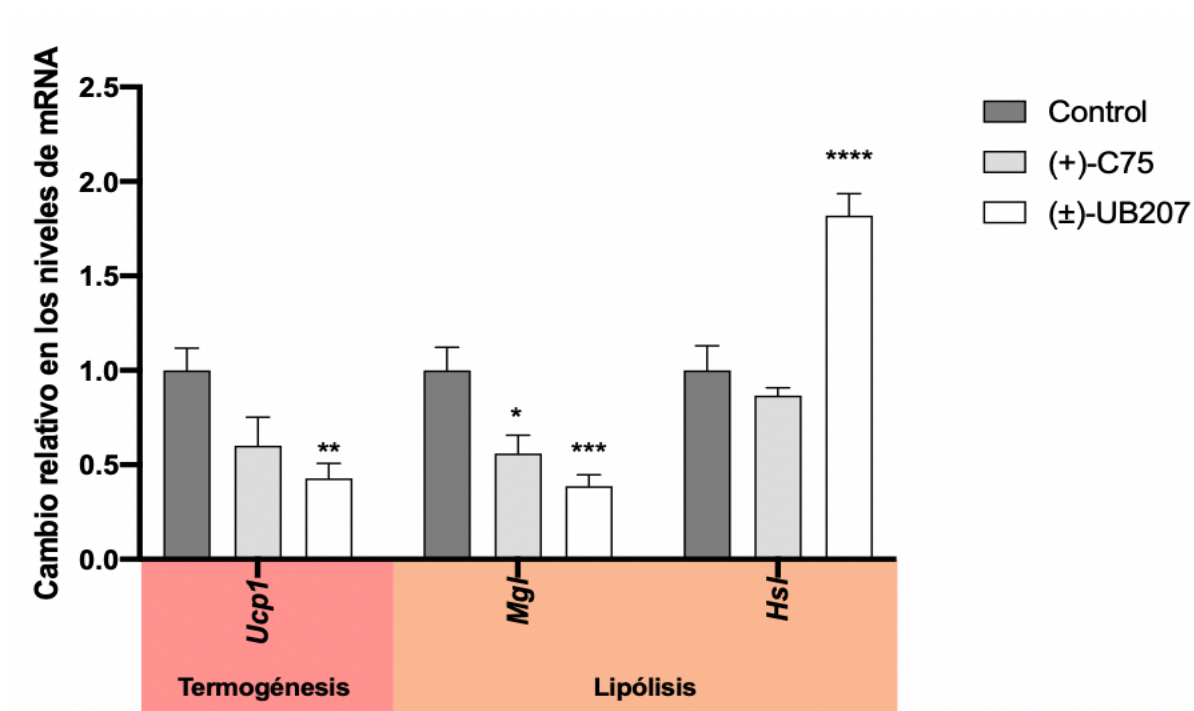


Figura 65. Cambios en los niveles de mRNA normalizados con el gen constitutivo (*Hprt1*) en el BAT. $n = 7-8$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$.

El primer gen analizado fue el correspondiente a la *Ucp1*. Encontramos una disminución significativa de los niveles de mRNA en los ratones tratados con (±)-UB207. Lo que sugiere que la termogénesis no estaría activada a pesar de la disminución en el tamaño y adiposidad observada en el BAT tal como muestra la **Figura 64**.

Las otras dos proteínas estudiadas fueron la monoglicerol lipasa (MGL) y la hormona sensible a lipasa (HSL) dos enzimas clave en la degradación de lípidos en todos los tejidos. La HSL y la MGL catalizan la liberación de ácidos grasos de los triglicéridos. Los niveles de mRNA para *Hsl* están aumentados con el tratamiento con el inhibidor (±)-UB207, sin

embargo, este inhibidor disminuye los niveles de mRNA de *Mgl* sugiriendo que la hidrólisis de triglicéridos no sería total.

5.3 Discusión de los resultados biológicos

5.3.1 (\pm)-UB207 como inhibidor *in vitro* de la CPT1

El (\pm)-UB207 muestra la mejor actividad como inhibidor *in vitro* de la CPT1 hasta la fecha en la familia de derivados del C75 sintetizados. La única diferencia estructural que existe entre las dos moléculas es la distancia del grupo ácido carboxílico al ciclo de la lactona (Figura 66).

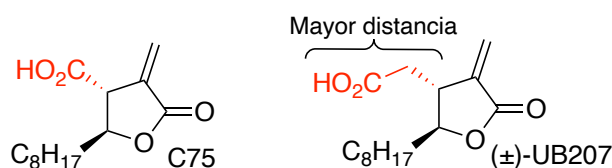


Figura 66. Comparación entre las estructuras del C75 y del (\pm)-UB207 donde se remarca la mayor distancia entre el ácido carboxílico y la lactona en el caso del segundo.

Como ya se ha descrito en la introducción, actualmente no se dispone de la estructura cristalizada de la proteína para poder realizar el diseño óptimo de inhibidores. No obstante, se ha realizado el estudio de *docking* de la estructura del C75-CoA en un modelo bioinformático de la CPT1A, que, aunque limitado, permite la obtención de información útil sobre la interacción entre la molécula y la enzima. Este estudio reveló que el inhibidor ocupaba el espacio destinado a la L-carnitina, y que además el ácido carboxílico interactuaba con el residuo de histidina 473, responsable de la actividad catalítica de la proteína. Se pudo comprobar, además, que el bolsillo era de un tamaño lo suficientemente grande como para albergar grupos más voluminosos,⁶³ lo que llevó a la síntesis de los derivados (\pm)-UB079 y (\pm)-UB001 de menor actividad que el C75.

Es posible que la mayor distancia existente entre la lactona y el -COOH favorezca el mejor aprovechamiento del espacio destinado al sustrato de la enzima, generando una mayor proximidad y mejor interacción entre el grupo carboxílico y la histidina catalítica, que resulte en la mejor inhibición del (\pm)-UB207 respecto al C75. No obstante, estas afirmaciones no dejan de ser especulativas.

5.3.2 (\pm)-UB207 como inhibidor de la ingesta

El estudio sobre la ingesta realizado mediante la administración ICV del (\pm)-UB207 y el (+)-C75 en ratones ha permitido comprobar que ambos compuestos causan una reducción significativa sobre la ingesta, aunque el efecto causado por el (+)-C75 es mucho más pronunciado. El mismo efecto se pudo comprobar tras la administración IP de los compuestos, que provocó una disminución significativa de la ingesta a partir del primer día del experimento y se mantuvieron los efectos hasta el final.

Una posible explicación a la diferencia de efecto de ambos inhibidores de la actividad CPT1 podría ser la mayor dificultad de formación del aducto -CoA, que ocurre

espontáneamente a nivel hipotalámico tras la administración del compuesto. Sin embargo, durante la síntesis *in vitro* del (\pm)-UB207-CoA no apreció ninguna diferencia entre este y el C75-CoA por lo que probablemente la cinética de formación del aducto -CoA no sea responsable de la diferencia sobre su actividad biológica.

Por otro lado, descartamos la posibilidad de problemas de internalización del (\pm)-UB207-CoA por las neuronas, ya que la variación estructural que supone la introducción de un grupo -CH₂- no debería afectar tan significativamente a las propiedades de distribución del compuesto comparado con el C75.

Finalmente, la teoría que nos parece más plausible es la posibilidad de que los efectos tóxicos del C75 contribuyan decididamente al acusado descenso en la ingesta de los roedores, debido al malestar generado por la administración del compuesto. Durante el desarrollo del experimento se pudo comprobar que los ratones tratados con el (+)-C75 presentaban signos de malestar animal como la piloerección y encorvamiento y, además, se encontraron restos de heces líquidas en el lecho de las jaulas, algo ya descrito con anterioridad en la literatura.^{142,143}

Esto podría ser una explicación también para el hecho de que la administración central única del (+)-C75 provocara un descenso de 3 gramos de media en los roedores tratados y del 20% del peso corporal en los ratones a los que se les administró el compuesto por vía IP.

Esta disminución, aunque puede estar favorecida por los efectos sobre la ingesta del inhibidor de CPT1 a nivel hipotalámico, es posible que se deba en gran medida a la deshidratación de los ratones provocado por la disentería en los ratones, hipótesis que se ve reforzada por la recuperación del peso de los roedores a los 3 días de la administración.

Actualmente no tenemos estudios suficientes para saber si la toxicidad del (+)-C75 es debida a propio compuesto o a algún metabolito generado tras la administración del compuesto. Un posible candidato podría ser la estructura, ya descrita por Kamil, del (\pm)-MLC2 (**Figura 67**) que se obtiene tras la internalización del doble enlace de la estructura del C75.

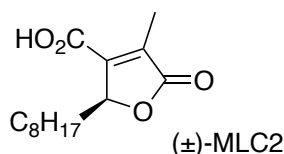


Figura 67. Estructura química del (\pm)-MLC2, surgida de la isomerización del doble enlace del C75.

La actividad farmacológica de este compuesto se estudió *in vitro*, comprobando que carecía de actividad inhibitoria de la CPT1, pero no se realizó ningún estudio en modelos animales con el compuesto. Un posible experimento para analizar si la toxicidad del C75 surge de la formación de este compuesto, sería realizar la inyección central del (\pm)-MLC2 a los ratones y medir si existe también una disminución de la ingesta y el peso, que no vendría dada por la inhibición de la CPT1, si no por efectos secundarios no deseados.

5.3.3 Efectos del (\pm)-UB207 sobre la expresión génica en los tejidos

5.3.3.1 Hipotálamo

El análisis realizado qRT-PCR del hipotálamo relevó que los ratones tratados con los inhibidores de CPT1 tenían niveles de expresión mucho más altos de los neuropéptidos AgRP y NPY, así como del factor de expresión FoxO1 que regula la biosíntesis de estas moléculas.

Debe considerarse la posibilidad de que estos niveles no sean consecuencia directa de la inyección de las moléculas, si no un resultado indirecto. Se conoce que la administración central de este tipo de compuestos provoca un descenso de la ingesta por inhibir la expresión de estos neuropéptidos, pero para realizar esta comprobación se debe sacrificar a los animales a las pocas horas del tratamiento de los ratones.

Es muy posible que, al aislarse los tejidos tras 12 horas de la última inyección, los ratones hayan recuperado los niveles de expresión de CPT1A normales, y las neuronas compensen la falta de nutrientes de las últimas horas con un aumento en los niveles de señalización del apetito, algo que también se ha podido observar en roedores sometidos a un régimen de ayuno.^{35,228}

Por otro lado, se encontró que los niveles de *Vglut2* se encontraban disminuidos en el tejido de los roedores tratados con ambos compuestos. Esta enzima se encarga del transporte neuronal de glutamato, el neurotransmisor más importante en el núcleo arcuato del hipotálamo donde se expresan las neuronas AgRP y NPY.²²⁹ Es posible que el ayuno inducido farmacológicamente por los inhibidores inyectados en los ratones produjera una disminución en los niveles de expresión de la proteína, atenuando la activación de estas neuronas.

Hay que tener en cuenta a la hora de analizar los resultados que los niveles de RNA mensajero de una proteína son una buena aproximación al estudio de la expresión de proteínas en los tejidos, pero puede no corresponderse con los niveles reales de proteína ya que el mRNA tiene un tiempo de vida limitado en el citosol y fuera de esa ventana puede arrojar resultados contrarios.

No puede descartarse que, de haber sacrificado a los animales antes, se hubieran observado el aumento significativo como respuesta del organismo a la inhibición de la enzima.

Por último, se encontró un aumento en los niveles de *Glut3* el, en el hipotálamo de los roedores tratados con ambos compuestos, mientras que los niveles de expresión del *Glut1* solo se ven afectados en el caso del (+)-C75. Muy probablemente el ayuno inducido por la inhibición de la CPT1A en el hipotálamo haya provocado un aumento en los niveles de los transportadores de la glucosa en las neuronas para compensar la falta de nutrientes sufrida por los ratones.

5.3.3.2 Hígado

En los genes relacionados con el metabolismo de la glucosa en hígado se encontró una disminución en los ratones tratados con el (\pm)-UB207 de los niveles de *Pdk4*, así como

un marcado aumento en los niveles de mRNA de la *G6Pasa* que convierte la glucosa-6-fosfato en glucosa libre. Por último, no se observaron cambios significativos en los niveles de la *Pepck*, enzima clave en la gluconeogénesis. Estas evidencias en conjunto sugieren una mayor exportación de glucosa a la sangre por parte del hígado, que puede no estar mediada por una síntesis *de novo* de glucosa, mediante la activación de otras vías no estudiadas como la degradación del glucógeno hepático.

El estudio de los genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos permitió comprobar la disminución en los niveles de perilipina 2 (*Plin2*), proteína involucrada en la regulación del almacenamiento de grasas celulares mediante la estabilización por su unión a las gotas lipídicas en el citosol, lo que hace pensar que en los roedores tratados con el (±)-UB207 existe una mayor movilización de los ácidos grasos y una disminución de gotas lipídicas.

Además, el estudio de los niveles de las enzimas relacionadas con la biosíntesis del colesterol reveló que ambos compuestos aumentaban significativamente los niveles de mRNA de *Hmgcs2*, encargada de la síntesis de cuerpos cetónicos y que estaría de acuerdo con una mayor movilización de los ácidos grasos provenientes de las gotas lipídicas. Por otro lado, solo el (+)-C75 provocó un aumento significativo sobre la *Hmgcs1* y la *Hmgcr*, poniendo de manifiesto que solo en los ratones tratados con este inhibidor se podría promover un aumento en la síntesis de colesterol en el hígado.

Por último, se estudiaron los efectos de los inhibidores sobre la FAS, enzima ya tratada ampliamente en apartados anteriores que se encarga de la biosíntesis de ácidos grasos, encontrando que el nuevo inhibidor (±)-UB207 aumentaba significativamente su expresión en el hígado, sugiriendo que la degradación y la síntesis de ácidos grasos se podría dar a la vez. La degradación tendría el fin de proporcionar energía para el hígado y promover formación de cuerpos cetónicos para dar energía al resto de tejidos y la síntesis proporcionaría los ácidos grasos suficientes para las estructuras de las membranas celulares ricas en colesterol y otros lípidos.

El conjunto de estos resultados indica que el tratamiento con (±)-UB207 activaría genes implicados en la movilización y síntesis de ácidos grasos, así como la exportación de glucosa por parte del hígado. En cambio, el (+)-C75 tendría el mismo efecto sobre la vía de la glucosa, pero lleva asociado un aumento en la biosíntesis del colesterol y no parece activar la transcripción de FAS para la síntesis de ácidos grasos.

5.3.3.3 Tejido adiposo marrón

El último tejido en estudiarse fue el BAT, donde esperábamos ver activación de la lipólisis y termogénesis. Por un lado, encontramos que los niveles de mRNA de la *Ucp1*, encargada de la generación de energía calorífica por disipación del gradiente de protones en la mitocondria, no se encontraban aumentados e incluso eran menores en el caso de los ratones tratados con (±)-UB207.

No obstante, tal y como hemos comentado en este apartado, correlacionar los niveles de mRNA con la cantidad total de proteína puede llevar a error, y muy probablemente en caso de realizarse una cuantificación de la proteína total en el tejido mediante un western blot, se podría apreciar un aumento en los niveles de *Ucp1*.

Por otro lado, el tratamiento de los ratones con (\pm)-UB207 aumentó significativamente los niveles de *Hsl* mientras que los de *Mgl* se encontraban disminuidos, sugiriendo una hidrólisis parcial de los triglicéridos en el tejido adiposo marrón.

En resumen, el estudio de la actividad del (\pm)-UB207 ha permitido concluir que se trata de un buen inhibidor de CPT1 con efectos sobre la ingesta y el peso de los roedores cuyos efectos se mantienen en el tiempo. Comparado con el (+)-C75 los efectos del nuevo inhibidor son menos agresivos, permitiendo un descenso del peso más sostenible y controlado, además de no manifestar los efectos adversos observados con el C75.

Un posible experimento para continuar explorando la capacidad terapéutica del (\pm)-UB207 sería estudiar si en ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasas y azúcares la administración diaria del nuevo inhibidor sería capaz de mejorar su condición metabólica y facilitar la pérdida de peso corporal.

Por otro lado, el estudio del hipotálamo ha permitido comprobar que el (+)-C75 y el (\pm)-UB207 han provocado cambios en el mismo sentido, demostrando que el mecanismo de acción del (\pm)-UB207 es análogo al del (+)-C75. Ambos inhibidores afectan a las neuronas del hipotálamo mostrando unos niveles aumentados de neuropéptidos orexigénicos como el AgRP y NPY compatibles con un efecto rebote o adaptativo a un estado de ayuno prologando en los roedores por efecto de estos inhibidores.

A nivel hepático se ha podido observar que las moléculas aumentan la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol, así como la exportación de glucosa por el hígado. No obstante, no hemos determinado si se trata de efectos directamente provocados por la administración de los compuestos o si es la respuesta adaptativa al estado de baja energía que se ha inducido en los ratones.

Por último, se intentó analizar si la pérdida de peso de los roedores podía estar acentuada por la activación de la termogénesis en el BAT a través de la inhibición de la CPT1A hipotalámica. Para ello se estudiaron genes relacionados con la hidrólisis de los triglicéridos y *Ucp1*. Los resultados obtenidos sugieren que no existe activación de la termogénesis en el tejido y, solo en el caso del (\pm)-UB207, se encuentra un aumento de la degradación no completa de los triglicéridos. No obstante, estos resultados surgen de la interpretación de los valores de mRNAs de unas proteínas reguladas por diferentes mecanismos. Para obtener una visión más completa de lo que está ocurriendo en el tejido se podría llevar a cabo la cuantificación total de la proteína y medidas de la actividad enzimática.

En general, se ha podido determinar los efectos en el organismo de los roedores tras su recuperación de la administración de los inhibidores de la CPT1. No obstante, si se quiere profundizar en el mecanismo de acción de las moléculas y el efecto directo que estas moléculas tienen sobre los tejidos, se debería realizar el sacrificio de los animales en las primeras horas tras la inyección para que los niveles de mRNA sean una medida más precisa del nivel de expresión de los genes estudiados.

Paralelamente, se podrían llevar a cabo ensayos de actividad de las enzimas involucradas en las rutas metabólicas y cuantificar los niveles de proteína mediante western blot para corroborar los resultados.

6 Desarrollo de un nuevo ensayo de determinación de actividad de la CPT1

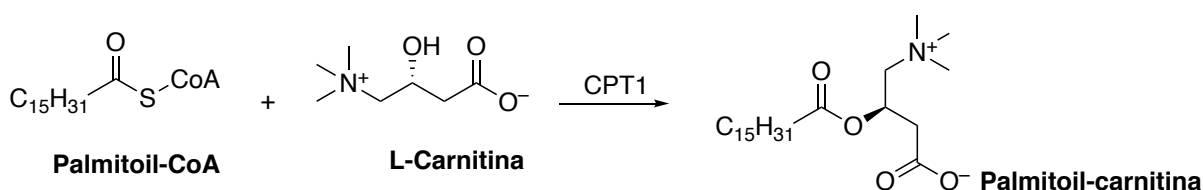
6.1 Determinación de la actividad de CPT1 *in vitro*

6.1.1 Precedentes bibliográficos

En los capítulos anteriores de la presente memoria se ha puesto de manifiesto la importancia de la determinación de la actividad de la CPT1, tanto para el estudio de su papel biológico y efectos a nivel celular, como para el diseño y evaluación de nuevos moduladores enzimáticos (activadores o inhibidores).

Para poder determinar la actividad enzimática se debe monitorizar la desaparición del sustrato o la formación del producto. Dependiendo de la naturaleza de las moléculas involucradas se pueden emplear técnicas para analizar la variación en la concentración, como la determinación espectrofotométrica, la titulación (ácido/base o redox) o incluso la electroforesis.²³⁰⁻²³³

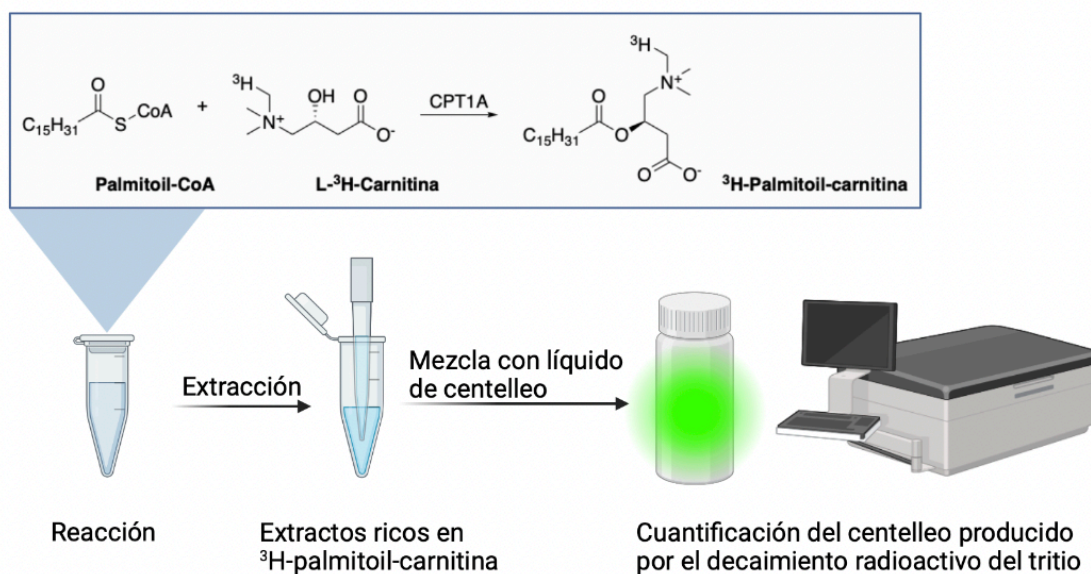
En el caso de la CPT1 la reacción catalizada es la transformación del palmitoil-CoA en palmitoil-carnitina (**Esquema 87**).



Esquema 87. Reacción de formación de la palmitoil-carnitina catalizada por la CPT1.

Pero tal y como se puede deducir de la estructura de los compuestos involucrados en la reacción, ninguno de ellos absorbe en el UV-Visible y la cuantificación indirecta implicaría la derivatización o la titulación de alguna de las moléculas, que se encuentran formando parte de una matriz compleja que tendría que resolverse previamente.

Una forma de analizar la actividad CPT1 es la utilización de L-carnitina marcada con tritio mediante el método radiométrico como se describe en el artículo de Morillas y col.²¹² La principal ventaja del método radica en la posibilidad de separar los compuestos aprovechando la diferente solubilidad de la L-³H-Carnitina, soluble en agua, y la ³H-Palmitoil-carnitina que es soluble en disolventes orgánicos. La cuantificación del producto formado se lleva a cabo por la medición del centelleo (radiación beta) producido por el decaimiento radioactivo del tritio presente en la estructura del producto en el disolvente adecuado, tal y como se muestra gráficamente en el **Esquema 88**.



Esquema 88. Determinación de la ³H-Palmitoil-carnitina formada por la CPT1A mediante medidas del centelleo producido por el decaimiento radioactivo del tritio.

Cuando la reacción se lleva a cabo en las mismas condiciones (pH, temperatura, cantidades de reactivos...) y el mismo tiempo, la cuantificación del centelleo producido por la ³H-palmitoil-carnitina permite estimar la actividad de la CPT1 y ha sido el método de elección para los estudios realizados por nuestro grupo hasta la fecha por su fiabilidad y buenos resultados obtenidos.

No obstante, esta aproximación presenta una serie de problemas asociados al uso de material radioactivo.

La primera desventaja es la capacidad limitada de adquisición y almacenamiento de L-³H-carnitina, cuya disponibilidad comercial ha disminuido en los últimos años y cuya estabilidad radioactiva y química limitan notablemente la vida útil del compuesto, así como los límites impuestos por la normativa vigente en la cantidad de material radioactivo que se puede adquirir.

Por otro lado, encontramos la gestión de los residuos, que al pertenecer a una categoría de alto riesgo biológico requieren un tratamiento específico y aislado de los residuos convencionales para su correcta eliminación, lo que encarece enormemente los costes del ensayo.

Por último, y no por ello menos importante, se encuentran los riesgos asociados a la exposición de material radioactivo por parte de los operadores, que, aunque se ven enormemente reducidos mediante la formación obligatoria recibida por la UB, no deja exponer al usuario a pequeñas dosis de radiación con los peligros para la salud que ello conlleva.

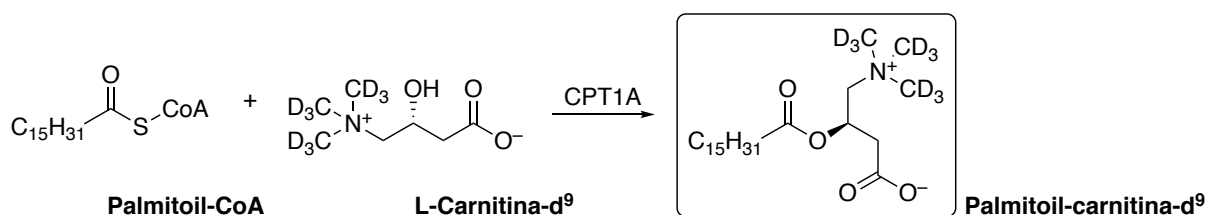
Es por todo esto por lo que se decidió desarrollar un nuevo método no radiométrico para la determinación de la actividad de la enzima.

6.1.2 Marcaje isotópico no radioactivo

En los últimos años han aparecido múltiples artículos donde se ha empleado la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS) en el estudio y desarrollo de nuevos inhibidores.²³⁴⁻²³⁶ La principal ventaja de esta metodología es el aprovechamiento de las ventajas que surgen de la combinación de dos técnicas experimentales muy potentes; la cromatografía que permite la resolución de mezclas complejas, y el poder de determinación y cuantificación de sustratos por la espectrometría de masas.

Por otro lado, este método analítico ha sido ya empleado con éxito para determinar la cantidad de acil-carnitinas en matrices biológicas complejas como células y tejidos,²³⁷⁻²⁴⁰ por lo que Marc Reina, actual estudiante de doctorado del grupo, inició el desarrollo de un método de determinación de la actividad de CPT1 basado en la cuantificación por HPLC-MS de que se encuentra explicado con detalle en el apartado Experimental de la tesis.

Para ello realizó una variación del ensayo de actividad radiométrico reemplazando la L-³H-carnitina por L-carnitina-d⁹ los nueve hidrógenos de los tres grupos metilo se encuentran substituidos por deuterio (**Esquema 89**).



Esquema 89. Reacción enzimática donde se emplea L-carnitina-d⁹ en la que se basa el nuevo ensayo de actividad de CPT1. Se destaca la estructura de la palmitoil-carnitina-d⁹, sustrato cuantificado en el HPLC-MS.

En esencia, el método consiste en realizar la reacción enzimática en presencia de carnitina deuterada con una cantidad conocida de proteína en el tampón adecuado durante 4 minutos a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, la reacción se detiene con metanol a -20 °C, se centrifuga y se analiza el sobrenadante.

Para determinar la cantidad de palmitoil-carnitina-d⁹ presente, se decidió utilizar un palmitoil-carnitina natural como patrón interno. Este patrón tiene una doble función; primero asegura que cada inyección en el HPLC-MS sea reproducible, y segundo, permite cuantificar el analito. Para ello, se inyecta la muestra junto con una cantidad conocida del patrón interno. Conociendo la concentración del patrón interno en la mezcla y la proporción de áreas de los dos compuestos en el espectro de masas y suponiendo un factor de respuesta idéntico para ambos, se puede calcular la concentración de analito en la muestra. Esta cantidad se utiliza para determinar la actividad enzimática, que se expresa en unidades de moles de palmitoil-carnitina sintetizados por cantidad de proteína y unidad de tiempo.

Si comparamos el nuevo método con la determinación radiométrica de la actividad de CPT1, aparte de poder prescindir del uso de carnitina radioactiva, encontramos otras

ventajas. Primeramente, el uso de una columna de HPLC en el ensayo permitió prescindir del paso previo de separación de la palmitoil-carnitina con disolventes orgánicos, inyectándose el sobrenadante de la reacción directamente en el HPLC tras la centrifugación previa de las muestras.

Además, gracias a la mayor sensibilidad del HPLC-MS, se pudieron reducir también los volúmenes de reacción para poder llevar a cabo cribados de inhibidores en placas de cultivos celulares de 96 pocillos en un estilo *high throughput*, lo que supone una ventaja considerable respecto al método radiométrico, que actualmente se lleva a cabo en tubos individuales, tanto en la velocidad del ensayo como en el ahorro de reactivos que una reducción del volumen de reacción supone (**Figura 68**).

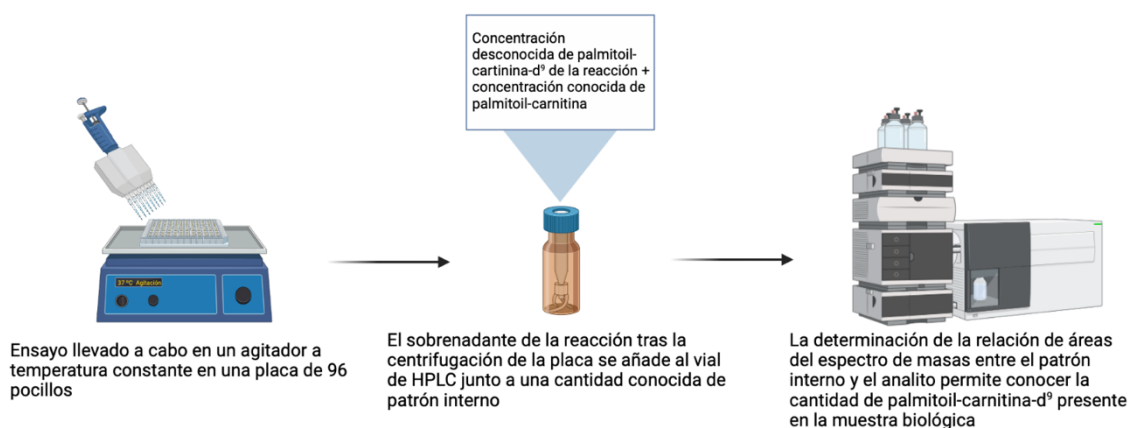


Figura 68. Ilustración esquemática del nuevo método de determinación de la actividad enzimática por HPLC-MS.

Una vez desarrollado el concepto y puesto a punto la parte biológica, la aportación de esta tesis al desarrollo del método consistió en la optimización y validación en paralelo mediante el bien establecido método radiométrico en diferentes muestras biológicas.

6.1.3 Determinación de actividad en extractos mitocondriales

6.1.3.1 Optimización y caracterización del método

Tras la comprobación realizada por Marc Reina de que el método permitía la determinación de palmitoil-carnitina-d⁹ formada por la CPT1 de extractos mitocondriales de levaduras enriquecidos en CPT1A se pasó a optimizar el método.

Lo primero que se realizó fue la adición de un paso previo de filtrado de la muestra previo a la inyección al HPLC-MS para evitar la saturación y la obturación de la columna, así como para eliminar posibles interferencias debidas a la matriz de la muestra biológica que pudieran reducir la reproducibilidad del método.

Para ello se adquirieron unas placas filtrantes de 96 pocillos que permitieran el filtrado rápido de las muestras mediante centrifugación, para no comprometer la capacidad de realizar cribados *high throughput* de posibles inhibidores enzimáticos. Se eligió un modelo de placa con un filtro físico de fibra de vidrio con un tamaño de poro de 3,0/0,2

μm , suficiente para no dejar pasar restos celulares de gran volumen o agregados de proteínas.

Una vez solucionado el problema del tratamiento de la muestra se pasó a optimizar el gradiente de forma que se pudiera separar correctamente el analito del resto de la matriz y caracterizar la señal y el tiempo de retención del mismo patrón interno y el mismo (**Figura 69**).

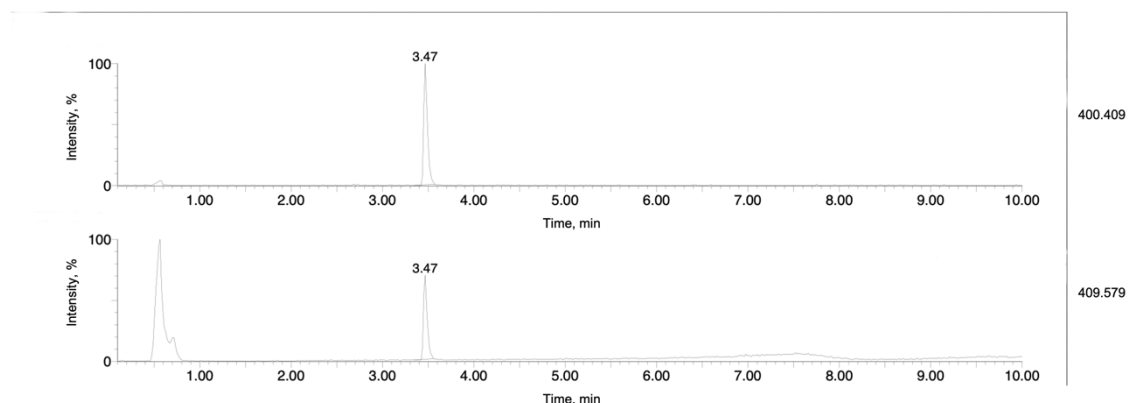


Figura 69. Cromatograma de HPLC-MS una muestra de un ensayo realizado con extractos mitocondriales enriquecidos en CPT1 ($1 \mu\text{g}$ de proteína) tras el filtrado de la muestra. Eje de las abscisas = tiempo (minutos), eje de las ordenadas = intensidad relativa (%). Picos: 400,409 palmitoil-carnitina, 409,579, palmitoil-carnitina- d^9 .

El siguiente paso en la puesta a punto fue la caracterización de los parámetros analíticos del método analítico; los límites de detección y de cuantificación y la linealidad del método.

El límite de detección (LOD) se define como la concentración mínima de analito que genera una señal analítica que es significativamente diferente de un blanco de prueba y se puede diferenciar de la señal de fondo. Por otro lado, el límite de cuantificación (LOQ) es la concentración mínima de analito que se puede cuantificar con una precisión y exactitud aceptables. Matemáticamente se definen como la concentración cuya relación señal/ruido (s/n) es de 3 y 10 respectivamente.

Para poder determinar estos dos parámetros se realizaron diferentes inyecciones de concentraciones decrecientes de palmitoil-carnitina y se midió la relación de la altura de las señales obtenidas en comparación con la señal de fondo del HPLC-MS.

Se encontraron un valor de **5 ng/mL** para el **LOQ** y de **0,5 ng/mL** para el **LOD**, tal y como se muestra en la **Figura 70**.

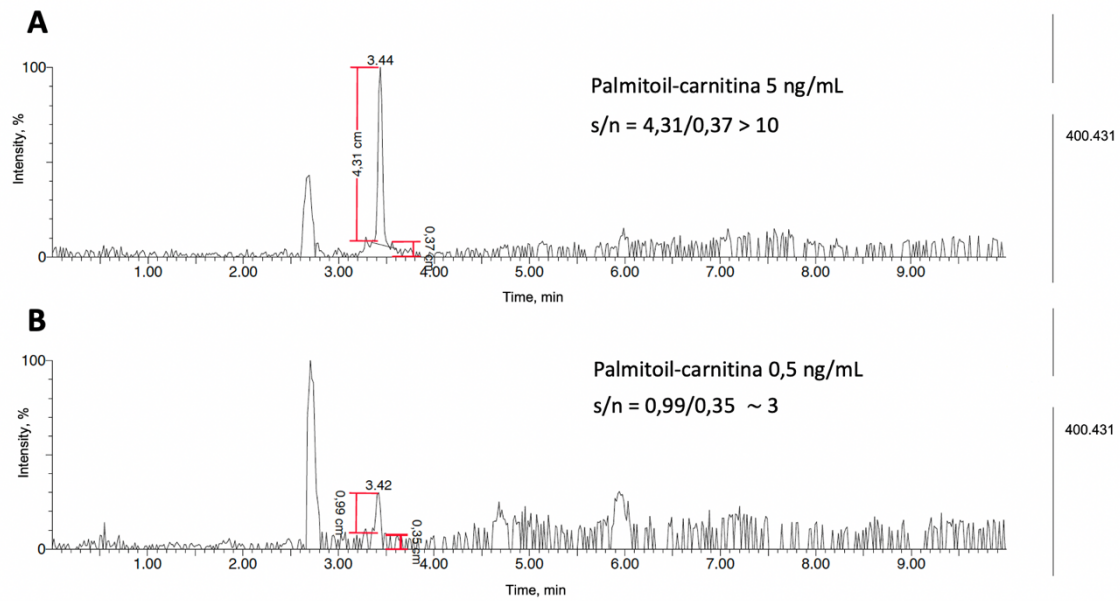


Figura 70. Cromatogramas de HPLC-MS. **A.** Palmitoil-carnitina (5 ng/mL), cuya s/n es superior a 10 (LOQ). **B.** Palmitoil-carnitina (0,5 ng/mL), cuya s/n es aproximadamente de 3 (LOD). Eje de las abscisas = tiempo (minutos), eje de las ordenadas = intensidad relativa (%). Picos: 400,431 palmitoil-carnitina. Altura calculada con Adobe Acrobat Reader con una precisión de 0,01 cm.

Paralelamente, realizamos un estudio sobre la linealidad del método para comprobar el rango de concentraciones en la que la respuesta del HPLC-MS es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Tal y como se muestra en la **Figura 71**, el método es lineal desde 5 a 5000 ng/mL.

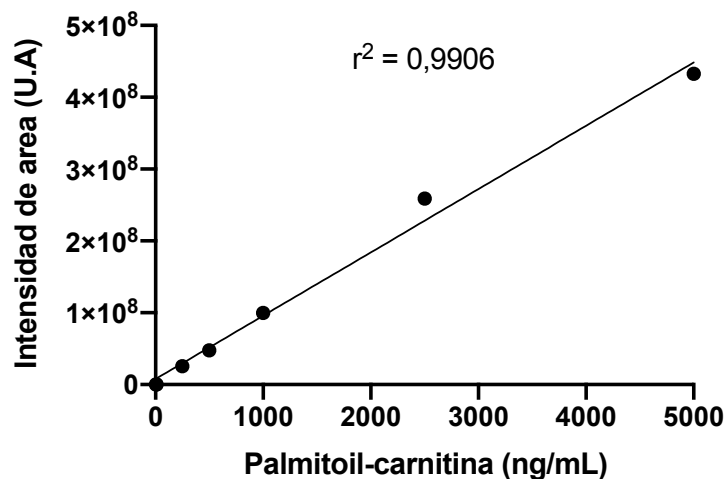


Figura 71. Estudio de linealidad del método, representación gráfica. Eje de las abscisas = concentración de palmitoil-carnitina (ng/mL), eje de las ordenadas = intensidad de área en unidades arbitrarias (U.A). $r^2 = 0,9906$, análisis realizado por regresión lineal simple utilizando el método de los mínimos cuadrados.

Marc Reina durante el desarrollo de su tesis ha podido comprobar que el analito es estable hasta 36h después del ensayo a temperatura ambiente, permitiendo la realización del ensayo y la medición del HPLC-MS en momentos diferentes.

6.1.3.2 Validación de la determinación de la actividad

Una vez caracterizado el método se decidió proceder a la validación de este mediante la comparación con el método radiométrico en la determinación de la actividad.

Para ello se decidió llevar a cabo el ensayo en paralelo con extractos mitocondriales recién obtenidos del hígado de ratón, por ser este un tejido rico en CPT1A. Los ensayos se pudieron llevar en paralelo gracias a la ejecución de uno de ellos por Marc Reina.

Tras la verificación de que no existía una diferencia significativa entre los valores obtenidos mediante los diferentes métodos, se procedió a estudiar la capacidad del nuevo ensayo para la determinación de la actividad de extractos mitocondriales de otros tejidos. Los resultados se resumen en la **Figura 72**.

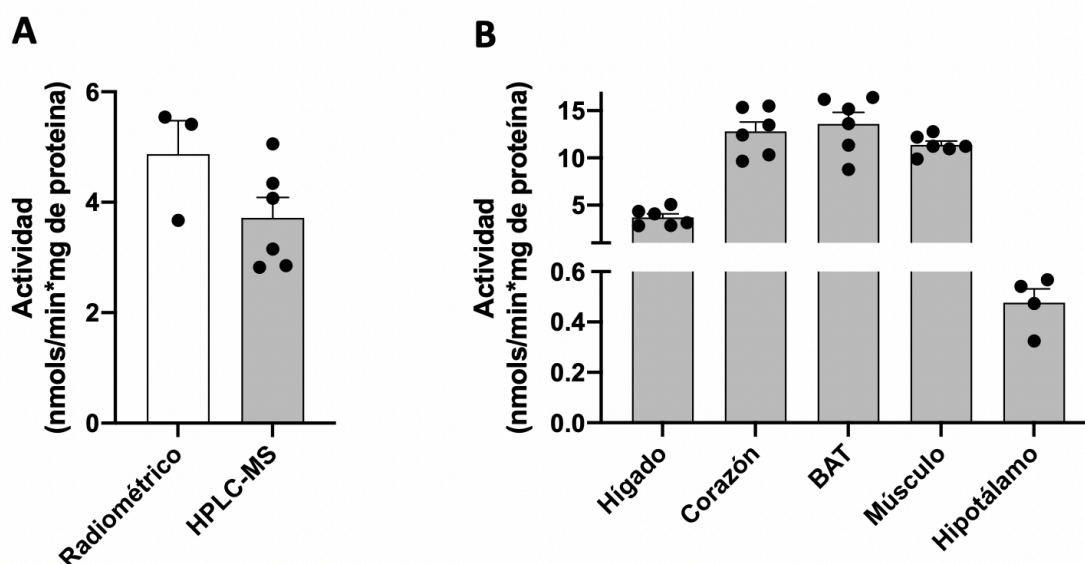


Figura 72. **A.** Comparación entre la actividad de CPT1A determinada por el método radiométrico y por HPLC-MS. **B.** Actividad de CPT1A determinada por HPLC-MS en diferentes tejidos. Todos los ensayos se realizaron con extractos mitocondriales extraídos inmediatamente tras el sacrificio de los animales. $n \geq 3$.

6.1.3.3 Estudio de inhibición

Uno de los principales atractivos del nuevo método desarrollado sería la posibilidad de llevar a cabo el cribado simultáneo de diferentes moléculas para poder realizar estudios *high throughput* de las potenciales capacidades inhibitorias de CPT1 de los nuevos compuestos.

Actualmente, la determinación radiométrica de la actividad de CPT1 nos limita al análisis del IC_{50} de un único compuesto por cada ensayo. Además, en caso de querer estudiar

un rango de concentraciones que incluya 8 puntos, más el triplicado de estos para obtener la estadística adecuada, se necesitan llevar a cabo 24 reacciones independientes con su correspondiente extracción y cuantificación solo para un compuesto.

La reducción del volumen conseguida en el método de HPLC-MS permite realizar las reacciones en una placa de cultivos de 96 pocillos, que gracias al uso de una pipeta multicanal permitiría realizar el estudio de hasta 4 moléculas diferentes en un mismo ensayo.

Estas consideraciones nos llevaron a determinar los valores de IC_{50} del C75-CoA y malonil-CoA, ampliamente establecidos por el método radiométrico, y comprobar si existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos para establecer la robustez de estos ensayos. Se llevaron a cabo en paralelo junto a Marc Reina.

Para ello se realizaron en paralelo los dos ensayos sobre extractos mitocondriales enriquecidos en CPT1A de levaduras que sobreexpresan la proteína donde se incubaron durante 1 minuto con concentraciones crecientes de los dos inhibidores. Los resultados se encuentran representados en la **Figura 73** como % de actividad enzimática remanente de la CPT1 respecto al control, donde no se añadió inhibidor.

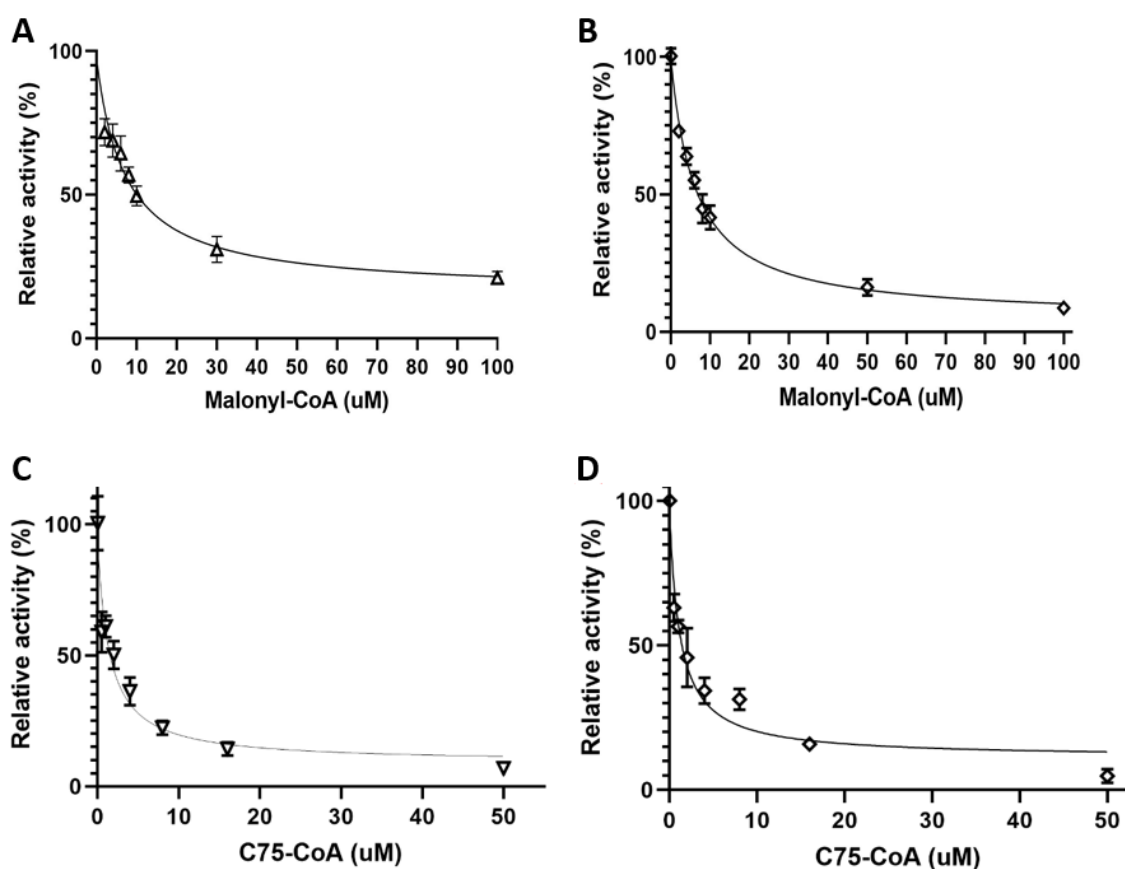


Figura 73. Efectos sobre la actividad enzimática en extractos mitocondriales enriquecidos en CPT1A. **A, B.** Determinación de la inhibición por malonil-CoA mediante el método radiométrico y HPLC-MS respectivamente. **C, D.** Determinación de la inhibición por C75-CoA mediante el método radiométrico y HPLC-MS respectivamente. Se

representa el % de actividad enzimática tras el ensayo a concentraciones crecientes de inhibidor. Cada ensayo se realizó por triplicado y el resultado se expresa como la media \pm S.E.M.

Se obtuvo para el C75-CoA un valor de IC₅₀ de 1,1 μ M para el ensayo de HPLC-MS y 1,1 μ M para el radiométrico. Por otro lado, el malonil-CoA dio unos valores de 7,3 μ M y 5,7 μ M para el método HPLC-MS y radiométrico respectivamente.

Pudimos corroborar así, que los métodos arrojan resultados concordantes y se pueden utilizar indistintamente en la determinación del IC₅₀ de posibles nuevos inhibidores de CPT1A.

6.1.4 Ensayo en células

6.1.4.1 Estudio de la actividad

Esperanzados por los buenos resultados obtenidos con el nuevo método de HPLC-MS, se pasó a determinar la actividad de CPT1 en células.

Actualmente, cuando se habla de la actividad enzimática a nivel celular, los estudios se refieren al ensayo realizado sobre los extractos mitocondriales de las mismas. El hecho de aislar las mitocondrias supone la modificación del entorno mitocondrial natural y la disrupción del complejo sistema metabólico del que forman parte.²⁴¹ Es por ello por lo que, aunque se trata de una buena estimación de los niveles de actividad de la CPT1, no dejan de ser una aproximación.

Además, el método de extracción provoca la rotura de las mitocondrias y, la CPT2 que de normal se encuentra aislada del citosol, queda expuesta a los reactivos del tampón de reacción modificando los valores de actividad medidos. Este problema se soluciona realizando el ensayo con o sin malonil-CoA, que inhibe selectivamente la CPT1, permitiendo conocer la contribución a la actividad de cada enzima.

La posibilidad de realizar el ensayo *in vitro* sobre las células directamente permitiría una imagen más real de los niveles de actividad de CPT1 y evitaría la necesidad de llevar a cabo el ensayo en paralelo con malonil-CoA con el consecuente ahorro de reactivos y tiempo.

El primer requisito para poder llevar a cabo el ensayo es conseguir que los reactivos (palmitato y carnitina-d⁹) lleguen a la CPT1 que se encuentra en la membrana exterior de la mitocondria.

Para ello, se necesitaría usar un agente permeabilizador de membrana y, aunque existen muchas opciones que permiten la disrupción de la membrana celular, nos decantamos por el uso de la digitonina, que se trata de un glucósido que actúa uniéndose a los esteroides de membrana formando complejos estables que desestabilizan la bicapa lipídica pero que no comprometen la integridad de las estructuras subcelulares como el núcleo y las mitocondrias.²⁴²

Se decidió que la mejor opción era añadir la digitonina directamente al tampón de reacción de CPT1 de manera que la permeabilización de la membrana y la realización

del ensayo ocurrieran de manera simultánea sin necesidad de preincubar las células. Para ello, Marc Reina llevó a cabo un estudio del tiempo de reacción para determinar la actividad enzimática cuyo resultado indicó que el mejor tiempo de incubación era 4 minutos.

En este punto nos planteamos analizar si el uso de palmitoil-carnitina natural era adecuado para la determinación de la actividad de CPT1A en células, ya que como se ha mencionado anteriormente existen varias publicaciones donde demuestran poder cuantificar diferentes acil-carnitinas a partir de diferentes muestras biológicas y queríamos analizar si la palmitoil-carnitina endógena presente en las células podría interferir con nuestros estudios.

Para ello llevamos a cabo un ensayo de actividad empleando palmitoil-carnitina- d^3 como patrón interno con el fin determinar si se podía observar la presencia de palmitoil-carnitina natural tras la inyección de las muestras en el HPLC-MS trabajando en las mismas condiciones en las que se había llevado a cabo el estudio de permeabilización con digitonina. El resultado se muestra en la **Figura 74**, donde se observa la ausencia del pico m/z de 400 a 3,50 minutos asociado a la palmitoil-carnitina en el cromatograma.

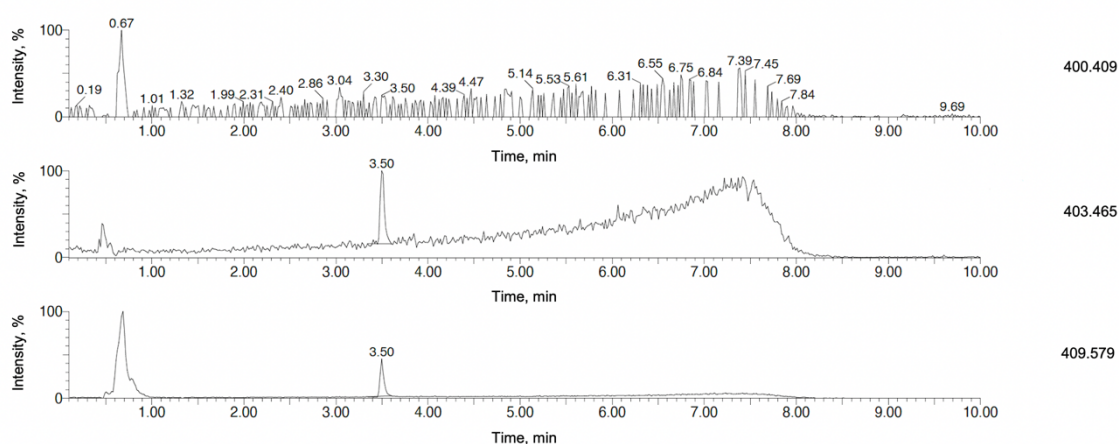


Figura 74. Cromatograma de una muestra del ensayo realizado con las células HepG2 permeabilizadas durante 4 minutos de reacción empleando palmitoil-carnitina- d^3 como patrón interno tras el filtrado. Eje de las abscisas = tiempo (minutos), eje de las ordenadas = intensidad relativa (%). Picos: 403,465 palmitoil-carnitina- d^3 , 409,579, palmitoil-carnitina- d^9 .

6.1.4.2 Inhibición en células

Tras comprobar que el método era válido para la determinación de la actividad de CPT1 en células vivas se decidió estudiar si la metodología desarrollada permitiría observar la disminución de la actividad enzimática en cultivos preincubados con inhibidores.

Esto permitiría por primera vez el estudio de la inhibición de la CPT1 en células vivas y supondría una enorme ventaja respecto al estudio farmacológico en mitocondrias. Como ya se ha comentado con anterioridad, aunque el aislamiento de estos orgánulos permite obtener una buena estimación de los niveles de actividad de la enzima, el

estudio de su inhibición sin la modificación de su entorno natural permitiría conocer mejor la actividad de las moléculas estudiadas. Además, esta nueva metodología permitiría tener en cuenta, en etapas tempranas del desarrollo de fármacos, factores celulares como la estabilidad metabólica y la capacidad de internalización de los compuestos, información valiosa que se pierde cuando se realiza el ensayo con extractos mitocondriales.

Basándonos en el artículo de Assia Bentebibel *et al.*²⁴³ decidimos realizar un estudio de inhibición de la CPT1A en cultivos de la línea celular de hepatocarcinoma HepG2 preincubados durante 1 y 2 horas con C75. Para ello se añadió al medio de cultivo una alícuota de C75 en DMSO (6 mM) de manera que la concentración final en el pocillo fuera de 150 μ M y el disolvente orgánico no superara el 2,5%.

Se emplearon dos controles en el ensayo, las células con solo medio de cultivo y células a las que se añadió DMSO a una concentración final de 2,5% para comprobar si afectaba a la actividad enzimática. Los resultados se muestran en la **Figura 75**:

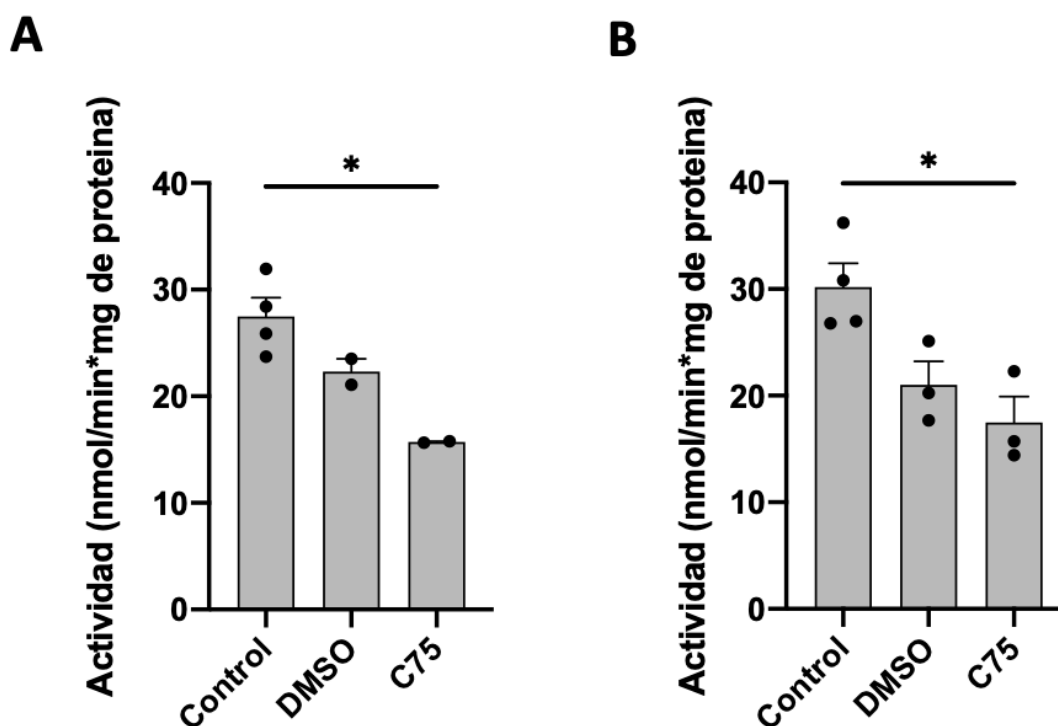


Figura 75. Estudio de la inhibición de la CPT1A con C75 (150 μ M) con una concentración final de DMSO del 2,5% en la línea celular HepG2 permeabilizadas con digitonina. **A.** Células incubadas durante 1h. **B.** Células incubadas durante 2 h. Se muestran los valores de actividad individuales (puntos) y la media (barras) a diferentes tiempos de reacción. $n \geq 2$. *: $p < 0,05$.

Como se puede comprobar el C75 provoca un descenso significativo de la actividad de la CPT1A, pero la presencia de un 2,5% de DMSO parece interferir con el correcto funcionamiento de la enzima, ya que, aunque no sea significativo se puede apreciar un descenso de la actividad de las células incubadas con el disolvente orgánico.

Cuando se intentó llevar a cabo la inhibición sin DMSO no se observó una disminución de la actividad enzimática, lo que planteaba dos posibilidades; que el experimento no estuviera funcionando y la disminución de la actividad fuera causa del DMSO, o que el C75 no fuera lo suficientemente soluble en el medio de cultivo por su carácter lipofílico.

Para resolver la duda decidimos llevar a cabo el estudio con etomoxir que es soluble en medio acuoso. Para ello se llevó a cabo una incubación de las células con el inhibidor y sin inhibidor como control negativo.

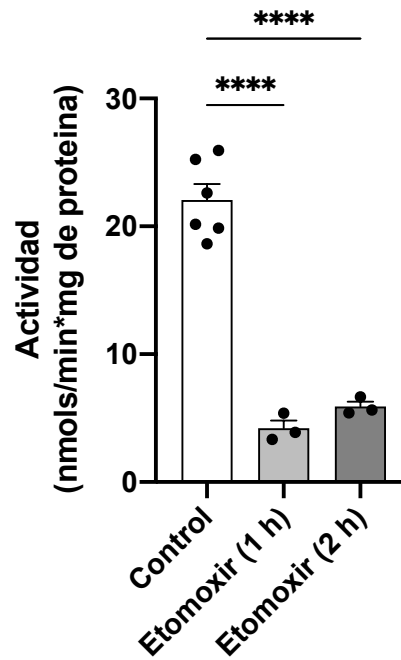


Figura 76. Estudio de la inhibición de la CPT1A en la línea celular HepG2 permeabilizada con digitonina tras la incubación con etomoxir (150 μ M) durante 1 y 2 horas. Se muestran los valores de actividad individuales (puntos) y la media (barras) a diferentes tiempos de reacción. $n \geq 3$. ****: $p < 0,0001$.

Tal como muestra la **Figura 76**, el estudio demuestra que el etomoxir consigue disminuir la actividad de la CPT1 en las células hepáticas a un 20% de su valor original sin diferencias significativas entre la incubación durante 1 y 2 h. Los resultados ponen de manifiesto que los problemas encontrados con el C75 responden a la naturaleza insoluble del compuesto y no a una problemática de la nueva metodología, ya que esta ha demostrado tener la capacidad de cuantificar de esta disminución de la actividad sin necesidad de realizar el aislamiento de las mitocondrias celulares.

6.1.4.3 *Estudio de las condiciones metabólicas*

Por último, Marc Reina intentó estudiar la posibilidad de detectar diferencias en la actividad de CPT1 celular en respuesta a cambios en la composición del medio celular.

Para ello cambió el medio de cultivo alto en glucosa (25 mM) de la línea celular C2C12, de mioblastos de ratón, a un medio 5 mM en glucosa con el fin de simular un estado fisiológico de ayuno e incubó las células durante 1 h. Al llevar a cabo el ensayo pudo demostrar un aumento significativo en la actividad de la CPT1A de las células en el medio 5 mM en glucosa directamente con las células permeabilizadas sin llevar a cabo la extracción de mitocondrias.

En definitiva, se ha podido comprobar la capacidad del nuevo método para determinar los niveles de actividad de CPT1 en células vivas sin necesidad de llevar a cabo el aislamiento de las mitocondrias, así como la capacidad de medir cambios en la actividad enzimática en respuesta a factores externos como la presencia de inhibidores de la CPT1. Se continúa trabajando en el tema que puede cambiar el panorama de la determinación de la CPT1 en el futuro.

7 Resumen y conclusiones

A lo largo de la presente Tesis se ha descrito en detalle la obtención de varios derivados de C75 y de (-)-UB006 con distintas modificaciones estructurales, así como el estudio de su actividad biológica como potenciales inhibidores de la CPT1 y de la FAS respectivamente.

El primer capítulo trata de la obtención de diferentes derivados hidroxilados del (-)-UB006 con estructura de lactona y lactama, donde el grupo -OH se encuentra directamente unido al ciclo de cinco carbonos (**Figura 77**).

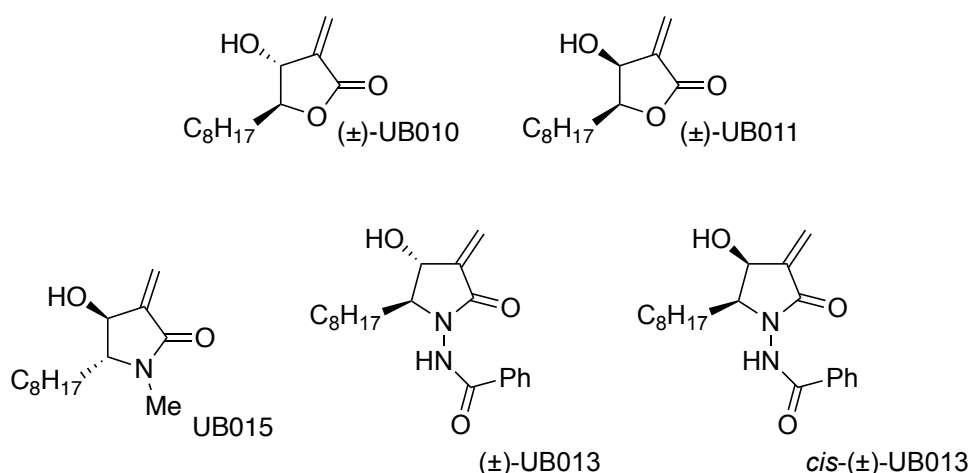
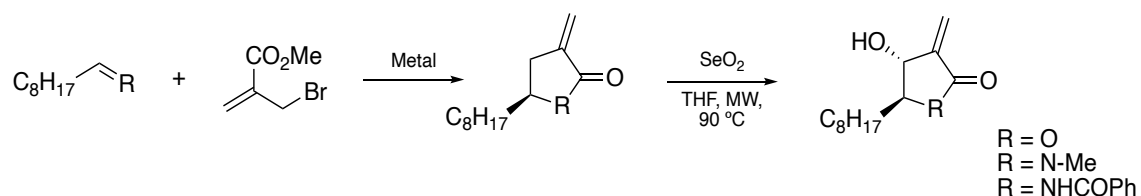


Figura 77. Estructura de los derivados de UB006 sintetizados en el primer capítulo.

Para ello desarrollamos una nueva metodología sintética que permitía la hidroxilación del compuesto sin comprometer la estabilidad del doble enlace exocíclico, los compuestos se obtuvieron, en líneas generales, mediante una condensación de tipo Barbier seguida de una oxidación alílica con SeO₂ asistida por microondas, tal y como se encuentra resumido en el **Esquema 90**.



Esquema 90. Procedimiento general de obtención de los derivados hidroxilados de UB006.

Por desgracia, el estudio farmacológico de las nuevas estructuras reveló una disminución de la actividad citotóxica de las lactonas (±)-UB010 y (±)-UB011 respecto al (-)-UB006. Lo mismo ocurrió con las estructuras de tipo lactama de los compuestos UB015, (±)-UB013 y cis-(±)-UB013, aunque sorprendentemente la actividad de los dos últimos fue superior a la de los análogos de tipo lactona.

En el capítulo 2 se intentó la síntesis de diferentes compuestos derivados del C75 sustituyendo el oxígeno por azufre y nitrógeno, con el fin de descubrir cómo afectaba el

cambio a su actividad biológica y, en el caso de las lactamas, contar con un punto extra de funcionalización en la estructura (**Figura 78**).

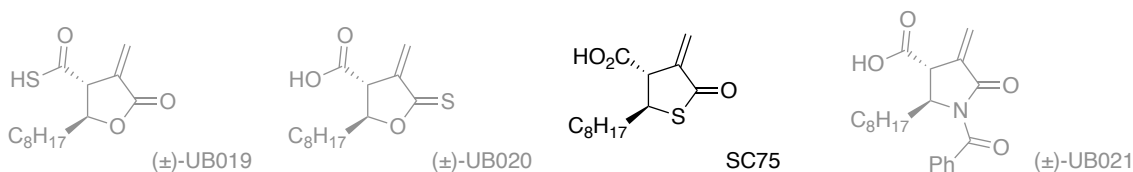
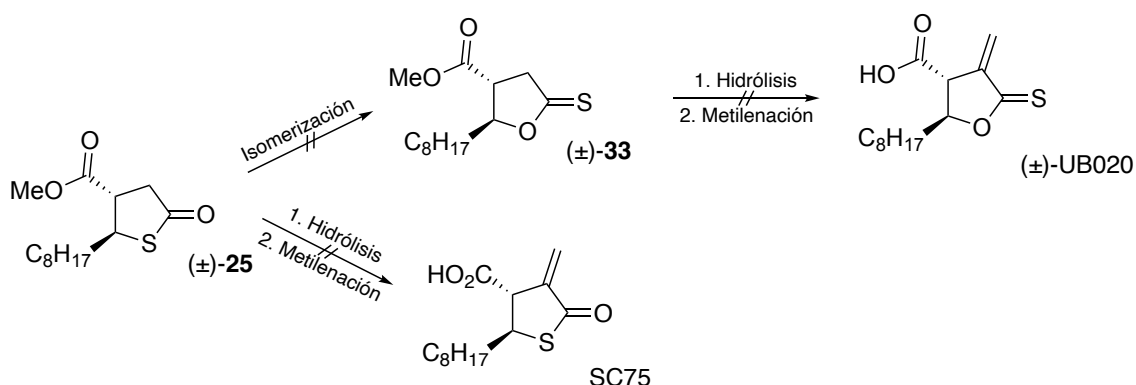


Figura 78. Estructura de las moléculas que se intentaron desarrollar durante el capítulo dos (en gris) y estructura del nuevo SC75 (en negro).

En el caso del (±)-UB019 se abordó la síntesis mediante diferentes aproximaciones, pero siempre en base al uso del reactivo de Lawesson para la introducción del átomo de azufre en el grupo ácido carboxílico. No obstante, en ningún caso se pudo obtener el compuesto, muy probablemente por la extrema sensibilidad de los grupos tioácido y metileno exocíclico en la estructura del compuesto.

Paralelamente se intentaron obtener sin éxito los compuestos (±)-UB020 y SC75 mediante una síntesis convergente con el intermedio común (±)-25 (Esquema 2):



Esquema 91. Intento de síntesis de los compuestos SC75 y (±)-UB020 a partir del intermedio común (±)-25.

En el estudio se hizo patente la sensibilidad de estos derivados frente a las condiciones de hidrólisis y metilación.

Finalmente, la manera de obtener el SC75 fue replicar la síntesis descrita por Wang y col.,¹⁸⁹ lo que nos permitió obtener el compuesto y estudiar su actividad biológica como inhibidor de la CPT1 y como agente citotóxico, aunque los resultados fueron considerablemente peores que los obtenidos con el (+)-C75.

Por otro lado, se trabajó en el desarrollo de una metodología sintética que permitiese la obtención de una lactama derivada del C75 con un sustituyente electronegativo sobre el átomo de nitrógeno que aumentara la electrofilia del metileno exocíclico. No obstante, cuando se intentó la metilación del intermedio avanzado (**Figura 79**) no se consiguió aislar el producto deseado, probablemente fruto de la inestabilidad del grupo benzoilo en las condiciones de reacción empleadas.

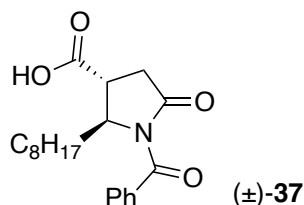
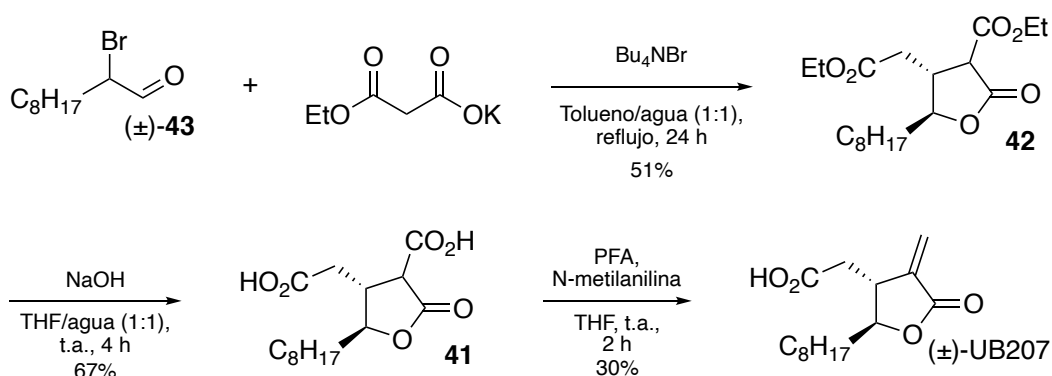


Figura 79. Estructura del intermedio avanzado obtenido en el intento de síntesis de (±)-UB021.

Por supuesto, podría intentarse aproximaciones alternativas en las que en la protección del nitrógeno se utilizara un grupo funcional más robusto para la posterior metilación de la lactama.

En el capítulo 3 se llevó a cabo satisfactoriamente el desarrollo de una nueva metodología sintética (**Esquema 92**) para la obtención del derivado (±)-UB207, preparado originalmente por Kamil durante su tesis, y cuyo potencial farmacológico como inhibidor de la CPT1A es prometedor.



Esquema 92. Ruta para la obtención del (±)-UB207. NO REPETEIXIS EL COMPOST 42

La estrategia de síntesis se basó en la obtención del intermedio **41** que cuenta con un ácido carboxílico en la posición α respecto al carbonilo de la lactona, y que permite la metilación directa empleando PFA en medio básico. En contraposición, la metodología clásica que emplea MMC suponía la obtención de la impureza (±)-UB207b (**Figura 80**) tras reaccionar este con la posición contigua al ácido carboxílico del intermedio (±)-39 (**Figura 80**).

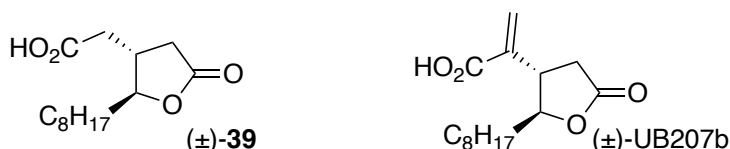


Figura 80. Estructuras del intermedio (±)-39 y del subproducto obtenido de la metilación del mismo empleando MMC.

Tras la obtención del compuesto con la pureza adecuada se intentó la resolución de los estereoisómeros mediante la derivatización del compuesto con diferentes auxiliares quirales (la oxazolidinona de Evans o un alcohol propargílico) seguida de separación por métodos cromatográficos. Este esfuerzo resultó infructuoso quizás en buena parte debido a la pequeña escala con la que trabajábamos y también a la sensibilidad inherente del doble enlace exocíclico.

Es por ello por lo que decidimos realizar el estudio de las pruebas biológicas del compuesto con la mezcla racémica, obteniendo un valor de IC₅₀ para la inhibición de la CPT1A de 0,46 ± 0,11 μM.

Se llevaron también a cabo 2 experimentos con ratones:

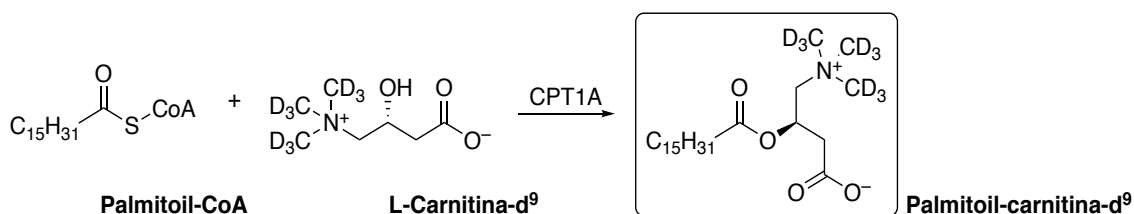
En el primero de ellos se realizó una única administración de los compuestos vía ICV, donde se pudo demostrar el descenso de la ingesta producido por el (±)-UB207 cuyos efectos desaparecen antes de las primeras 24 h después del tratamiento. Paralelamente se estudiaron los efectos del (+)-C75, comprobándose que la disminución en la ingesta de la ingesta fue mucho más agresiva que en el caso del otro compuesto, y fue acompañada de una marcada disminución del peso corporal.

El siguiente experimento tuvo una duración de 3 días durante los cuales se llevó a cabo la administración IP de los inhibidores durante 3 días y se monitorizó el descenso de la ingesta y del peso de los roedores, demostrando de nuevo la capacidad del (±)-UB207 para disminuir la ingesta de los ratones acompañada de un ligero descenso del peso corporal. Por otro lado, el (+)-C75 también disminuyó la ingesta de los roedores y provocó un dramático descenso del peso corporal, posiblemente por efectos secundarios del tratamiento que provocaba disentería en los animales.

Paralelamente al análisis de la ingesta y la variación de peso, se llevó a cabo un estudio de la expresión génica de los tejidos de los ratones tratados del segundo experimento tras su sacrificio. Estudiamos los efectos sobre el hipotálamo, hígado y tejido adiposo marrón, lo que nos permitió comprobar que, aunque los dos fármacos actúan inhibiendo la CPT1A parecen haber pequeñas diferencias en sus efectos sistémicos.

En el último capítulo hemos colaborado en el desarrollo, junto a Marc Reina, de un nuevo método de determinación de la actividad de CPT1 que se basa en el marcaje isotópico con deuterio en la carnitina y la cuantificación mediante HPLC-MS de la palmitoil-carnitina-d⁹ formada por la enzima según la reacción (

Esquema 93):



Esquema 93. *Reacción catalizada por la CPT1A de conversión de L-carnitina-d⁹ en palmitoil-carnitina-d⁹, sustrato que cuantificamos por HPLC-MS.*

El principal atractivo de este nuevo ensayo radica en que se puede prescindir del uso de compuestos radioactivos y que permite la reducción de la escala hasta el punto de poder realizar hasta 96 reacciones en un solo ensayo, lo que permitiría la realización del cribado de compuestos *high-throughput*. Además, esta nueva aproximación ha permitido estudiar por primera vez la actividad CPT1A en células vivas sin necesidad de llevar a cabo una extracción mitocondrial previa, mediante la permeabilización de las membranas empleando digitonina.

Esto nos permite obtener unos valores de actividad más cercanos a los reales, pues se reduce enormemente el impacto sobre la actividad de la enzima que conlleva la manipulación de la proteína.

Del presente trabajo podemos derivar las siguientes conclusiones:

- El compuesto (–)-UB006 ha demostrado ser el más activo de la serie de derivados hidroxilados del C75 ensayados, probando que la distancia óptima entre el ciclo de la lactona y el grupo hidroxilo es de un metileno.
- Hemos podido comprobar que los compuestos hidroxilados de tipo lactama presentan una buena actividad citotóxica frente a las OVCAR-3, y suponen la introducción de un punto extra de funcionalización en su estructura que puede permitir en un futuro la exploración de nuevos derivados nitrogenados de C75 contra el cáncer.
- Se ha demostrado que el SC75 no es un buen candidato como inhibidor enzimático de la FAS y de la CPT1A. Asimismo, hemos podido comprobar la dificultad de síntesis de nuevos derivados con azufre del C75 debido a la extrema sensibilidad de los grupos funcionales presentes en sus estructuras.
- Se ha podido desarrollar una nueva ruta sintética para la obtención del (±)-UB207 que permite su síntesis con elevada pureza.
- Hemos estudiado la actividad biológica del (±)-UB207 demostrando su capacidad de inhibición de la ingesta en ratones cuando se administra vía ICV o IP. En este último caso, además, lleva asociada una ligera disminución del peso de los roedores que lo convierten en un buen candidato para realizar estudios del tratamiento de la obesidad en modelos animales.
- Se ha comprobado que el tratamiento de los roedores con (+)-C75, un potente inhibidor de la ingesta conlleva una pérdida de peso extrema en los animales probablemente debida a la deshidratación de los animales por la diarrea que este compuesto provoca. Esto valoriza la importancia de haber encontrado un inhibidor como el (±)-UB207 que, a priori, no parece producir estos efectos indeseados.
- Se ha podido realizar un estudio la expresión de diferentes genes en hipotálamo, hígado y tejido adiposo marrón, permitiendo ampliar el conocimiento sobre los efectos que producen los inhibidores de CPT1A a nivel cerebral y sistémico. Se demostró así que, aunque el mecanismo de acción es el mismo, parecen existir pequeñas diferencias entre el (±)-UB207 y el (+)-C75, como es el caso de sus efectos sobre la biosíntesis de colesterol en el hígado.
- Hemos colaborado en el desarrollo de un nuevo método de determinación de la actividad de CPT1 pudiendo prescindir del uso de compuestos radioactivos y escalando el ensayo hasta el punto de poder realizar cribados de potenciales inhibidores de la enzima en un estilo *high-throughput*.

- Este mismo método ha demostrado ser capaz de determinar, por primera vez, la actividad de la enzima en células vivas mediante la permeabilización de su membrana durante la realización del experimento.

-

-

8 Experimental

8.1 Procedimientos de síntesis química

8.1.1 Instrumentación, disolventes y técnicas

Los disolventes utilizados en las reacciones se han purificado y secado según las técnicas rutinarias, mientras que los empleados en las cromatografías en columna, filtraciones y otros métodos de purificación se han destilado o bien se ha utilizado directamente el comercial cuando su pureza lo ha permitido.

Las cromatografías de capa fina (CCF) se han llevado a cabo utilizando placas analíticas de gel de sílice de 0,2 nm de grosor (F254 Merk), y los eluyentes empleados se indican en cada caso. Como reveladores se han utilizado disoluciones ácidas de permanganato potásico, ácido fosfomolibdico y luz UV (259 y 366 nm). Los factores de retención (Rf) son aproximados.

Las cromatografías en columna se han realizado empleando la técnica de media presión (*flash*) de gel de sílice con un tamaño de partícula de 0,040-0,063 mm. Los eluyentes empleados se indican en cada caso.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75 MHz) se han registrado en un aparato Varian 300 Unity Plus. Los espectros de ^1H (400 MHz) y de ^{13}C (100 MHz) se han registrado en un aparato Mercury 400. Se han empleado como disolventes el CDCl_3 , CD_3OD , DMSO y D_2O , y como referencia tetrametilsilano (TMS). Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz, los desplazamientos en partes por millón (ppm), y las multiplicidades de las señales se indican con las siguientes abreviaturas: s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), q (quintplete), m (multiplete), sa (singulete ancho). Los sistemas complejos se describen como una combinación de las abreviaturas indicadas: dd (doble doblete), dt (doble triplete), etc...

Los espectros de infrarrojo (IR) se han registrado en un aparato Nicolet 6700 Thermo Scientific. En la caracterización de los compuestos sólo se indican las absorciones en cm^{-1} más significativas.

Las rotaciones específicas se han determinado en un polarímetro Perkin-Elmer 241 Mc empleando la longitud de onda correspondiente a la línea D del sodio (589 nm) a temperatura ambiente, y la concentración y el disolvente utilizados se especifica en cada caso.

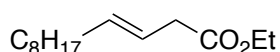
Los espectros de masas de alta resolución se han realizado en un aparato Agilent LC/MSD-TOF G1969A con ionización por electroesprai (ESI+) como técnica de fragmentación (voltaje del capilar 4 kV, fragmentación a 175,0 V, temperatura del gas 325 °C, gas de nebulización N_2 a 15 psi) en los Serveis Científicòcnics de la Universitat de Barcelona (STC-UB). Los análisis de HPLC se han realizado en un cromatógrafo Shimadzu SPD-20A con detector UV/VIS. Los disolventes empleados se indican en cada caso.

8.1.2 Síntesis de las moléculas orgánicas

8.1.2.1 (E)-Dodec-3-enoato de etilo (5)

Una mezcla de decanal (1,5 mL, 8,0 mmol), malonato de monoetilo (0,94 mL, 8,0 mmol) y trietilamina (2,7 mL, 19 mmol) se calentó durante 12 horas a 95 °C. La mezcla de reacción se dejó enfriar y se vertió sobre una disolución acuosa al 20% de H₂SO₄ (30 mL) a 0 °C.

La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con DCM (3x10 mL). Las fases orgánicas se juntaron, se lavaron con una disolución acuosa saturada en NaCl (salmuera, 3x5 mL), se secaron con MgSO₄ y tras la filtración el disolvente se eliminó a presión reducida en el rotavapor, obteniéndose el producto en forma de aceite incoloro (1,725 g, 95%).



Rf = 0,45 (hexano/AcOEt, 95:5).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,62 – 5,47 (m, 2H), 4,14 (qd, J = 7,2, 1,3 Hz, 2H), 3,01 (d, J = 6,2 Hz, 2H), 2,02 (q, J = 6,2 Hz, 2H), 1,40 – 1,22 (m, 15H), 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 3H).

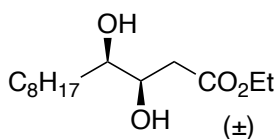
¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 172,3, 134,9, 121,7, 60,6, 38,3, 32,6, 32,0, 29,6, 29,4, 29,3, 22,8, 14,3, 14,2.

IR 2955, 2923, 2853, 1736.

HRMS (ESI+) calculado C₁₄H₂₇O₂ [M+H]⁺ = 227,2006
encontrado = 227,2010.

8.1.2.2 cis-(±)-3,4-Dihydroxidecanoato de etilo (4)

Una mezcla del alqueno 5 (250 mg, 1,04 mmol), N-óxido de N-metilmorfolina (396 mg, 3,88 mmol), metanosulfonamida (123,7 mg, 1,3 mmol) y K₂OsO₄·H₂O (10% mmol) se disolvió en una mezcla de *tert*-butanol/agua (1:1, 9 mL) y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 h. Una disolución acuosa de Na₂SO₃ (15% en peso, 8 mL) se añadió a la mezcla de reacción y se extrajo con *tert*-butil metil eter (3x10 mL). La fase orgánica se lavó con salmuera (2x10 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó en disolvente en el rotavapor, obteniéndose transparente (201 mg). El crudo se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1 a 7:3, elución por gradiente). Se aisló el compuesto como un aceite transparente (61,5 mg, 23%).



Rf = 0,16 (hexano/AcOEt, 7:3).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,18 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,88 (ddd, J = 8,5, 4,4 Hz, 4,2 Hz, 1H), 3,44 (q, J = 5,6 Hz, 1H), 2,64 – 2,48 (m, 2H), 1,54 – 1,45 (m, 3H), 1,33 – 1,22 (m, 14H), 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 3H).

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 173,1, 73,7, 70,5, 60,9, 38,1, 33,4, 31,9, 29,6, 29,5, 29,2, 25,6, 22,6, 14,1, 14,1.

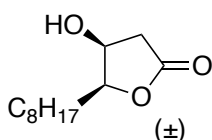
IR 3327, 2952, 2913, 2847, 1731.

HRMS (ESI+) calculado para C₁₄H₂₉O₄ [M+H]⁺ = 261,2060
encontrado = 261,2064.

8.1.2.3 (±)-4-Hidroxi-5-octildihidrofuran-2(3H)-ona (3)

El diol (±)-4 (500 mg, 2 mmol) se disuelve en metanol (50 mL) junto a K₂CO₃ (1,38 g, 10 mmol) y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añade una disolución acuosa 2M de HCl hasta pH 2 y la disolución resultante se extrae con acetato de etilo (AcOEt). La fase orgánica se lava con salmuera (2x5 mL), se seca con MgSO₄ y se filtra. El disolvente se elimina a presión reducida con el rotavapor obteniéndose el compuesto como un aceite incoloro (209 mg, 49%).

La lactona (±)-3 también se obtiene como producto en la dihidroxilación del compuesto 5. Se puede aislar mediante la cromatografía de columna (ver síntesis anterior) obteniéndose la lactona como un aceite incoloro (48%).



R_f = 0,08 (hexane/AcOEt, 7:3).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,65 – 7,37 (m, 10H), 4,45 (q, *J* = 4,0 Hz, 1H), 4,23 (dt, *J* = 8,8, 4,0 Hz, 1H), 2,41 – 2,38 (m, 2H), 1,40 – 1,21 (m, 14H), 1,08 (s, 9H), 0,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176,0, 85,0, 69,0, 39,5, 31,8, 29,5, 29,4, 29,2, 28,2, 25,5, 22,6, 14,1.

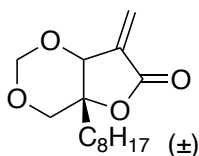
IR 3489, 2996, 2918, 2841, 1734.

HRMS (ESI+) calculado para C₁₂H₂₃O₃ [M+H]⁺ = 215,1642 encontrado = 215,1645.

8.1.2.4 (±)-7-Metilen-4a-octiltetrahydro-6H-furo[3,2-d][1,3]dioxin-6-ona (±)-UB009

La lactona (±)-3 (116 mg, 0,58 mmol) se disuelve en THF (2,3 mL) y se enfría a 0 °C. Se añade la LiHDMS 1M en THF (2,7 mL, 2,6 mmol) y se deja agitar durante 1 h a 0 °C. Se deja que la mezcla de reacción alcance temperatura ambiente y se añade el 2,2,2-trifluoroacetato de 2,2,2-trifluoroetilo (0,16 mL, 1,28 mmol) y se agita durante 1 h. Se añade agua (10 mL) al medio de reacción y se extrae con DCM (3x10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con salmuera (10 mL) y se secan con MgSO₄. Tras el filtrado, el disolvente se elimina en el rotavapor y se guarda el crudo a -20 °C.

Al día siguiente se añade tolueno (23 mL) junto a éter corona 18-crown-6 (34,8 mg, 0,12 mmol), K₂CO₃ (232 mg, 1,16 mmol) y paraformaldehído (638 mg, 21,25 mmol). La mezcla resultante se agita durante 2 h a 80 °C y luego a 100 °C durante dos horas más. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade agua. Se extrae con DCM (3x20 mL), se seca la fase orgánica con MgSO₄ y tras el filtrado y la evaporación del disolvente en el rotavapor se obtiene el producto en forma de un aceite amarillo (107 mg, 74%).



Rf = 0,55 (hexane/AcOEt, 7:3).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,47 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 5,96 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 4,93 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,75 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,61 (t, *J* = 1,6 Hz, 1H), 4,02 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 3,81 (d, *J* = 12,7 Hz, 1H), 1,70 – 1,52 (m, 2H), 1,49 – 1,38 (m, 1H), 1,38 – 1,20 (m, 11H), 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168,3, 135,7, 126,8, 89,7, 80,2, 75,5, 69,2, 36,1, 31,9, 29,9, 29,4, 29,3, 22,7, 22,4, 14,2.

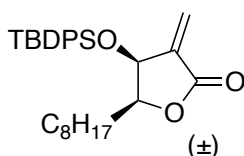
IR 3014, 2929, 2904, 1757.

HRMS (ESI+) calculado para C₁₅H₂₄O₄ [M+H]⁺ = 269,1759 encontrado = 269,1843.

8.1.2.5 *cis*-(±)-4-((*tert*-Butildifenilsilil)oxi))-5-octildihidrofuran-2(3H)-ona (6)

El alcohol (±)-3 (100 mg, 1,0 mmol) se disuelve en DCM (0,1 mL) junto a TBDPSCI (0,15 mL, 1,2 mmol) e imidazol (38,1 mg, 1,2 mmol). La disolución resultante se deja agitando a temperatura ambiente durante 16 h. Se añade agua (5 mL), se separan las fases y la fase acuosa se extrae con DCM (3x5 mL). Las fases orgánicas se juntan, se lavan con salmuera (10 mL) y se secan con MgSO₄. Se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose un aceite incoloro (199 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1), obteniéndose el compuesto en forma de aceite incoloro (142 mg, 67%).



Rf = 0,52 (hexano/AcOEt 7:3).

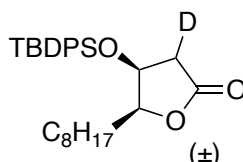
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,65 – 7,37 (m, 10H), 4,45 (q, *J* = 4,0 Hz, 1H), 4,23 (dt, *J* = 8,8, 4,0 Hz, 1H), 2,41 – 2,38 (m, 2H), 1,40 – 1,21 (m, 14H), 1,08 (s, 9H), 0,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175,3, 135,8, 135,7, 134,8, 133,1, 132,5, 130,2, 130,1, 129,6, 127,9, 127,9, 127,7, 85,0, 70,7, 39,0, 31,8, 30,9, 29,5, 29,4, 29,2, 29,0, 26,8, 26,5, 25,6, 22,6, 19,3, 14,1.

IR 3066, 3047, 3012, 2955, 2917, 2847, 1958, 1898, 1763.

MS (ESI+) calculado para C₂₈H₄₀O₃Si [M+H]⁺ = 453,2747 encontrado = 453,28.

8.1.2.6 Intento de síntesis de la *cis*-(±)-4-((*tert*-Butildifenilsilil)oxi))-5-octildihidrofuran-2(3H)-ona-3-d



La lactama (±)-6 (20 mg, 0,04 mmol) se disuelve en THF anhidro (0,24 mL) bajo atmósfera de N₂ y se enfría la disolución a 0 °C con un baño de hielo. Se añade gota a gota la LiHDMS 1M en THF (280 μL, 0,28 mmol) y se deja reaccionar durante 1h.

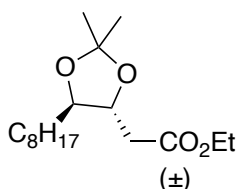
Se añade D₂O (1 mL) y se extrae con AcOEt (3x2 mL). Se lava con salmuera (5 mL) y se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida.

Se obtienen un aceite amarillento (33 mg) que no se corresponde con el producto esperado.

8.1.2.7 (\pm)-2-(2,2-Dimetil-5-octil-1,3-dioxolan-4-il)acetato de etilo (9)

El dialcohol (\pm)-4 (100 mg, 0,38 mmol) se disuelve junto al 2,2-dimetoxipropano (51,87 mg, 0,5 mmol) y *p*-TsOH (7,3 mg, 0,04 mmol) en DCM (0,4 mL). La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 16 h. Se añade una disolución saturada acuosa de NaHCO₃ (5 mL) y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con DCM (3x10 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un aceite incoloro (123 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt, 7:3, elución isocrática) y se obtiene el producto como una mezcla de los productos (\pm)-9 y (\pm)-9b de proporción 3:1 (65 mg, 65%).



R_f = 0,75 (hexano/AcOEt, 8:2).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,17 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 4,08 – 3,99 (m, 1H), 3,75 – 3,64 (m, 1H), 2,64 – 2,47 (m, 2H), 1,66 – 1,20 (m, 23H), 0,85 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

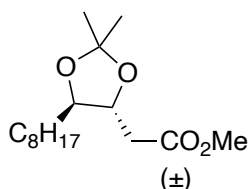
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168,2, 126,6, 89,6, 80,0, 77,3, 77,0, 76,7, 75,4, 69,0, 36,0, 31,8, 29,7, 29,2, 29,1, 22,6, 22,3, 14,1.

IR 2980, 2923, 2854, 1740.

MS (ESI+) calculado para C₁₇H₃₃O₄ [M+H]⁺ = 302,2300 encontrado = 302,22.

8.1.2.8 (\pm)-2-(2,2-Dimetil-5-octil-1,3-dioxolan-4-il)acetato de metilo (9b)

El acetónido (\pm)-9b se aisló como un subproducto de la reacción del diol (\pm)-4 con el 2,2-dimetoxipropano, tras la purificación por cromatografía de columna, en forma de aceite incoloro como parte de una mezcla de los productos (\pm)-9 y (\pm)-9b en una relación 3:1 (65 mg, 65%).



R_f = 0,72 (hexano/AcOEt, 8:2).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,24 – 4,12 (m, 1H), 4,09 – 3,98 (m, 1H), 3,75 – 3,64 (m, 4H), 2,64 – 2,47 (m, 2H), 1,66 – 1,20 (m, 19H), 0,88 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 160,2, 135,6, 122,3, 89,6, 75,4, 69,0, 37,1, 36,6, 34,5, 31,6, 29,7, 28,4, 24,7, 22,7, 14,1.

IR 2980, 2923, 2854, 1740.

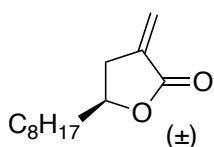
MS (ESI+) calculado para C₁₆H₃₁O₄ [M+H]⁺ = 287,2144 encontrado = 287,23.

8.1.2.9 (\pm)-3-metilen-5-octildihidrofuran-2(3H)-ona (10)

Sobre una mezcla de nonanal (0,125 mL, 0,69 mmol), KI (171,75 mg, 1,04 mmol) y SnCl₂ (235,5 mg, 1,04 mmol) en H₂O (0,175 mL) se añade el (bromometil)acrilato de metilo

(0,125 mL, 1,035 mmol) gota a gota. La mezcla resultante se deja en agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Se extrae con DCM (3x10 mL), se lava la fase orgánica con salmuera (10 mL) y se seca con MgSO₄. Tras la filtración y evaporación del disolvente en el rotavapor se obtiene un aceite amarillo (337 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 95:5, elución isocrática) obteniendo el compuesto deseado como un aceite incoloro (103 mg, 71%).



Rf = 0,57 (hexano/AcOEt, 8:2).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,22 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H), 5,62 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H), 4,57 – 4,46 (m, 1H), 3,11 – 2,99 (m, 1H), 2,63 – 2,48 (m, 1H), 1,86 – 1,67 (m, 1H), 1,67 – 1,52 (m, 1H), 1,52 – 1,14 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,5 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170,4, 134,8, 121,8, 77,6, 36,2, 33,5, 31,8, 29,4, 29,3, 29,1, 24,8, 22,6, 14,0.

IR 2923, 2854, 1759.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₃H₂₃O₂ [M+H]⁺ = 211,1698 encontrada = 211,1697.

8.1.2.10 *trans*-(±)-4-Hidroxi-3-metilen-5-octildihidrofuran-2(3H)-ona, UB010

8.1.2.10.1 Síntesis térmica

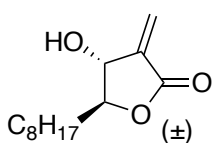
Una suspensión de la lactona (±)-**10** (60 mg, 0,29 mmol) y SeO₂ (38 mg, 0,34 mmol) en THF (2,2 mL) se deja reaccionar a reflujo durante 4,5 h. Se filtra la mezcla de reacción en gel de sílice eluyendo con DCM y se elimina el disolvente por evaporación a presión reducida en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo (65 mg).

El crudo se purifica en cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 8:2 elución isocrática) recuperándose una mezcla 8:2 de (±)-UB010 y (±)-UB011 en forma de aceite amarillo (17 mg, 26%).

8.1.2.10.2 Síntesis asistida por microondas

Una suspensión de la lactona (±)-**10** (200 mg, 0,95 mmol) y SeO₂ (127 mg, 1,14 mmol) en THF (4,4 mL) se deja reaccionar durante 1 h a 90 °C en el reactor de microondas. Se filtra la mezcla de reacción sobre gel de sílice con DCM y se elimina el disolvente por evaporación a presión reducida en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo (320 mg).

El crudo se purifica en cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 8:2 elución isocrática) recuperándose una mezcla 7:3 de (±)-UB010 y (±)-UB011 en forma de aceite amarillo (89 mg, 41%).



Rf = 0,42 (hexano/AcOEt, 8:2).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,41 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz), 5,96 (d, 1H, *J* = 2,3 Hz), 4,54 – 4,49 (m, 1H), 4,30 – 4,22 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,46 (m, 2H), 1,26 (m, 10H), 0,87 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168,7, 138,9, 125,9, 85,5, 73,0, 33,7, 31,8, 29,4, 29,3, 29,2, 24,9, 22,6, 14,1.

IR 3424, 2923, 2853, 2360, 2337, 1746.

HRMS (ESI+) calculado para C₁₃H₂₃O₃ [M+H]⁺ = 227,1647 encontrada = 227,1646.

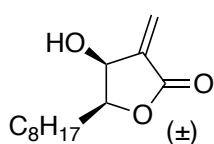
8.1.2.11 Aislamiento de la *cis*-(±)-4-hidroxi-3-metilen-5-octildihidrofuran-2(3H)-ona, UB011

8.1.2.11.1 Reacción térmica

El compuesto se aísla como subproducto de la oxidación alílica de la lactona (±)-**10** en forma de aceite amarillo como mezcla 8:2 de (±)-UB010 y (±)-UB011 (17 mg, 26%).

8.1.2.11.2 Reacción asistida por microondas

El compuesto se aísla como subproducto de la oxidación alílica de la lactona (±)-**10** en forma de aceite amarillo como como mezcla de (±)-UB010 y (±)-UB011 de proporción 7:3 (89 mg, 41%).



R_f = 0,40 (hexane/AcOEt, 8:2).

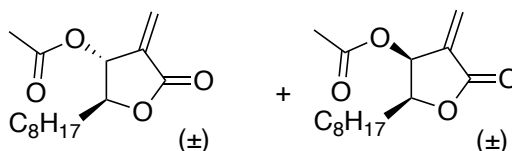
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,39 (bs, 1H), 5,95 (bs, 1H), 4,86 – 4,81 (m, 1H), 4,48 – 4,39 (m, 1H), 1,66 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,26 (s, 10H), 0,68 (t, 3H, *J* = 6,7 Hz).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168,7, 138,9, 126,1, 82,4, 69,4, 33,7, 31,8, 29,4, 29,4, 29,2, 24,9, 22,6, 14,1.

IR 3424, 2923, 2853, 2360, 2337, 1746.

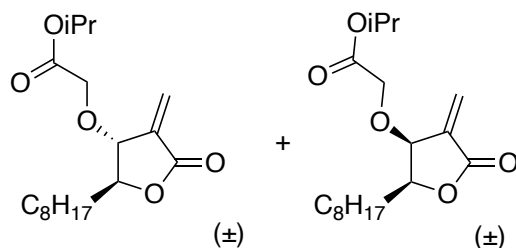
HRMS (ESI+) calculada para C₁₃H₂₃O₃ [M+H]⁺ = 227,1647 obtenida = 227,1646.

8.1.2.12 Intento de síntesis del acetato de (±)-4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-ilo (*trans* y *cis*, Ac-UB010 y Ac-UB011)



Una mezcla 8:2 de (±)-UB010 y (±)-UB011 (11 mg, 0,05 mmol) se disuelve en DCM anhidro (1 mL) atmósfera de nitrógeno. Se enfría la disolución a 0 °C y se añade piridina (4,7 µL, 0,06 mmol) y cloruro de acetilo (4,1 µL, 0,06 mmol). La disolución resultante se deja reaccionar durante 10 minutos a 0 °C y se dejó alcanzar temperatura ambiente para seguir en agitación durante 2 h. Se diluye la mezcla de reacción con DCM (3 mL) y se lava con una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (3 mL) y salmuera (3 mL). Se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite que no se corresponde a la mezcla de productos esperada (16 mg).

8.1.2.13 Intento de obtención del (±)-2-((4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-il)oxi)acetato de isopropilo (trans y cis, iPr-UB010 y iPr-UB011)

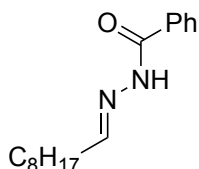


Se disuelve una mezcla 8:2 de (±)-UB010 y (±)-UB011 (23 mg, 0,10 mmol) junto al cloruro de 2-cloroacetato de isopropilo (18 μ L, 0,12 mmol) en DCM anhidro (500 μ L) bajo atmósfera de N_2 . Se añade lentamente la TEA (19 μ L, 0,13 mmol) y se deja agitar a temperatura ambiente durante 2 h. Se lava la mezcla de reacción con agua (3 mL) y una disolución acuosa saturada en NH_4Cl (3 mL) y salmuera (3 mL). Se seca la fase orgánica con $MgSO_4$, se filtra y se elimina el DCM en el rotavapor. Se obtiene un aceite amarillo que no se corresponde a los productos esperados (31 mg).

8.1.2.14 (E)-N'-Nonilidenebenzohidrazida (14)

Se disuelve la benzohidrazida (80,72 mg, 0,58 mmol) en DCM (1 mL) en un matraz de fondo redondo bajo atmósfera de nitrógeno. Se añade el nonanal (100 μ L, 0,58 mmol) y se deja en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente.

Se evapora el disolvente a presión reducida con el rotavapor y se obtiene el producto en forma de aceite transparente (137,67 mg, 91%).



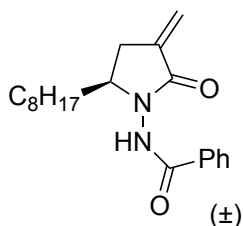
Rf = 0,13 (hexane/AcOEt, 8:2).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,45 (t, J = 6,5 Hz, 1H), 7,35 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 2,33 – 2,21 (m, 2H), 1,52 – 1,41 (m, 2H), 1,38 – 1,19 (m, 12H), 0,92 – 0,83 (m, 3H).

8.1.2.15 N-(3-Metilen-5-octil-2-oxopirrolidin-1-il)benzamida (12)

A una disolución del compuesto **14** (40,35 mg, 0,35 mmol) y Sn (60,25 mg, 0,51 mmol) en EtOH (3,5 mL) un matraz de fondo redondo bajo atmósfera de N_2 se añade nonanal (50 μ L, 0,29 mmol) y la mezcla se calienta a reflujo durante 6 h.

La mezcla de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y se filtra en Celite. Se añade una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (5 mL) y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con DCM (3x5 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre $MgSO_4$ y se filtran. El disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose el compuesto (±)-**12** como un aceite incoloro (78 mg, 82%).



Rf = 0,25 (hexano/AcOEt, 7:3).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,32 (bs, 1H), 7,79 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 7,46 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,34 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 6,10 (t, *J* = 2,2 Hz, 1H), 5,44 (t, *J* = 2,2 Hz, 1H), 4,14 – 4,00 (m, 1H), 3,06 (m, 1H), 2,50 (dd, *J* = 15,6, 3,5 Hz, 1H), 1,85 – 1,74 (m, 1H), 1,47 – 1,18 (m, 13H), 0,87 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

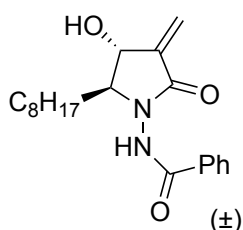
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167,4, 165,6, 136,8, 132,0, 131,0, 128,3, 127,5, 117,8, 56,6, 33,1, 31,8, 30,2, 29,6, 29,5, 29,2, 24,4, 22,6, 14,1.

IR: 2923, 2853, 2360, 2341, 1705, 1674, 1274, 690.

HRMS (ESI+) calculada para C₂₀H₂₉N₂O₂ [M+H]⁺ = 329,2151 obtenida = 329,2215.

8.1.2.16 *trans*-(±)-*N*-(3-Hidroxi-4-metilen-2-octil-5-oxopirrolidin-1-il)benzamida (UB013)

Una mezcla de la lactona (±)-**12** (50 mg, 0,15 mmol) y SeO₂ (20 mg, 0,18 mmol) en THF anhidro (2,2 mL) en un vial de microondas purgado con N₂ se deja reaccionar durante 2 h en el reactor de microondas a 90 °C. Se filtra el crudo en Celite y se evapora el disolvente en el rotavapor. Se obtiene un aceite amarillo (48 mg). El crudo se purifica mediante cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 1:1 elución isocrática) obteniéndose el producto en forma de aceite amarillo como una mezcla 8:2 de los compuestos (±)-UB013 y *cis*-(±)-UB013 (23 mg, 45%).



Rf = 0,19 (hexano/AcOEt, 1:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,50 (bs, 1H), 7,77 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,47 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,33 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 6,27 (s, 1H), 5,85 (s, 1H), 4,07 – 3,61 (m, 1H), 1,96 – 1,60 (m, 4H), 1,62 – 1,08 (m, 11H), 0,86 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

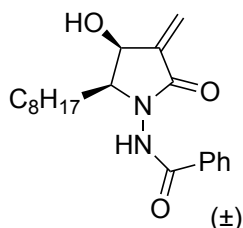
¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 165,3, 165,3, 142,2, 133,6, 132,1, 128,7, 128,0, 118,9, 74,6, 62,4, 31,9, 30,2, 29,6, 29,6, 29,2, 26,3, 22,7, 14,1.

IR 3247, 2923, 2853, 2366, 1704, 1678, 1272, 689.

HRMS (ESI+) calculada para C₂₀H₂₉N₂O₃ [M+H]⁺ = 345,2100 obtenida = 345,2171.

8.1.2.17 *cis*-(±)-*N*-(3-Hidroxi-4-metilen-2-octil-5-oxopirrolidin-1-il)benzamida (*cis*-UB013)

El compuesto se aísla como subproducto de la oxidación alílica de la lactama (±)-**12** en forma de aceite amarillo formando parte de una mezcla 8:2 de (±)-UB013 y *cis*-(±)-UB013 (23 mg, 45%).



Rf = 0,19 (hexano/AcOEt, 1:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,97 (bs, 1H), 7,82 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,47 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,33 (t, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,25 (s, 1H), 5,80 (s, 1H), 4,44 (bs, 1H), 4,04 – 3,97 (m, 1H), 1,82 – 1,75 (m, 4H), 1,53 – 1,11 (m, 10H), 0,86 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 165,3, 165,3, 142,2, 133,6, 132,1, 128,7, 128,0, 118,9, 74,6, 62,4, 31,9, 29,6, 29,5, 29,3, 29,2, 26,3, 22,7, 14,1.

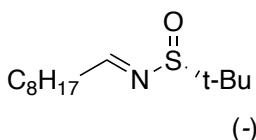
IR 3247, 2923, 2853, 2366, 1704, 1678, 1272, 689.

HRMS (ESI+) calculada para C₂₀H₂₉N₂O₃ [M+H]⁺ = 345,2100 obtenida = 345,2171.

8.1.2.18 (–)-(R,E)-2-Metil-N-nonildenepropano-2-sulfinamida (19)

En un matraz de fondo redondo se disponen el nonanal (200 µL, 1,12 mmol), la (R)-2-metilpropano-2-sulfinamida (136 mg, 1,12 mmol) y el CuSO₄ anhidro (383 mg, 2,50 mmol) en DCM anhidro (3 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión obtenida se deja agitando vigorosamente durante 16 h. Se filtra la papilla sobre Celite y se elimina el DCM en el rotavapor, obteniéndose un aceite transparente (340 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 8:2 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite transparente (260 mg, 95%).



[α]_D = – 192,2 (*c* = 1,0, CHCl₃).

Rf = 0,38 (hexano/AcOEt, 9:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,07 (t, *J* = 4,8 Hz, 1H), 2,55 – 2,48 (m, 2H), 1,67 – 1,57 (m, 2H), 1,27 (m, 12H), 1,19 (s, 9H), 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169,8, 56,5, 36,1, 31,8, 29,3, 29,2, 29,1, 25,5, 22,6, 22,3, 14,1.

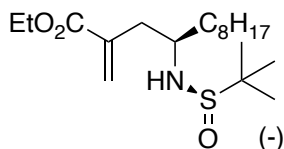
IR: 2955, 2924, 2855, 2359, 2341, 1621, 1457, 1362, 1095, 669, 583.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₃H₂₈NOS [M+H]⁺ = 246,1813 obtenida = 246,1889.

8.1.2.19 (R)-4-(((R)-tert-Butilsulfinil)amino)-2-metildodecanoato de etilo (18)

La sulfinamida (–)-19 (50 mg, 0,20 mmol) se disuelve junto al 2-(bromometil)acrilato de etilo (36 µL, 0,26 mmol) en una disolución acuosa saturada en NaBr (2 mL) y se añade el In en polvo (91,9 mg, 0,8 mmol). La suspensión resultante se deja agitando durante 48 h a temperatura ambiente. Se añade más agua (5 mL) y la mezcla se extrae con AcOEt (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (5 mL), se seca con MgSO₄ y se filtra. El disolvente se elimina a presión reducida obteniendo un aceite transparente (116 mg).

El crudo se purifica mediante cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 7:3 elución isocrática) recuperando el producto en forma de aceite transparente (49 mg, 68%).



$[\alpha]_D = -47,4$ ($c = 1,0$, CHCl_3).

$R_f = 0,18$ (hexano/AcOEt, 7:3).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6,30 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H), 5,69 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H), 4,22 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,51 (d, $J = 5,9$ Hz, 1H), 3,47 – 3,37 (m, 1H), 2,59 (d, $J = 5,9$ Hz, 2H), 1,51 – 1,43 (m, 2H), 1,35 – 1,22 (m, $J = 15\text{H}$), 1,20 (s, 9H), 0,88 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 167,1, 137,9, 127,7, 77,3, 77,0, 76,7, 60,8, 56,7, 56,0, 38,7, 36,6, 31,8, 29,5, 29,4, 29,2, 25,7, 22,6, 14,2, 14,1.

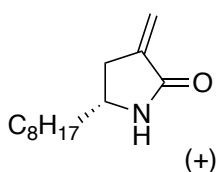
IR: 2932, 2924, 2359, 2341, 1716, 1457, 1364, 1176, 1151, 1055.

HRMS (ESI+) calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 360,5690$ obtenida = 360,2570.

8.1.2.20 (R)-3-Metilen-5-octilpirrolidin-2-ona (16)

En un matraz de fondo redondo bajo atmósfera de N_2 se dispone una disolución 4M de HCl en dioxano (1 mL) y el compuesto (-)-**19** (154 mg, 0,43 mmol) a 0°C . Se deja en agitación durante 2 horas y se deja alcanzar temperatura ambiente lentamente. Se añade una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 hasta pH 10 y se extrae la fase acuosa con AcOEt (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (5 mL) y se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un aceite amarillo (100 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 6:4 elución isocrática) obteniéndose la lactona (-)-**16** como un aceite amarillento (53 mg, 59%).



$[\alpha]_D = +16,1$ ($c = 1,0$, CHCl_3). Estereocentro supuesto?

$R_f = 0,20$ (hexano/AcOEt, 6:4).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6,38 (s, 1H), 5,87 (s, 1H), 4,22 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,45 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H), 2,80 – 2,62 (m, 2H), 1,88 – 1,75 (m, 1H), 1,73 – 1,62 (m, 1H), 1,57 – 1,22 (m, 15H), 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 170,8, 139,8, 115,6, 51,5, 37,3, 33,1, 31,8, 29,4, 29,2, 25,5, 22,6, 14,1.

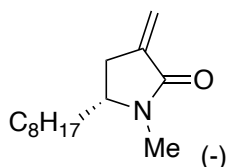
IR 3221, 2924, 2854, 2354, 2341, 1701, 1661, 1066, 668.

HRMS (ESI+) calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 210,1780$ obtenida = 210,1860.

8.1.2.21 (R)-1-Metil-3-metilen-5-octilpirrolidin-2-ona (15)

La lactona (+)-**16** (62 mg, 0,29 mmol) se disuelve en THF anhidro (1,6 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Se añade una disolución preparada previamente de NaH (47 mg, 1,15 mmol) en THF (0,5 mL) y se deja agitar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añade entonces el yoduro de metilo (63 μL , 0,87 mmol) y se deja en

agitación durante 2 h. Se añade agua (5 mL) y se extrae con AcOEt (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (5 mL), se seca sobre MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor, obteniéndose el producto como un aceite amarillo (53 mg, 82%).



[α]_D = - 14,25 (*c* = 1,0, CHCl₃).

R_f = 0,27 (hexano/AcOEt, 6:4).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,95 (s, 1H), 5,28 (s, 1H), 3,62 – 3,39 (m, 1H), 2,90 (s, 3H), 2,88 – 2,81 (m, 1H), 2,42 (d, *J* = 15,5 Hz, 1H), 1,79 – 1,65 (m, 1H), 1,46 – 1,10 (m, 13H), 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168,1, 139,4, 114,7, 56,9, 33,3, 31,8, 30,7, 29,6, 29,5, 29,2, 28,2, 24,0, 22,6, 14,1.

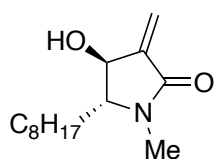
IR 2924, 2854, 2360, 2341, 1685, 1662, 1457, 1435, 1400, 1080, 669.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₄H₂₆NO [M+H]⁺ = 224,1936 obtenida = 224,2009.

8.1.2.22 (4*S*,5*R*)-4-Hidroxi-1-metil-3-metilen-5-octilpirrolidin-2-ona (UB015)

Una suspensión de la lactama (–)-**15** (48 mg, 0,22 mmol) y SeO₂ (28,6 mg, 0,26 mmol) en THF anhidro (2 mL) en un vial de microondas purgado con nitrógeno se deja reaccionar con agitación en microondas durante 2 h a 90 °C. Se filtra el crudo en Celite y se recupera un aceite amarillo (54 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 1:1 elución isocrática) obteniéndose el producto en forma de aceite amarillo (14 mg, 27%).



R_f = 0,10 (hexano/AcOEt, 1:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,16 (s, 1H), 5,66 (s, 1H), 4,39 (s, 1H), 3,33 (dt, *J* = 8,3, 2,6 Hz, 1H), 2,91 (s, 3H), 1,84 – 1,69 (m, 1H), 1,46 – 1,17 (m, 13H), 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 166,1, 143,5, 119,5, 71,1, 66,7, 31,8, 31,1, 29,6, 29,4, 29,2, 28,0, 24,3, 22,6, 14,1.

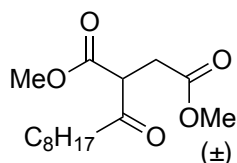
IR 3235, 2923, 2853, 2359, 1705, 1675, 1274, 690, 597.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₄H₂₅NO₂ [M+H]⁺ = 240,1885 obtenida = 240,1962.

8.1.2.23 (±)-2-Nonanoilsuccinato de dimetilo (22)

Se prepara una mezcla de nonanal (54,00 mL, 310 mmol) y maleato de dimetilo (7,72 mL, 61,70 mmol) en un matraz de fondo redondo provisto de un agitador magnético y un refrigerante bajo atmósfera de N₂. Se añade el peróxido de benzoilo (0,6 g, 1,90 mmol) y la mezcla se calienta durante 18 h a 80 °C. A continuación, se añade una segunda porción del peróxido (0,1 g, 0,55 mmol) y se mantiene la calefacción durante 3 h. Se deja enfriar la mezcla de reacción y se añade AcOEt (30 mL) y una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (15 mL). Tras 10 minutos de agitación se separan las fases y la fase

orgánica se lava con agua (3x10 mL) y salmuera (10 mL). Se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor. La mayor parte del exceso de nonanal se elimina por destilación a presión reducida obteniéndose un aceite amarillento (29,5 g). El crudo se purifica mediante cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1 elución isocrática) aislándose el producto **22** en forma de aceite transparente (14,130 g, 80%).



R_f = 0,51 (DCM).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,99 (dd, *J* = 6,3, 8,2 Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 3,68 (s, 3H), 2,98 (dd, *J* = 8,2, 17,6 Hz, 1H), 2,84 (dd, *J* = 6,3, 17,6 Hz, 1H), 2,57 – 2,75 (m, 2H), 1,27 – 1,64 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 204,1, 172,0, 169,2, 54,0, 52,9, 52,2, 43,0, 32,4, 32,0, 29,5, 29,3, 29,2, 23,6, 22,8, 14,3.

IR 2954, 2927, 2856, 1741, 1720, 1457, 1437, 1410, 1367, 1262, 1634, 1012, 668.

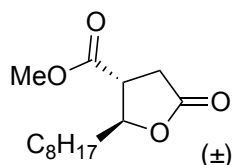
MS (ESI+) calculada para C₁₅H₂₇O₅ [M+H]⁺ = 287,1858 obtenida = 287,19.

8.1.2.24 *trans*-(±)-2-Octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxilato de metilo (21)

La cetona (±)-**22** (1,00 g, 3,49 mmol) se disuelve en MeOH (3,5 mL) bajo atmósfera de N₂ en un matraz de fondo redondo. Se enfría la disolución a 0 °C en un baño de hielo y se añade el NaBH₄ (92 mg, 2,44 mmol) sólido poco a poco. La mezcla se deja agitar durante 40 minutos a temperatura ambiente y se añade una disolución acuosa concentrada de HCl hasta pH 1, la mezcla resultante se deja reaccionar a reflujo durante 1 h.

Se diluye la disolución con DCM (10 mL) y se lava la fase orgánica con salmuera (10 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene una mezcla de las lactonas *cis/trans* (3:1, calculado por RMN, 787 mg, 88%).

La mezcla de isómeros se disuelve en tolueno anhidro (10 mL), se añade DBU (50 µL, 0,33 mmol) y se lleva a 80 °C durante 12 h. Se añade una disolución acuosa de HCl 2M y se extrae con DCM (3x10 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor. Se obtiene un aceite amarillento (1,028 g). El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 8:2 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite transparente (780 mg, 88%).



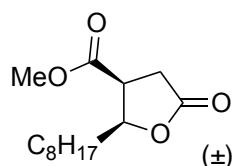
R_f = 0,53 (hexano/AcOEt, 8:2).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,57 (td, *J* = 7,3, 5,0 Hz, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,04 (ddd, *J* = 9,5, 8,7, 7,1 Hz, 1H), 2,92 (dd, *J* = 17,6, 8,7 Hz, 1H), 2,77 (dd, *J* = 17,6, 9,5 Hz, 1H), 1,84 – 1,64 (m, 2H), 1,59 – 1,18 (m, 12H), 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174,3, 171,5, 81,9, 52,6, 45,6, 35,2, 32,1, 31,7, 29,3, 29,1, 29,0, 25,1, 22,6, 14,0.
IR 2953, 2926, 2855, 1790, 1739, 1201.
HRMS (ESI+) calculada para C₁₅H₂₅O₄ [M+H]⁺ = 257,1747
obtenida = 257,1746.

8.1.2.25 *cis*-(±)-2-Octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxilato de metilo (*cis*-21)

El compuesto se aísla como subproducto de la reducción y ciclación de la cetona (±)-22 en forma de aceite incoloro como parte de una mezcla de (±)-21 y *cis*-(±)-21 de proporción variable (53 mg, 7%)



R_f = 0,43 (hexano/AcOEt, 7:3).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,62 (td, *J* = 7,4, 6,3, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,44 (ddd, *J* = 8,7, 7,4, 5,7, 1H), 2,90 (dd, *J* = 17,6, 5,7, 1H), 2,66 (dd, *J* = 17,6, 8,7, 1H), 1,65 – 1,43 (m, 2H), 1,42 – 1,19 (m, 12H), 0,89 (t, *J* = 6,8 Hz 3H).

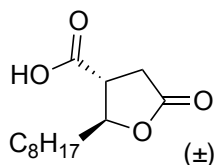
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175,0, 174,8, 171,2, 170,9, 80,7, 80,5, 77,6, 52,4, 52,3, 44,4, 44,4, 31,9, 31,5, 29,5, 29,3, 29,3, 25,9, 22,8, 14,2.

IR 2914, 2851, 1775, 1726, 1241.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₅H₂₅O₄ [M+H]⁺ = 257,1747
obtenida = 257,1746.

8.1.2.26 Ácido *trans*-(±)-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico (20)

El éster metílico (±)-21 (458 mg, 1,79 mmol) se disuelve en una mezcla de THF y una disolución acuosa de NaOH 2M (1:1, 8,6 mL) y se deja en agitación a 70 °C durante 1 h. Se añade HCl concentrado hasta pH 1 y se deja a 70 °C durante otra hora en agitación. Se extrae con DCM (3x5 mL) y la fase orgánica se lava con salmuera (10 mL) y se seca con MgSO₄. El disolvente se evapora a presión reducida obteniéndose el producto esperado en forma de sólido blanco (351 mg, 81%).



R_f = 0,24 (hexano/AcOEt/AcOH, 7:3:0,1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,65 – 4,60 (m, 1H), 3,07 – 3,14 (m, 1H), 2,95 (dd, *J* = 17,9, 8,4 Hz, 1H), 2,83 (dd, *J* = 17,9, 9,6 Hz, 1H), 1,86 – 1,70 (m, 2H), 1,56 – 1,28 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

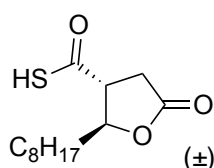
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 177,1, 175,7, 83,0, 46,4, 36,3, 32,9, 32,8, 30,3, 30,2, 30,1, 26,2, 23,6, 15,1.

IR: 3300-3000, 2925, 2853, 1749, 1718, 1393, 1243, 1215, 1195, 759, 669.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₃H₂₂O₄Na [M+Na]⁺ = 265,1410
obtenida = 265,1410.

8.1.2.27 Ácido-*S trans*-(±)-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carbotiónico (19)

Se disuelve el ácido (±)-**20** (100 mg, 0,41 mmol) en un vial de microondas junto al reactivo de Lawesson (93 mg, 0,55 mmol) en DCM (2 mL) y se deja reaccionar en un reactor de microondas a 100 °C durante 20 minutos. Se diluye la mezcla de reacción con DCM (5 mL) y se lava la fase orgánica con una disolución acuosa 2M de HCl (2x5 mL) y salmuera (5 mL). Se seca con MgSO₄, se filtra y el disolvente se elimina en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo (135 mg). El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, DCM/MeOH 9:1, elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite amarillo (66 mg, 62%).



R_f = 0,24 (DCM/MeOH, 9:1).

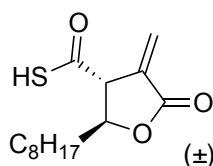
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,63 – 4,55 (m, 1H), 3,34 – 3,23 (m, 1H), 2,98 – 2,73 (m, 2H), 1,83 – 1,71 (m, 2H), 1,54 – 1,21 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 195,3, 173,5, 81,6, 54,9, 35,3, 32,5, 31,8, 29,3, 29,3, 29,1, 25,2, 22,6, 14,1.

IR 3400-3200, 2943, 2856, 1858, 1734, 1439, 1263, 1206, 1195, 732, 673.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₃H₂₃O₃S [M+H]⁺ = 259,1368 obtenida = 269,1372.

8.1.2.28 Intento de síntesis del Ácido-*S trans*-(±)-4-metilen-2-octil-5-oxotetrahydrofuran-3-carbotiónico (UB019).



8.1.2.28.1 Intento con carbonato de metil magnesio

El tioácido (±)-**19** (65 mg, 0,25 mmol) se disuelve en una disolución 2M de carbonato de metil magnesio en DMF (5,2 mL) y se deja en agitación a 130 °C durante 48 h. Se enfría la mezcla de reacción y se añade una disolución acuosa 6M de HCl (10 mL). Se extrae con DCM y se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose una pasta marrón (124 mg). Al crudo resultante se le añade una mezcla de ácido acético (1 mL), acetato de sodio (30 mg, 0,37 mmol) *N*-metilanilina (0,75 mL, 2,39 mmol) y una disolución al 37% de formol en agua (0,75 mL). La suspensión resultante se deja reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió una mezcla 10:1 (10 mL) de una disolución preparada con salmuera y HCl concentrado y DCM (15 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con DCM (3x10 mL). El conjunto de fases orgánicas se lavó con salmuera (10 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor, obteniéndose una suspensión marrón que no contenía el producto deseado (245 mg).

8.1.2.28.2 Intento con 2,2,2-trifluoroacetato de 2,2,2-trifluoroetilo

El tioácido (\pm)-**19** (50 mg, 0,19 mmol) se disuelve en THF (0,8 mL) y se enfría a 0 °C. Se añade una disolución de LiHDMS 1M en THF (2,7 mL, 2,6 mmol) y la mezcla se deja agitar durante 1 h a 0 °C. Se deja que la mezcla de reacción alcance temperatura ambiente, se añade 2,2,2-trifluoroacetato de 2,2,2-trifluoroetilo (56 μ L, 0,42 mmol) y se agita durante 1 h más. La reacción se para por adición de una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (5 mL) al medio y se extrae con AcOEt (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄ y se filtra. El disolvente se evapora a presión reducida obteniéndose un aceite incoloro (220 mg).

Se añade al crudo tolueno (8 mL) junto a éter corona 18-crown-6 (12 mg, 0,04 mmol), K₂CO₃ (80 mg, 0,40 mmol) y paraformaldehído (220 mg, 7,32 mmol). La mezcla resultante se agita durante 1 h a 80 °C y luego a 100 °C durante 3 h más. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade agua. Se extrae con DCM (3x20 mL), se seca la fase orgánica con MgSO₄ y tras el filtrado y la evaporación del disolvente en el rotavapor se obtiene un aceite amarillento que no contiene el producto deseado (132 mg).

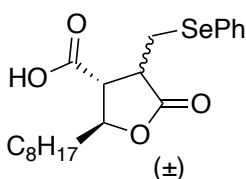
8.1.2.28.3 Intento mediante la sulfuración del C75

Se prepara una disolución con el C75 (25 mg, 0,09 mmol) y el reactivo de Lawesson (27 mg, 0,07 mmol) en DCM anhidro (1,5 mL) en un vial de microondas purgado con N₂. Se deja la mezcla reaccionar durante 10 minutos en un reactor de microondas a 100 °C. Se diluye la disolución con DCM (5 mL), se lava con una disolución acuosa 2M de HCl y salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄ y se filtra. El disolvente se elimina en el rotavapor y se obtiene un aceite amarillo donde no se detecta la presencia del producto (57 mg).

8.1.2.29 Ácido (\pm)-2-octil-5-oxo-4-((fenilselanil)metil)tetrahidrofuran-3-carboxílico (1)

Sobre una disolución de C75 (19 mg, 0,08 mmol) en EtOH (0,25 mL) se añade una mezcla de NaBH₄ (1,7 mg, 0,04 mmol) y Ph₂Se₂ (14 mg, 0,04 mmol) en EtOH (0,25 mL). La disolución resultante se deja reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añade una disolución acuosa 1M de HCl (2 mL) y se evapora el etanol a presión reducida. La fase acuosa se extrae con DCM (3x5 mL), se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄ y se filtra. El disolvente se elimina en el rotavapor obteniéndose un aceite incoloro (30 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt/AcOH 7:3:0,1 elución isocrática) obteniéndose el producto en forma de sólido blanco (24 mg, 78%).



Pf: 116-118 °C

Rf = 0,44 (DCM/MeOH, 9:1).

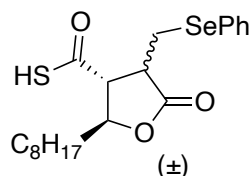
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45 – 7,43 (m, 2H), 7,19 – 7,17 (m, 3H), 4,37 (td, J = 8,8, 4,0 Hz, 1H), 3,38 – 3,32 (m, 1H), 3,15 – 3,09 (m, 1H), 3,03 (dd, J = 10,2, 9,2 Hz, 1H), 1,80 – 1,72 (m, 2H), 1,70 – 1,61 (m, 2H), 1,48 – 1,16 (m, 12H), 0,81 (t, J = 6,6 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176,2, 174,7, 133,0, 129,3, 129,0, 127,6, 79,7, 51,3, 45,3, 34,9, 31,8, 29,3, 29,2, 29,1, 26,9, 25,1, 22,6, 14,0.

IR: 2950-2920, 1762, 1694, 1173.

HRMS (ESI+) calculada para $C_{20}H_{28}O_4SeNa$ $[M+Na]^+$ = 435,1045 obtenida = 435,1042.

8.1.2.30 Intento de síntesis del ácido (\pm) -2-octil-5-oxo-4-((fenilselanil)metil)tetrahidrofuran-3-carbotiónico (23)



Se disuelve el ácido (\pm) -1 (12 mg, 28 mmol) en DCM (2 mL) junto al reactivo de Lawesson (9,1 mg, 22 mmol) en un vial purgado con N_2 y se deja en un reactor de microondas durante 5 minutos a 90 °C. Se diluye la mezcla con DCM (5 mL) y se lava con una disolución acuosa de HCl 2M (5 mL). Se seca la fase orgánica con $MgSO_4$, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo que no se corresponde con el producto deseado (13 mg).

8.1.2.31 *trans*- (\pm) -2-Octil-5-tioxotetrahidrofuran-3-carboxilato de metilo (25)

Se disuelve el éster (\pm) -21 (50 mg, 0,19 mmol) en acetonitrilo (1 mL) junto al P_4S_{10} (12 mg, 0,05 mmol) y HMDSO (70 μ L, 0,33 mmol) bajo N_2 en un vial sellado y se deja reaccionar en el reactor de microondas durante 5 h a 90 °C. Se añade una disolución acuosa saturada en $NaHCO_3$ (5 mL) a la mezcla de reacción y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se extrae la disolución con DCM (3x5 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se seca con $MgSO_4$, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un aceite amarillo (46 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1 elución isocrática) obteniéndose el producto en forma de aceite amarillo (40 mg, 79%).

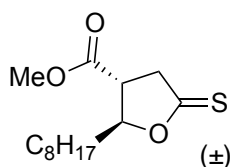
Rf = 0,45 (Hexano/AcOEt, 9:1).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,04 – 4,93 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,41 – 3,34 (m, 2H), 3,18 – 3,05 (m, 1H), 1,87 – 1,77 (m, 2H), 1,39 – 1,21 (m, 12H), 0,88 (t, J = 6,9 Hz, 3H).

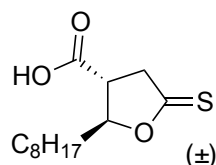
^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 218,6, 171,0, 91,3, 52,7, 47,7, 47,4, 34,7, 31,8, 29,3, 29,2, 29,1, 25,1, 22,6, 14,1.

IR 2924, 2855, 2359, 2343, 1739, 1436, 1311, 1189.

HRMS (ESI+) calculada para $C_{14}H_{25}O_3S$ $[M+H]^+$ = 273,1524 obtenida = 273,1522.



8.1.2.32 Intento de síntesis del ácido *trans*- (\pm) -2-octil-5-tioxotetrahidrofuran-3-carboxílico (24)



Una mezcla del éster (±)-**25** (10 mg, 0,04 mmol), LiCl (8 mg, 0,19 mmol) y TEA (25,7 μ L, 0,19 mmol) en THF (1 mL) y (60 μ L) y se agita durante 3 h a temperatura ambiente. Se añade una disolución acuosa 2M de HCl (3 mL) y se extrae con DCM (3x2 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (5 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniéndose un aceite incoloro en el que no se detecta el producto buscado (10 mg).

8.1.2.33 *trans*-(±)-2-Octil-5-oxotetrahydrofuran-3-carboxilato de alilo (26)

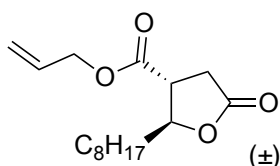
Se calienta una muestra del ácido (±)-**20** (194 mg, 0,80 mmol), ácido *para*-toluensulfónico (38 mg, 0,22 mmol) y alcohol alílico (136 μ L, 2,00 mL) en tolueno anhidro (7 mL) en un montaje de tipo Dean-Stark bajo N₂. Se dejó reaccionar a reflujo con agitación durante 16 h y se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (5 mL). La mezcla se extrajo con DCM (3x5 mL) y el conjunto de fases orgánicas se lavó con salmuera (10 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se eliminó el disolvente en el rotavapor obteniéndose un aceite naranja (180 mg).

El crudo se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite amarillo (120 mg, 52%).

R_f = 0,15 (Hexano/AcOEt, 9:1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,03 – 5,83 (m, 1H), 5,38 – 5,24 (m, 2H), 4,65 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H), 4,62 – 4,55 (m, 1H), 3,12 – 3,01 (m, 1H), 2,98 – 2,88 (m, 1H), 2,84 – 2,74 (m, 1H), 1,84 – 1,64 (m, 2H), 1,52 – 1,20 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

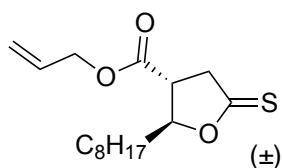
MS (ESI+) calculada para C₁₆H₂₇O₄ [M+H]⁺ = 283,1909 obtenida = 283,21.



8.1.2.34 *trans*-(±)-2-Octil-5-tioxotetrahydrofuran-3-carboxilato de alilo (27)

Una mezcla de éster alílico (±)-**26** (39 mg, 0,14 mmol), P₄S₁₀ (10 mg, 0,04 mmol) y HMDSO (60 μ L, 0,28 mmol) en acetonitrilo (1 mL) se dispone en un vial sellado bajo N₂. La mezcla se deja reaccionar en un reactor de microondas durante 1 h a 90 °C. Se añade una disolución acuosa saturada en Na₂CO₃ (3 mL) y se extrae con DCM (3x3 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo (54 mg).

El crudo se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 7:3 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite amarillo (28 mg, 67%).



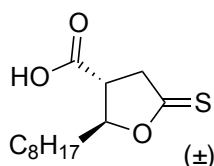
R_f = 0,88 (Hexano/AcOEt, 7:3).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,00 – 5,82 (m, 1H), 5,40 – 5,25 (m, 2H), 4,65 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H), 4,62 – 4,55 (m, 1H), 3,10 – 3,02 (m, 1H), 2,98 – 2,88 (m, 1H), 2,84 – 2,74 (m, 1H), 1,83 – 1,66 (m, 2H), 1,53 – 1,18 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 218,6, 170,2, 131,2, 119,3, 91,3, 66,3, 47,7, 47,5, 34,7, 31,8, 29,3, 29,2, 29,1, 25,1, 22,6, 14,1.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₆H₂₇O₃S [M+H]⁺ = 299,1645 obtenida = 299,1674.

8.1.2.35 Intento de hidrólisis del éster alílico (±)-27

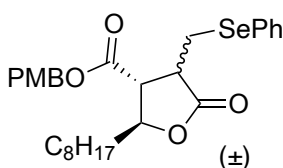


Una mezcla de éster (±)-27 (28 mg, 0,09 mmol), Pd(Ph₃)₄ (4 mg, 4%mol.) y PPh₃ (2 mg, 8%mol.) se disuelve en DCM anhidro (1 mL). Una disolución de pirrolidina (12 μL, 0,15 mmol) en DCM (0,5 mL) se añade a la mezcla de reacción y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Se añade una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ (3 mL) y se extrae con DCM (3x5 mL). El conjunto de fases orgánicas se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo (43 mg) cuyo RMN no muestra señales correspondientes al producto esperado.

8.1.2.36 (±)-2-Octil-5-oxo-4-((fenilselanyl)metil)tetrahydrofuran-3-carboxilato de 4-metoxibencilo (29)

El ácido (±)-1 (160 mg, 0,38 mmol) se disuelve junto a EDC·HCl (129 mg, 0,67 mmol) y DMAP (4 mg, 0,03 mmol) en DCM anhidro (2,7 mL). Se añade el alcohol *p*-metoxibencílico (47 μL, 0,38 mmol) y se deja agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente. Se añade una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (5 mL) y se extrae con DCM (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente obteniéndose un aceite amarillo (82 mg).

El crudo se purificó mediante cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 7:3 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite amarillo (69 mg, 33%).



R_f = 0,45 (Hexano/AcOEt, 9:1).

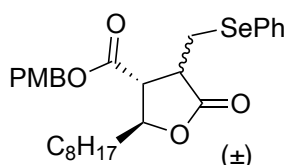
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,49 – 7,44 (m, 2H), 6,92 – 6,85 (m, 2H), 5,08 (s, 3H), 4,45 – 4,33 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,44 – 3,31 (m, 2H), 3,16 – 2,98 (m, 2H), 1,75 – 1,66 (m, 2H), 1,37 – 1,19 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 174,8, 170,6, 159,9, 133,0, 130,3, 129,2, 127,5, 127,1, 114,0, 79,9, 67,3, 55,3, 51,9, 45,7, 34,8, 31,8, 29,3, 29,1, 26,9, 25,0, 22,6, 14,1.

IR 2926, 2854, 2355, 2337, 1175, 1733, 1515, 1249, 1172.

HRMS (ESI+) calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{Se}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 533,1806$ obtenida = 533,1812.

8.1.2.37 Intento de síntesis del (\pm)-2-octil-4-((fenilselanil)metil)-5-tioxotetrahidrofuran-3-carboxilato de 4-metoxibencilo (28)



Una mezcla del compuesto (\pm)-**29** (69 mg, 0,13 mmol), P_4S_{10} (15 mg, 0,04 mmol) y HMDSO (47 μL , 0,22 mmol) en un vial sellado en acetonitrilo (0,7 mL) bajo N_2 . La mezcla se deja reaccionar en un reactor de microondas durante 4 h a 90 $^\circ\text{C}$. Se añade una disolución acuosa saturada en NaHCO_3 (3 mL) y se extrae con AcOEt (3x3 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo que no corresponde al producto esperado (54 mg).

8.1.2.38 *trans*-(\pm)-2-Octil-5-oxotetrahidrofuran-3-carboxilato de 4-metoxibencilo (30)

El ácido (\pm)-**20** (168 mg, 0,69 mmol) junto a EDC·HCl (214 mg, 1,38 mmol) y DMAP (9 mg, 0,03 mmol) se disuelve en DCM anhidro (6 mL). Se añade el alcohol *p*-metoxibencílico (105 μL , 0,83 mmol) y se deja agitar la mezcla durante 16 horas a temperatura ambiente. Se añade una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (5 mL) y se extrae con DCM (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente obteniéndose un aceite amarillo (318 mg).

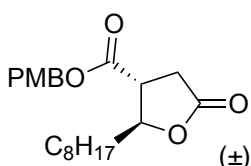
El crudo se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 7:3 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite amarillo (201 mg, 80%).

R_f = 0,25 (Hexano/AcOEt, 7:3).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,28 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,89 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 5,21 – 4,98 (m, 2H), 4,61 – 4,45 (m, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,11 – 2,99 (m, 1H), 2,97 – 2,84 (m, 1H), 2,82 – 2,67 (m, 1H), 1,78 – 1,62 (m, 2H), 1,51 – 1,18 (m, 12H), 0,88 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H).

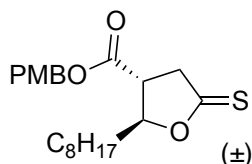
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 175,0, 170,3, 159,9, 130,6, 128,6, 127,1, 114,0, 80,6, 67,0, 55,2, 44,2, 31,8, 31,2, 29,3, 29,2, 25,7, 22,6, 14,1.

IR 2969, 2926, 2855, 2360, 2341, 1754, 1723, 1515, 1216, 1034, 823, 527.



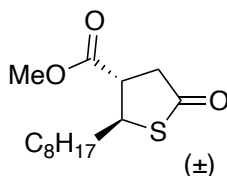
HRMS (ESI+) calculada para C₂₀H₂₉O₅ [M+H]⁺ = 349,2015
obtenida = 349,2010.

8.1.2.39 *Intento de síntesis del trans-(±)-2-octil-5-tioxotetrahidrofuran-3-carboxilato de 4-metoxibencilo (31)*



Una mezcla del éster (±)-**30** (57 mg, 0,16 mmol), P₄S₁₀ (20 mg, 0,05 mmol) y HMDSO (60 μL, 0,28 mmol) se disuelve en acetonitrilo (1,3 mL) bajo N₂ en un vial sellado. La mezcla se deja reaccionar en un reactor de microondas durante 4 h a 90 °C. Se añade una disolución acuosa saturada en NaHCO₃ (3 mL) y se extrae con AcOEt (3x3 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo (83 mg). En el RMN de ¹H del crudo no se detectó el producto esperado.

8.1.2.40 *Intento de síntesis del trans-(±)-2-octil-5-oxotetrahidrotiofen-3-carboxilato de metilo (33)*



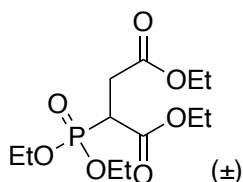
Se disuelve el compuesto (±)-**25** (55 mg, 0,20 mmol) en tolueno anhidro (1 mL) bajo N₂ y se añade el BF₃·Et₂O (3 μL, 0,02 mmol). La disolución resultante se calienta a reflujo durante 24 horas. Una vez enfriada la mezcla, se añade una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 mL) y se extrae con DCM (3x5 mL). El conjunto de las fases orgánicas se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄ y se filtra. El disolvente se elimina en el rotavapor obteniéndose un aceite amarillo (45 mg) que no contenía el producto deseado.

8.1.2.41 *(±)-2-(Dietoxifosforil)succinato de dietilo (34)*

Se añade NaHMDS (1M en THF, 4,9 mL, 4,90 mmol) a THF anhidro (5 mL) en un matraz de fondo redondo provisto de agitador magnético bajo N₂. Se enfría la mezcla a -78 °C y se añade el 2-(dietoxifosforil)acetato de etilo (0,9 mL, 4,46 mmol) disuelto en THF (5 mL) y se deja atemperar la mezcla para dejarla en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente.

La mezcla se enfría a 0 °C y se añade el 2-bromoacetato de etilo (0,5 mL, 4,46 mmol). La mezcla se deja entonces en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Se añade a la disolución una mezcla (1:1) de hexano y agua (10 mL), se separan las fases y la fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄ y se evapora el disolvente a

presión reducida obteniéndose el producto en forma de aceite transparente (1,343 g, 97%).



R_f = 0,25 (Hexano/AcOEt, 7:3).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,17 (ddd, *J* = 9,0, 6,0, 6,0 Hz, 1H), 4,30 – 4,07 (m, 8H), 2,93 (d, *J* = 6,6 Hz, 2H), 1,36 (td, *J* = 7,2, 1,2 Hz, 3H), 1,33 (td, *J* = 7,2, 1,2 Hz, 3H), 1,30 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,27 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169,0 (d, *J* = 4,4 Hz), 168,9, 71,7 (d, *J* = 5,9 Hz), 64,3 (d, *J* = 5,7 Hz), 64,1 (d, *J* = 5,7 Hz), 61,9, 61,1, 38,1 (d, *J* = 5,7 Hz), 16,0 (d, *J* = 7,2 Hz), 14,1, 14,0.

IR 2984, 2940, 1737, 1447, 1374, 1239, 1178, 1094, 1019, 982.

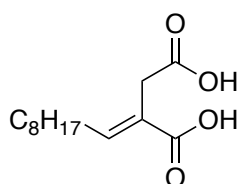
HRMS (ESI+) calculada para C₁₂H₂₃O₈PNa [M+Na]⁺ = 349,1023 obtenida = 349,1022.

8.1.2.42 Ácido 2-Nonildenosuccínico (36)

El diéster (±)-**34** (1,343 g, 4,30 mmol) se disuelve en THF anhidro bajo atmósfera de N₂ y se enfría a -78 °C. Sobre la disolución se añade lentamente LDA (2M en THF, 3,5 mL, 7,00 mmol) y se deja alcanzar los 0 °C donde se mantiene en agitación durante 40 minutos. Se añade el nonanal (0,75 mL, 4,30 mmol) y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Se añade agua (10 mL) a la mezcla de reacción y se evapora el THF a presión reducida. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3x5 mL), se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄ y se evapora el disolvente obteniéndose un aceite transparente (1,311 g).

El crudo se disuelve en una mezcla 10:1 de agua y ácido trifluoroacético (10 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 3 h. Se evapora el TFA en el rotavapor, se añade al residuo una disolución acuosa al 10% de NaOH (10 mL) y etanol (10 mL) y la disolución resultante se calienta a reflujo con agitación durante 16 horas. A la mañana siguiente se acidifica la disolución con HCl concentrado hasta pH 1 y se extrae con AcOEt (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite transparente (2,83 g).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt/AcOH 7:3:0,1 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite transparente (262 mg, 25%).



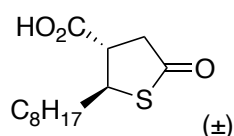
R_f = 0,10 (Hexano/AcOEt/AcOH, 7:3:0,1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,58 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 3,36 (s, 2H), 1,1 – 1,6 (m, 14H), 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

MS (ESI+) calculada para C₁₃H₂₃O₄ [M+H]⁺ = 243,1596 obtenida = 243,21.

8.1.2.43 Ácido trans-(±)-2-octil-5-oxotetrahydrofuran-3-carboxílico (32)

Una mezcla de diácido **36** (262 mg, 1,06 mmol) y ácido tioacético (0,4 mL, 4,45 mmol) se disuelve en THF anhidro (15 mL) bajo atmósfera de N₂ y se mantiene a reflujo con agitación durante 3 días. Se elimina el THF a presión reducida en el rotavapor. Se añade al aceite resultante una disolución acuosa 6M de HCl (10 mL) y se deja reaccionar a reflujo durante 6 h. Se elimina el agua de la mezcla a presión reducida y se añade ácido trifluoroacético (8 mL), la disolución resultante se mantiene a reflujo durante 1 h. El ácido TFA junto al resto de volátiles se eliminan en el rotavapor para dar un aceite amarillo (240 mg). El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt/AcOH 6:4:0,5 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite transparente (171 mg, 62%).



Rf = 0,25 (Hexano/AcOEt/AcOH, 6:4:0,5).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,13 (m, 1H), 3,10 (m, 1H), 2,83 – 3,04 (m, 2H), 1,1 – 2,1 (m, 14H), 0,86 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

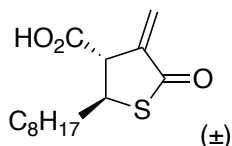
MS (ESI+) calculada para C₁₃H₂₃O₃S [M+H]⁺ = 259,1368 obtenida = 259,11.

8.1.2.44 Ácido *trans*-(±)-4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrotiofen-3-carboxílico (SC75)

Una mezcla de tiolactona (±)-**32** (171 mg, 0,66 mmol) y solución 2M de carbonato de metil magnesio en DMF (3,7 mL) se calienta bajo agitación a 140 °C durante 3 días. Se enfría la mezcla de reacción y se vierte sobre una disolución acuosa fría 6M de HCl (10 mL). Se extrae con DCM y se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose una pasta marrón (183 mg).

Al crudo resultante se le añade una mezcla de ácido acético (1 mL), acetato de sodio (30 mg, 0,37 mmol) N-metilanilina (0,75 mL, 2,39 mmol) y una disolución al 37% de formol en agua (0,75 mL). La suspensión resultante se deja reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente.

Se extrajo el crudo con éter etílico (3x5 mL), se seca el disolvente con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose el producto en forma de aceite amarillento (58 mg, 32%).



Rf = 0,13 (Hexano/AcOEt/AcOH, 8:2:0,1).

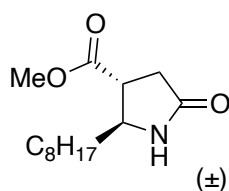
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,18 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 5,60 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 4,08 (dt, *J* = 9,3 5,1 Hz, 1H), 3,71 (dt, *J* = 2,3, 5,1 Hz, 1H), 1,1 – 2,1 (m, 14H), 0,86 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 195,4, 175,3, 142,1, 120,1, 53,0, 47,0, 36,9, 31,7, 29,2, 29,1, 28,3, 27,6, 22,6, 14,0.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₄H₂₄O₃S [M+H]⁺ = 272,1446 obtenida = 272,1532.

8.1.2.45 *trans*-(±)-2-Octil-5-oxopirrolidin-3-carboxilato de metilo (39)

A una disolución de la cetona (\pm)-**22** (500 mg, 1,75 mmol) en MeOH (10 mL) se le añade acetato de amonio (1,349 g, 17,48 mmol) y NaBH₃CN (110 mg, 1,75 mmol) y se agita la mezcla resultante durante 48 h a temperatura ambiente. Se elimina el metanol a presión reducida y el crudo se suspende en tolueno (10 mL). La mezcla se deja en agitación a reflujo durante 48 horas. Se evapora el tolueno en el rotavapor y se redissuelve el crudo en DCM (10 mL). Se lava la fase orgánica con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor, obteniéndose la lactama como un sólido blanco (393 mg, 88%).



Pf: 55-58 °C

Rf = 0,30 (DCM/MeOH 98:2).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,83 (dd, J = 13,0, 5,9 Hz, 1H), 3,72 (s, 3H), 2,95 – 2,86 (m, 1H), 2,73 – 2,55 (m, 2H), 1,69 – 1,47 (m, 2H), 1,35 – 1,24 (m, 12H), 0,86 (t, J = 6,8 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175,6, 173,2, 57,2, 52,3, 45,0, 36,4, 33,8, 31,8, 29,3, 29,2, 29,1, 25,6, 25,5, 14,0.

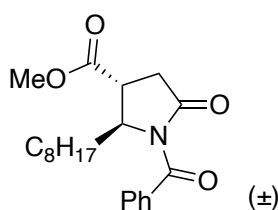
IR 2951, 2914, 2848, 1730, 1692.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₄H₂₆NO₃ [M+H]⁺ = 256,1907 obtenida = 256,1900.

8.1.2.46 *trans*-(\pm)-1-Benzoil-2-octil-oxopirrolidin-3-carboxilato de metilo (**38**)

Se disuelve el compuesto (\pm)-**39** (100 mg, 0,39 mmol) en THF anhidro (4 mL) bajo N₂ y se enfría a –78 °C. Se añade lentamente el *n*-BuLi (192 μ L, 0,48 mmol) y se deja 1 h en agitación. Se añade cloruro de benzoilo (56 μ L, 0,48 mmol) y se deja otra hora en agitación a –78 °C. Después se deja que la mezcla alcance temperatura ambiente y se añade una disolución acuosa 2M de HCl (10 mL) y se deja en agitación durante 30 minutos. Se extrae con DCM (3x5 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄ y se filtra. El disolvente se evapora en el rotavapor obteniéndose un aceite transparente (167 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, DCM elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite transparente (80 mg, 57%).



Rf = 0,35 (DCM).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,58 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,51 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,40 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 4,68 – 4,59 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,08 – 2,97 (m, 1H), 2,85 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 2,06 – 1,93 (m, 1H), 1,76 – 1,61 (m, 1H), 1,51 – 1,18 (m, 12H), 0,87 (t, J = 6,8 Hz, 3H).

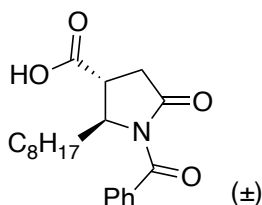
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 175,6, 173,2, 57,2, 52,3, 45,0, 36,4, 33,8, 31,8, 29,3, 29,2, 29,1, 25,6, 25,5, 14,0.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173,2, 172,5, 170,3, 134,5, 132,0, 128,8, 127,9, 60,7, 52,7, 40,2, 34,6, 33,2, 31,8, 29,4, 29,3, 29,1, 24,9, 22,6, 14,1.

IR 2923, 2853, 1736, 1674, 1448, 1437, 1284, 1199, 670.

HRMS (ESI+) calculada para $C_{21}H_{30}NO_4$ $[M+H]^+$ = 360,2175 obtenida = 360,2232.

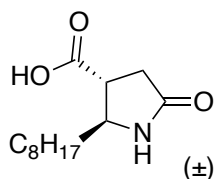
8.1.2.47 Intento de síntesis del ácido *trans*-(±)-1-benzoil-2-octil-5-oxopirrolidin-3-carboxílico (37)



Una muestra de éster metílico (±)-**38** (80 mg, 0,22 mmol) se disuelve en una mezcla 2:1 de THF y H_2O (0,75 mL) y se añade NaOH (9 mg, 0,22 mmol). La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Se acidifica la mezcla con HCl concentrado hasta pH 1 y se extrae con DCM (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con $MgSO_4$, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite transparente (57 mg). El RMN de 1H del crudo es complejo y no se corresponde al producto esperado.

8.1.2.48 Ácido *trans*-(±)-2-octil-5-oxopirrolidin-3-carboxílico (40)

A una muestra de éster metílico (±)-**39** (465 mg, 1,82 mmol) se añade una mezcla 2:1 de THF y H_2O (10,5 mL) y NaOH (76 mg, 1,90 mmol). La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Se acidifica entonces con HCl concentrado hasta pH 1 y se extrae con DCM (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (10 mL), se seca con $MgSO_4$, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose el producto en forma de aceite amarillo (426 mg, 97%).



Rf = 0,10 (DCM).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3,89 (q, J = 6,1 Hz, 1H), 2,97 – 2,87 (m, 1H), 2,82 – 2,71 (m, 1H), 2,71 – 2,59 (m, 1H), 1,73 – 1,61 (m, 1H), 1,61 – 1,48 (m, 1H), 1,42 – 1,18 (m, 12H), 0,88 (t, J = 6,6 Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 177,1, 176,6, 57,8, 44,8, 36,4, 33,5, 31,8, 29,4, 29,3, 29,2, 25,7, 22,6, 14,1.

IR 3500-3100, 2924, 2854, 1736, 1674, 1448, 1436, 1284, 1199, 698.

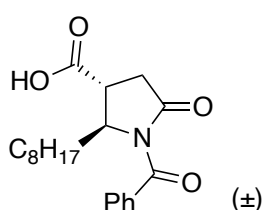
HRMS (ESI-) calculada para $C_{13}H_{22}NO_3$ $[M-H]^-$ = 240,1756 obtenida = 240,1607.

8.1.2.49 Ácido *trans*-(±)-1-benzoil-2-octil-5-oxopirrolidin-3-carboxílico (37)

Se disuelve el ácido (±)-**40** (100 mg, 0,41 mmol) en THF anhidro (3 mL) bajo N_2 a $-78^\circ C$. Se añade el *n*-BuLi lentamente (1,2 M en THF, 740 μL , 0,88 mmol) y se agita la disolución durante 1 h. Se añade el cloruro de benzoilo (115 μL , 0,95 mmol) y se deja en agitación

durante 2 h a la misma temperatura. Se deja que la mezcla alcance temperatura ambiente y se añade una disolución acuosa 2M de HCl (10 mL) manteniendo la agitación durante 30 minutos. La mezcla se extrae con DCM (3x5 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄ y se filtra. El disolvente se evapora en el rotavapor obteniéndose un aceite transparente (311 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, DCM/MeOH 98:2 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite transparente (62 mg, 44%).



R_f = 0,18 (DCM/MeOH 98:2).

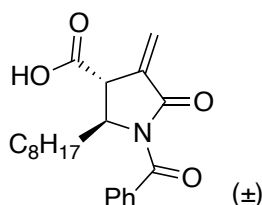
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,09 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,60 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,46 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 3,99 – 3,86 (m, 1H), 2,99 – 2,88 (m, 1H), 2,86 – 2,76 (m, 1H), 2,75 – 2,63 (m, 1H), 1,77 – 1,17 (m, 14H), 0,88 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 177,3, 171,5, 133,6, 130,1, 128,4, 57,9, 44,8, 36,4, 33,5, 31,8, 29,4, 29,4, 29,3, 29,2, 29,2, 25,7, 22,6, 14,1.

IR 3500-3200, 2923, 2854, 1743, 1603, 1266, 1175, 711, 655.

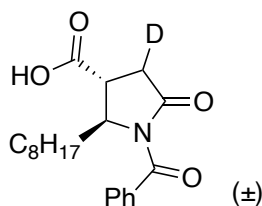
MS (ESI-) calculada para C₂₀H₂₆NO₄ [M-H]⁻ = 344,1862 obtenida = 344,19.

8.1.2.50 Intento de síntesis del *trans*-(±)-1-benzoil-4-metilen-2-octil-5-oxopirrolidin-3-carboxílico (UB021)



El tioácido (±)-**19** (62 mg, 0,18 mmol) se disuelve en una disolución 2M de carbonato de metil magnesio en DMF (5,2 mL) y se deja en agitación a 145 °C durante 48 h. Se enfría la mezcla de reacción y se añade una disolución acuosa 6M de HCl (10 mL). Se extrae con DCM y se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose una pasta marrón (94 mg). Al crudo resultante se le añade una mezcla de ácido acético (0,5 mL), acetato de sodio (15 mg, 0,18 mmol) N-metilanilina (0,38 mL, 1,20 mmol) y una disolución al 37% de formol en agua (0,38 mL). La suspensión resultante se deja reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió una mezcla 10:1 (5 mL) de una disolución preparada con salmuera y HCl concentrado y DCM (10 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con DCM (3x10 mL). El conjunto de fases orgánicas se lavó con salmuera (10 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un aceite amarillo que no contenía el producto deseado (89 mg).

8.1.2.51 Intento de síntesis del ácido *trans*-(±)-1-benzoil-2-octil-5-oxopirrolidin-3-carboxílico-4-d (D-37)



La lactama (±)-**37** (20 mg, 0,06 mmol) se disuelve en THF anhidro (0,30 mL) bajo atmósfera de N₂ y se enfría la disolución a -78 °C. Se añade lentamente la LiHDMS (1M en THF, 280 µL, 0,28 mmol) y se deja reaccionar durante 1h.

Se añade D₂O (1 mL) y se extrae con AcOEt (3x2 mL). Se lava con salmuera (5 mL) y se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen un aceite amarillento (14 mg) que no se corresponde al producto esperado.

8.1.2.52 Ácido (±)-3-(1,1-dihidroxinil)glutárico di-γ-lactona (**38**)

En un matraz de fondo redondo de dos bocas provisto de refrigerante se calienta el anhídrido nonanoico (10,73 mL, 34,05 mmol) durante 8 h bajo atmósfera de N₂. Se añade el ácido tricarbálico (1,8 g, 10,22 mmol) en tres porciones a lo largo de 1 h. Se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se añade hexano (30 mL). La disolución resultante se enfría en un baño de hielo y el sólido precipitado se filtra y se lava con hexano a 0 °C obteniéndose el producto deseado en forma de sólido blanco (1,1 g, 42%).

P_f = 201-202 °C

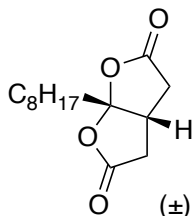
R_f = 0,45 (Hexano/AcOEt 6:4).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,15 – 3,06 (m, 1H), 2,99 (dd, *J* = 18,4, 9,5 Hz, 2H), 2,54 (dd, *J* = 18,4, 4,4 Hz, 2H), 2,03 – 1,93 (m, 2H), 1,59 – 1,19 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 175,5, 116,8, 38,5, 38,1, 36,2, 33,0, 30,5, 30,5, 30,3, 23,9, 23,7, 14,4.

IR 2853, 1789, 1225, 1474.

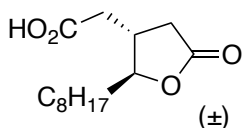
HRMS (ESI+) calculada para C₁₄H₂₃O₄ [M+H]⁺ = 255,1591 obtenida = 255,1589.



8.1.2.53 Ácido (±)-trans-tetrahidro-2-octil-5-oxo-3-furanacético (**39**)

Se suspende la dilactona (±)-**38** (1,070 g, 4,21 mmol) en una solución acuosa de KOH 2M y se calienta la mezcla a 60 °C hasta la completa disolución del compuesto. Se añade el NaBH₄ (191 mg, 5,05 mmol) en pequeñas porciones y se aumenta la temperatura a 85 °C, manteniendo la mezcla en agitación durante 5 h. Se deja enfriar la disolución a temperatura ambiente y se añade HCl concentrado hasta pH 1. Se extrae con DCM (2x10 mL). El conjunto de las fases orgánicas se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se concentra a sequedad. El aceite que se obtiene se deja en agitación con hexano (5 mL) durante 10 minutos. Una vez evaporado el hexano, se resuspende el aceite en THF (10 mL) y H₂O (2 mL) y se añade ácido trifluoroacético (0,1 mL, 1,30 mmol) y se mantiene a reflujo durante 2 h. Se evapora el THF a presión reducida, se añade agua (5 mL) y se extrae con DCM (3x5 mL). La combinación de las fases orgánicas se lava con

salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente obteniéndose el producto en forma de sólido blanco (980 mg, 91%).



P_f = 57-59 °C

R_f = 0,22 (Hexano/AcOEt/AcOH 8:2:0,1).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,30 – 4,06 (m, 1H), 2,85 (dd, *J* = 17,7, 8,4 Hz, 1H), 2,69 – 2,42 (m, 3H), 2,32 (dd, *J* = 17,7, 7,5 Hz, 1H), 1,87 – 1,12 (m, 14H), 1,14 – 0,67 (m, 3H).

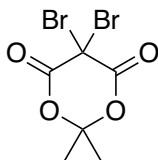
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176,7, 176,3, 85,1, 77,5, 77,2, 76,8, 37,0, 37,0, 34,9, 34,5, 31,9, 29,5, 29,4, 29,3, 25,5, 22,7, 14,2.

IR 3072, 2923, 2858, 1773, 1715, 1399.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₄H₂₅O₄ [M+H]⁺ = 257,1747
obtenida = 257,1742.

8.1.2.54 5,5-Dibromo-2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (44)

Se disuelve el ácido de Meldrum (3,0 g, 20,81 mmol) en una disolución acuosa 2M de NaOH (20 mL). Se enfría la disolución a 0 °C y se añade el Br₂ (8,0 g, 50,06 mmol) gota a gota. Se deja en agitación durante 20 minutos y el sólido obtenido se filtra y se lava con agua enfriada a 0 °C. Se obtiene así el producto en forma de sólido amarillento (4,4 g, 70%).



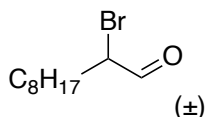
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1,88 (s, 6H).

MS (ESI+) calculada para C₆H₇Br₂O₄ [M+H]⁺ = 302,9247
obtenida = 302,91.

8.1.2.55 (±)-2-Bromodecanal (43)

Se disuelve el compuesto **44** en éter (3,894 g, 12,90 mmol) junto al decanal recién destilado (3,340 g, 21,38 mmol) y se añade una disolución acuosa 3,7 mM de H₂SO₄ en éter (0,10 mL). La mezcla resultante se deja en agitación a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añade una disolución acuosa saturada en NaHCO₃ y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3x5 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se lava con salmuera (10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente por destilación a presión reducida obteniéndose un aceite amarillento (4,480 g).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, Hexano/AcOEt 95:5 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite transparente (2,800 g, 56%).



R_f = 0,38 (Hexano/AcOEt 95:5).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9,43 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H), 4,26 – 4,17 (m, 1H), 2,11 – 1,98 (m, 1H), 1,96 – 1,85 (m, 1H), 1,64 – 1,17 (m, 12H), 0,88 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 192,8, 55,5, 31,8, 31,7, 29,2, 29,1, 28,9, 26,9, 22,6, 14,1.

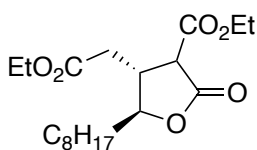
IR 2923, 2856, 1805, 1729, 1464, 1377, 1197, 722.

HRMS (ESI+) calculada para C₁₀H₂₀BrO [M+H]⁺ = 235,0619 obtenida = 235,0619.

8.1.2.56 4-(2-Etoxi-2-oxoetil)-5-octil-2-oxotetrahidrofuran-3-carboxilato de etilo (42)

Se prepara una disolución con el aldehído (±)-**43** (4,263 g, 18,12 mmol), monoetil malonato de potasio (6,000 g, 35,25 mmol) y Bu₄NBr (283 mg, 0,88 mmol) en una mezcla 1:1 de THF y H₂O (34 mL). La mezcla resultante se deja reaccionar a reflujo durante 24 h. Se enfría la disolución y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con éter etílico (3x10 mL). El conjunto de las fases orgánicas se lava con salmuera (3x10 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un aceite amarillento (5,341 g).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, Hexano/AcOEt 85:15 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite transparente (3,318 g, 51%).



R_f = 0,13 (Hexano/AcOEt 85:15).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,33 – 4,08 (m, 5H), 3,52 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 3,03 – 2,88 (m, 1H), 2,64 – 2,41 (m, 2H), 1,80 – 1,19 (m, 20H), 0,92 – 0,82 (m, 3H).

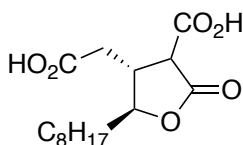
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170,8, 170,4, 167,4, 84,0, 83,4, 62,1, 61,0, 53,0, 41,4, 35,8, 34,0, 31,8, 29,3, 29,2, 29,1, 25,6, 25,5, 22,6, 14,0.

IR 2926, 2856, 1781, 1752, 1374, 1178, 1029

HRMS (ESI+) calculada para C₁₉H₃₃O₆ [M+H]⁺ = 357,2199 obtenida = 357,2282.

8.1.2.57 Ácido 4-(carboximetil)-5-octil-2-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico (41)

El diéster **42** (818 mg, 2,29 mmol) se disuelve en una mezcla de 1:1 de THF y una disolución acuosa 2M de NaOH (24 mL), y se deja en agitación durante 4 h. Se elimina el THF mediante destilación a presión reducida y la fase acuosa remanente se acidifica con HCl concentrado hasta pH 1. Se extrae con DCM (3x10 mL) y el conjunto de fases orgánicas se lava con salmuera (2x5 mL), se seca con MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un aceite transparente (464 mg, 67%).



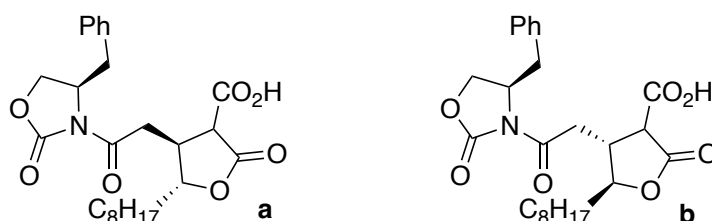
R_f = 0,05 (Hexano/AcOEt 8:2).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4,30 – 4,21 (m, 1H), 3,32 – 3,27 (m, 1H), 2,95 – 2,85 (m, 1H), 2,67 – 2,49 (m, 2H), 1,89 – 1,74 (m, 1H), 1,71 – 1,60 (m, 1H), 1,59 – 1,49 (m, 1H), 1,46 – 1,23 (m, 11H), 0,90 (t, *J* = 8,8 Hz, 3H).

IR 3200-3000, 2920, 2853, 1740, 1666, 1255, 1201, 1162.

HRMS (ESI-) calculada para $C_{15}H_{23}O_6$ $[M-H]^- = 299,1573$
obtenida = 299,1501.

8.1.2.58 *Intento de obtención de los ácidos (4S,5R)-4-(2-((R)-4-benzil-2-oxooxazolidin-3-il)-2-oxoetil)-5-octil-2-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico y (4R,5S)-4-(2-((R)-4-benzil-2-oxooxazolidin-3-il)-2-oxoetil)-5-octil-2-oxotetrahidrofuran-3-carboxílico (44a y 44b)*



El diácido **41** (50 mg, 0,17 mmol) se disuelve en DCM anhidro (5 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Se añade DMF anhidra (5 μ L, 0,07 mmol) y cloruro de oxalilo (30 μ L, 0,37 mmol) ambos recién destilados. La disolución resultante se deja en agitación a temperatura ambiente durante 3 h y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo se usa directamente en la siguiente etapa.

En paralelo, se prepara una disolución de la (S)-4-benciloxazolidin-2-ona (61 mg, 0,34 mmol) en THF anhidro (3 mL) bajo atmósfera de nitrógeno y se enfría la mezcla a -78 °C. Se añade lentamente una disolución de n-BuLi en THF (175 μ L, 0,52 mmol.) y se deja en agitación durante 40 minutos.

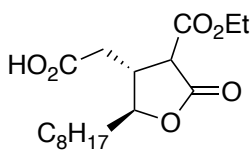
Una vez transcurrido el tiempo, se canula sobre la disolución una mezcla preparada anteriormente con el cloruro de ácido intermedio disuelto en THF anhidro (3 mL) y se deja reaccionar durante 30 minutos a baja temperatura. Se añade una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (5 mL), se separan las fases y la fase acuosa se extrae con AcOEt (3x5 mL). El conjunto de las fases orgánicas se lava con salmuera (10 mL), se seca sobre MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un aceite amarillo (115 mg).

El crudo se separó por cromatografía de columna (gel de sílice, DCM/MeOH 97:3 elución isocrática) pero ninguna de las fracciones aisladas se corresponde con la mezcla de productos.

8.1.2.59 *Ácido trans-(2-(-4-(etoxicarbonil)-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-il)acético (45)*

Se disuelve el diéster **42** (120 mg, 0,34 mmol) en MeOH (6 mL) junto a H₂O (0,5 mL) y K₂CO₃ (78 mg, 0,54 mmol) y se agita la disolución durante 2 h a 40 °C. Se añade una disolución 1M de HCl (10 mL) y se extrae con AcOEt (3x5 mL). La fase orgánica se lava con salmuera, se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor obteniéndose un aceite transparente (130 mg).

El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, DCM/MeOH 9:1 elución isocrática) obteniéndose el producto como un aceite transparente (40 mg, 36%).

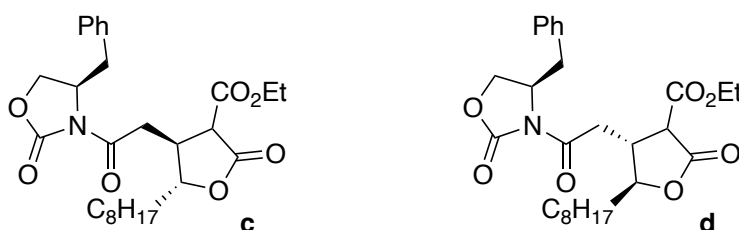


Rf = 0,05 (Hexano/AcOEt 8:2).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 4,31 – 4,24 (m, 1H), 4,20 – 4,09 (m, 2H), 3,66 – 3,64 (d, $J = 2,9$ Hz, 1H), 2,94 – 2,84 (m, 1H), 2,70 – 2,51 (m, 2H), 1,86 – 1,75 (m, 2H), 1,67 – 1,59 (m, 2H), 1,46 – 1,23 (m, 13H), 0,91 (t, $J = 8,8$ Hz, 3H).

MS (ESI-) calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_6$ $[\text{M}-\text{H}]^- = 327,1808$ obtenida = 327,21.

8.1.2.60 *Intento de síntesis del (4S,5R)-4-(2-((R)-4-benzil-2-oxooxazolidin-3-il)-2-oxoetil)-5-octil-2-oxotetrahidrofuran-3-carboxilato y (4R,5S)-4-(2-((R)-4-benzil-2-oxooxazolidin-3-il)-2-oxoetil)-5-octil-2-oxotetrahidrofuran-3-carboxilato de etilo (44c y 44d)*



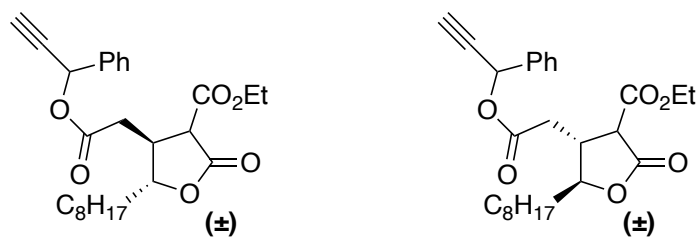
El ácido **45** (22 mg, 0,07 mmol) se disuelve en DCM anhidro (3 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Se añade DMF anhidra (5 μL , 0,07 mmol) y cloruro de oxalilo (7 μL , 0,08 mmol) ambos recién destilados. La disolución resultante se deja en agitación a temperatura ambiente durante 3 h y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo se usa directamente en la siguiente etapa.

En paralelo, se prepara una disolución de la (S)-4-benciloxazolidin-2-ona (12 mg, 0,07 mmol) en THF anhidro (2 mL) bajo atmósfera de nitrógeno y se enfría la mezcla a -78 °C. Se añade lentamente una disolución de n-BuLi en THF (95 μL , 0,10 mmol) y se deja en agitación durante 40 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo, se canula sobre la disolución una mezcla preparada anteriormente con el cloruro de ácido intermedio disuelto en THF anhidro (2 mL) y se deja reaccionar durante 30 minutos a baja temperatura. Se añade una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (5 mL), se separan las fases y la fase acuosa se extrae con AcOEt (3x5 mL).

El conjunto de las fases orgánicas se lava con salmuera (10 mL), se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un aceite amarillo (33mg). El crudo se separó por cromatografía de columna (gel de sílice, DCM/MeOH 99:1 elución isocrática) pero ninguna de las fracciones aisladas se corresponde con la mezcla de productos.

8.1.2.61 *Intento de obtención del (\pm)-(4S,5R)-5-octil-2-oxo-4-(2-oxo-2-((1-fenilprop-2-in-1-il)oxi)etil)tetrahidrofuran-3-carboxilato y (\pm)-(4R,5S)-5-octil-2-oxo-4-(2-oxo-2-((1-fenilprop-2-in-1-il)oxi)etil)tetrahidrofuran-3-carboxilato de etilo (46 y 47)*



El ácido **45** (43 mg, 0,13 mmol) se disuelve bajo atmósfera de nitrógeno en un matraz de fondo redondo provisto de agitación en DCM anhidro (2 mL) junto a EDC·HCl (40 mg, 0,21 mmol) y DMAP (1 mg, 0,01 mmol). Se añade el alcohol propargílico (9 μ L, 0,15 mmol) y se deja la mezcla en agitación a temperatura ambiente durante 16 h.

Se diluye la mezcla de reacción con DCM (5 mL) y se lava con agua (10 mL) y salmuera (10 mL). Se seca la fase orgánica con $MgSO_4$, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un aceite naranja (250 mg).

El crudo se separó por cromatografía de columna (gel de sílice, DCM/MeOH 95:5 elución isocrática) pero ninguna de las fracciones aisladas se corresponde con la mezcla de productos.

8.1.2.62 Ácido (\pm)-2((2S,3R)-2-octil-5-oxo-4-((fenilselanil)metil)tetrahidrofuran-3-il)acético (**40**)

Sobre una disolución de una mezcla 8:2 de (\pm)-UB207 y (\pm)-UB207b (99 mg, 0,37 mmol) en EtOH (0,6 mL) se añade una mezcla de $NaBH_4$ (84 mg, 2,22 mmol.) y Ph_2Se_2 (348 mg, 1,11 mmol) en EtOH (0,6 mL). La disolución resultante se deja reaccionar durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añade una disolución acuosa 2M de HCl (2 mL) hasta pH 1 y se evapora el etanol a presión reducida. La fase acuosa se extrae con DCM (3x5 mL), se lava con salmuera (10 mL), se seca con $MgSO_4$ y se filtra. El disolvente se elimina en el rotavapor obteniéndose un aceite incoloro (140 mg).

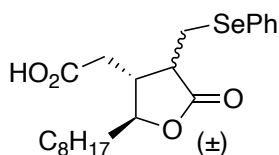
El crudo se purifica por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 97:3 elución isocrática) obteniéndose el producto en forma de sólido blanco como una mezcla 8:2 de los productos (\pm)-**40** y (\pm)-**40b**. (41 mg, 26%).

R_f = 0,22 (DCM/MeOH 97:3).

¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,57 – 7,51 (m, 2H), 7,33 – 7,26 (m, 3H), 4,14 (td, J = 8,4, 3,4 Hz, 1H), 3,43 (dd, J = 13,0, 4,2 Hz, 1H), 3,11 (dd, J = 13,0, 7,3 Hz, 1H), 2,92 – 2,82 (m, 1H), 2,65 – 2,45 (m, 2H), 2,40 – 2,31 (m, 1H), 1,76 – 1,53 (m, 2H), 1,41 – 1,18 (m, 12H), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 3H).

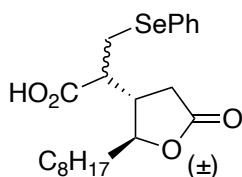
¹³C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 176,5 176,10, 133,00, 129,34, 127,51, 126,9, 82,73, 46,29, 42,55, 34,34, 31,80, 29,36, 29,30, 29,16, 27,19, 25,50, 22,62, 14,08.

MS (ESI-) calculada para $C_{21}H_{29}O_4Se$ $[M-H]^-$ = 425,1231 obtenida = 425,11.



8.1.2.63 Ácido (\pm) -((2*S*,3*S*)-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-il)-3-(fenilselanil)propanoico (40b)

El producto se obtiene en la reacción de formación de protección del doble enlace de la mezcla de compuestos (\pm) -UB207 y (\pm) -UB207b 8:2 y se aísla por cromatografía de columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 97:3 elución isocrática) obteniéndose el compuesto en forma de sólido blanco como una mezcla 8:2 de los productos (\pm) -40 y (\pm) -40b. (41 mg, 26%). Aunque se ha podido determinar la presencia del compuesto, la pequeña cantidad obtenida no ha permitido su caracterización óptima.



R_f = 0,22 (DCM/MeOH 97:3).

MS (ESI-) calculada para C₂₁H₂₉O₄Se [M-H]⁻ = 425,1231
obtenida = 425,11.

8.1.2.64 Ácido (\pm) -trans-2-(4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-il)acético (UB207)

8.1.2.64.1 A partir del compuesto (\pm) -39

El ácido (\pm) -39 (310 mg, 1,21 mmol) se disuelve en una disolución 2M de carbonato de metil magnesio en DMF (24 mL) y se deja en agitación a 145 °C durante 48 h. Se enfría la mezcla de reacción y se añade una disolución acuosa 6M de HCl (10 mL). Se extrae con DCM y se seca la fase orgánica con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose una pasta marrón (364 mg). Al crudo resultante se le añade una mezcla de ácido acético (3 mL), acetato de sodio (90 mg, 1,11 mmol.) N-metilanilina (0,8 mL, 7,38 mmol.) y una disolución al 37% de formol en agua (2,2 mL). La suspensión resultante se deja reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió una mezcla 10:1 (10 mL) de una disolución preparada con salmuera y HCl concentrado y DCM (15 mL). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con DCM (3x10 mL). El conjunto de fases orgánicas se lavó con salmuera (10 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó el disolvente en el rotavapor, obteniéndose el producto como mezcla de los compuestos (\pm) -UB207 y (\pm) -UB207b 8:2 de en forma de sólido amarillento (245 mg, 64%).

8.1.2.64.2 A partir del compuesto 41

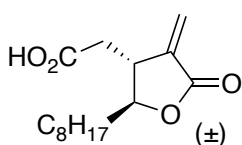
Se disuelve el ácido 41 (66 mg, 0,22 mmol) junto a AcONa (69 mg, 0,84 mmol), ácido acético glacial (2,3 mL, 40,22 mmol), N-metilanilina (0,6 mL, 5,54 mmol) y una disolución al 37% de formol en agua (1,7 mL). La mezcla resultante se deja en agitación vigorosa durante 3,5 h. Se añade al crudo una disolución 10:1 de salmuera y HCl concentrado (10 mL) y se separan las fases. La fase orgánica se lava con una disolución acuosa al 5% de LiCl (3x5 mL), una disolución acuosa 2M de HCl (2x5 mL) y agua (2x5 mL) antes de extraerse con una disolución acuosa saturada en NaHCO₃ (3x10 mL).

La fase acuosa se acidifica hasta pH 1 con HCl concentrado y se extrae con DCM (3x10 mL). El conjunto de las fases orgánicas se lava con salmuera (2x10 mL), se seca con

MgSO₄, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose el producto puro en forma de sólido amarillento (18 mg, 30%).

8.1.2.64.3 A partir de la desprotección de los compuestos (±)-40 y (±)-40b

Una mezcla de los compuestos (±)-40 y (±)-40b 8:2 se disuelve en THF anhidro (0,47 mL) bajo atmósfera de N₂ y se añade una disolución acuosa al 30% de H₂O₂ (45 µL, 0,37 mmol). Tras 3 h de agitación se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se lavó la fase acuosa con DCM (3x5 mL). Se acidificó la fase acuosa con HCl concentrado hasta pH 1 y se extrajo con DCM (3x5 mL). El conjunto de las fases orgánicas se lavó con salmuera (10 mL), se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida obteniéndose el producto en forma de sólido amarillento como una mezcla de los compuestos (±)-UB207 y (±)-UB207b 8:2 (30 mg, 80%).



R_f = 0,23 (DCM/MeOH 96:4).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,32 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 5,70 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 4,31 – 4,22 (m, 1H), 3,16 – 3,06 (m, 1H), 2,76 – 2,58 (m, 2H), 1,77 – 1,58 (m, 2H), 1,56 – 1,18 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 176,0, 169,6, 137,9, 123,4, 82,8, 40,4, 38,0, 35,7, 31,8, 29,4, 29,3, 29,2, 24,9, 22,6, 14,2.

IR 3300-3000, 2924, 2854, 1740, 1712, 1410, 1269, 1154.

HRMS (ESI-) calculada para C₁₅H₂₃O₄ [M-H]⁻ = 267,1675 obtenida = 267,1598.

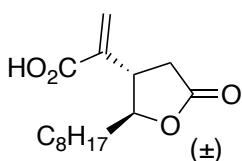
8.1.2.65 Ácido (±)-trans-2-octil-5-oxotetrahidrofuran-3-il)acrílico (UB207b)

8.1.2.65.1 A partir del compuesto (±)-39

El compuesto se aísla como subproducto de la metilación de la lactona (±)-39 en forma de aceite amarillo como mezcla de los compuestos (±)-UB207 y (±)-UB207b 8:2 de en forma de sólido amarillento (245 mg, 64%).

8.1.2.65.2 A partir de la desprotección de los compuestos (±)-40 y (±)-40b

El compuesto se obtiene tras la desprotección de la mezcla 8:2 de los compuestos (±)-40 y (±)-40b en forma de sólido amarillento como una mezcla de los productos (±)-UB207 y (±)-UB207b 8:2 (30 mg, 80%).



R_f = 0,23 (DCM/MeOH 96:4).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,51 (s, 1H), 5,85 (s, 1H), 4,44 – 4,39 (m, 1H), 3,16 – 3,06 (m, 1H), 2,65 – 2,58 (m, 2H), 1,77 – 1,58 (m, 2H), 1,56 – 1,18 (m, 12H), 0,88 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

HRMS (ESI-) calculada para $C_{15}H_{23}O_4$ $[M-H]^- = 267,1675$
obtenida = 267,1598.

8.2 Materiales y métodos en biología

8.2.1 Animales

8.2.1.1 Determinación del peso corporal y la ingesta

Para los experimentos descritos a continuación, se emplearon ratones C57BL/6JRj adquiridos en Janvier. El peso corporal se determinó mediante pesadas individuales en una balanza de precisión en el momento indicado en cada experimento. El cambio de peso se obtuvo como la diferencia entre dos pesadas consecutivas en un intervalo de tiempo determinado.

Para calcular la ingesta de los roedores se pesó la cantidad de pellet inicial en una balanza de precisión y se realizaron pesadas consecutivas en los intervalos de tiempo que se indican en cada experimento.

8.2.1.2 Canulación del tercer ventrículo

La canulación consiste en alcanzar una región profunda del cerebro previamente definida por sus coordenadas en los 3 planos del espacio con una cánula que penetra en el cráneo por un orificio de trepanación.

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina (Richter pharma, Ketamidol 100 mg/mL) y xilazina (Bayer, Rompun 20 mg/mL) en suero salino según el peso del ratón como se detalla a continuación:

Compuesto	Volumen (μL)
Ketamina	X
Xilazina	x/2
Suero fisiológico (c.s.p)	100

Donde x es el peso del ratón en gramos.

Una vez anestesiados se practicó una incisión longitudinal en la cabeza utilizando un bisturí hasta dejar al descubierto el cráneo del animal. En el cráneo se localizó el punto bregma, que corresponde a la unión de los huesos frontales y occipitales, que se utilizó como referencia. Utilizando un atlas del cerebro de ratón adulto se establecieron las coordenadas, respecto a bregma para alcanzar el tercer ventrículo; 0,5 mm caudal y 1 mm lateral. Una vez localizado se procedió a frotar el cráneo con un hisopo de algodón (para facilitar la unión de la cánula) y se procedió a realizar un pequeño orificio de 1 mm aproximadamente con una aguja de 19G. En ese orificio se introdujo una cánula de polietileno de 1,09 x 0,38 mm (Bilaney, #C315CT) a una profundidad de 2,5 mm conseguida mediante la colocación de un tope de cinta adhesiva alrededor de la cánula (**Figura 81**). Para la correcta fijación de esta, se usó gel de cianoacrilato (Henkel, #2640076) que asegura el cierre de la incisión y la inmovilización de la cánula sin afectar a la recuperación del animal.

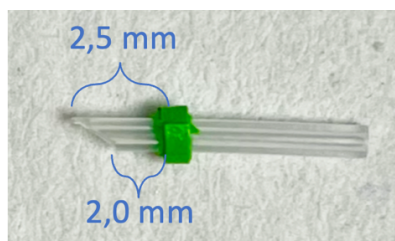


Figura 81. Cánula de polietileno. Se puede observar el bisel que mide 2,5 mm en su extremo largo y 2,0 mm en el corto, y el tope hecho con cinta adhesiva.

Al día siguiente de la intervención se realizó una inyección de 3 μ L de una disolución 0,6 mM de angiotensina II (Sigma, #4474-91-3) empleando una jeringuilla de 10 μ L (Hamilton, #21322-U) y se comprobó la correcta colocación de la cánula analizando la aparición de polidipsia en los animales en los 5-10 minutos posteriores a la administración de la hormona.²⁴⁴

8.2.1.3 Diseño experimental

8.2.1.3.1 Estudio de los efectos de la administración ICV

Para el estudio del efecto de la administración central del (+)-C75 y el (\pm)-UB207 los ratones de 8 semanas, se estabularon a su llegada con el ciclo de luz-oscuridad de 12 h invertido en jaulas de 4 animales y se dejaron aclimatar durante 4 semanas. Una vez aclimatados, a día -2 del experimento, se llevó a cabo la intervención de colocación de la cánula y se estabularon en jaulas individuales. A día -1 se comprobó su buena colocación mediante la administración de 3 μ L de angiotensina II. En el caso de que los ratones bebieran una cantidad abundante de líquido en los 5-10 minutos posteriores a la inyección se consideró la cánula estaba bien insertada y en la posición correcta.

El día de inicio del experimento, se pesaron tanto los ratones como la comida y media hora antes del inicio de la fase oscura (8:30) se llevó a cabo la administración ICV de los compuestos, a una concentración de 30 μ M, disueltos en una mezcla de DMSO 10% y Kolliphor (20%) (Sigma, #C5135) en PBS 1X. Se monitorizó la ingesta de los roedores cada hora durante 4 horas y luego una última vez a las 24 h de la inyección. También se pesaron los ratones a las 24 y 36 h posteriores a la inyección. Los animales fueron sacrificados a la finalización del experimento mediante el método de dislocación cervical.

8.2.1.3.2 Estudio de los efectos de la administración IP

Para el estudio de los efectos de la administración intraperitoneal del (+)-C75 y el (\pm)-UB207 los animales, de 12 semanas, se estabularon a su llegada con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h en jaulas de 4 animales y se dejaron aclimatar durante 1 semana.

El día del inicio del experimento, media hora antes del inicio de la fase oscura (19:30) se pesaron tanto los ratones como el pellet y se llevó a cabo la administración IP de los dos compuestos (15 mg/kg de ratón) disueltos en una mezcla de DMSO 10% y Kolliphor 20%

en PBS 1X. A las 12,5 h de la inyección (8:00) se pesaron los ratones y el resto del pellet y se repitió durante 3 días.

Al finalizar el experimento los ratones se sacrificaron por dislocación cervical sin anestesia y los tejidos se extrajeron y se guardaron a -80°C hasta su posterior análisis.

8.2.2 Células

Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO_2 en un medio completo. La línea OVCAR-3 se creció en medio completo DMEM (4,5 g/L de glucosa y glutamina) (Thermo Fisher Scientific, #41965) suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado al calor (Thermo Fisher Scientific, #10500064) y 100 unidades/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina (Thermo Fisher Scientific, #15140148). La línea HepG2 se creció en un medio completo DMEM (4,5 g/L de glucosa, glutamina y piruvato) (Thermo Fisher Scientific, #41966) suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado al calor y 100 unidades/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina.

8.2.2.1 Mantenimiento de las células

Para crecer las células de un vial congelado, las células se pusieron en un baño a 37°C para su rápida descongelación. El DMSO (Sigma, #D2438) presente en el medio de congelación se eliminó mediante la centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos en un tubo de 15 mL (Corning, #11765075) con 5 mL de medio de crecimiento según la línea celular. Después de la centrifugación se aspiró el medio, las células se suspendieron en 2 mL de medio de crecimiento y se sembraron en placas de 55 cm^2 (Corning, #430167). El medio de cultivo se cambió cada 2 o 3 días o al llegar al 90% de confluencia celular. La amplificación de las células se realizó aspirando el medio y lavando las placas con PBS 1X (Gibco, #10728775). El PBS 1X se aspiró, se añadieron 2 mL de tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con rojo fenol (Gibco, #11590626) a la placa y se incubaron durante 2-3 minutos a 37°C . A continuación, se añadieron 9 mL de medio de crecimiento y se centrifugaron las células en un tubo de 15 mL a 1000 rpm durante 5 minutos. Se aspiró el medio y el pellet en 2 mL de medio de crecimiento. Se tomaron 10 μL del volumen y se contaron las células con 10 μL de solución de azul de tripano en un portaobjetos Countess (Invitrogen, #C10312) de cámara de recuento celular The Countess™ Automated Cell counter (Invitrogen) para sembrarlas a la densidad deseada en las placas de cultivo.

Para la congelación de las células se preparó un medio de cultivo de congelación que consiste en el medio de crecimiento correspondiente a la línea celular con un 10% (v/v) de DMSO. Las células se tripsinizaron, y tras la incubación se suspenden en 9 mL de medio de crecimiento en un tubo de 15 mL. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y el pellet se resuspendió en 17 mL de medio de congelación. Se añadieron alícuotas de 1 mL a los crioviales (Corning, #10418571) y se guardaron en un Mr. Frosty (Nalgen, #479-3200) lleno con isopropanol (Acros, #12556817) que se guardó

inmediatamente a -80 °C durante 16 h. Al día siguiente las células se guardaron en un tanque de nitrógeno líquido.

8.2.2.2 *Ensayo de viabilidad celular MTT*

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos estudiados se utilizó el método colorimétrico MTT. El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) es un compuesto amarillo que, al reducirse, da lugar a su forma abierta conocida como formazan, de color violeta intenso. La reducción de la molécula añadida en cultivos celulares depende de la actividad de las enzimas de tipo reductasas, así que solo las células metabólicamente viables son capaces de llevar a cabo la transformación, lo que permite emplear este método como una estimación de la cantidad de células vivas en el cultivo.

El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Contar las células y preparar una solución a densidad 2×10^4 – 8×10^4 células/mL de medio, dependiendo de la línea celular empleada.
2. Sembrar 100 µL de la solución las células en una placa de 96 pocillos (Corning, #3598) y dejar en el incubador a 37 °C durante toda la noche para una correcta adherencia.
3. Aspirar el medio de los pocillos, lavar con PBS 1X y añadir 90 µL de medio de crecimiento y 10 µL del stock previamente preparado de los compuestos a analizar a diferentes concentraciones. Para el control se utiliza PBS 1X. Todos los pocillos contienen menos de un 1% de DMSO final. Las medidas se realizan por triplicado.
4. Incubar las células a 37 °C durante 3 días.
5. Aspirar el medio de los pocillos, lavar con PBS 1X y añadir 20 µL de una solución stock de MTT (Sigma, #M2128) preparada con PBS 1X y esterilizada por filtración con un filtro de 0,2 µm (Thermo Fisher Scientific, #15181499) a una concentración final de 0,83 mg/mL.
6. Dejar incubando durante 3 h.
7. Aspirar el medio con cuidado de no aspirar los cristales de formazan formados.
8. Disolver con 100 µL de DMSO y asegurarse de que no quedan burbujas ni cristales sin disolver.
9. Medir la absorbancia a 560 nm de los pocillos en un espectrofotómetro Multireader Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, #VL001).

Los resultados permiten calcular el valor de IC₅₀ de los compuestos, que se define como la concentración a la que se produce un 50% de muerte celular. El cálculo se llevó a cabo utilizando el programa Prism 9 de GraphPad.

8.2.2.3 *Determinación de la actividad CPT1A en células por HPLC-MS*

Para determinar la actividad de CPT1A en cultivos celulares por el medio de HPLC-MS se siguió el siguiente protocolo:

1. El día anterior al experimento, sembrar las células en las placas de 96 pocillos a la densidad adecuada en medio de crecimiento. En el caso de las HepG2, se sembraron 100 μL a 20.0000 células/mL. Sembrar 3 pocillos extra para la determinación de proteína en las células.
2. A la mañana siguiente, descartar el medio de cultivo de las células y lavar con 100 μL de PBS 1X atemperado a 37 °C.
3. Extraer y cuantificar la proteína, por el método de Bradford, de los 3 pocillos destinados a ello.
4. Añadir 40 μL de mezcla de reacción y dejar en agitación a 37 °C durante 4 minutos en un agitador Thermo-Shaker PTS-100HL (Biosan, #BS-010142-AAI).
5. Detener la reacción con 100 μL de MeOH a -20 °C.
6. Tapar la placa con Parafilm y dejar reposar a -20 °C por 1-2 horas.
7. Centrifugar la placa durante 15 minutos a 4000 rpm durante 15 minutos.
8. Coger 90 μL del sobrenadante y filtrarlo usando la placa filtrante Pall AcroPrep Advance 96-well (Thermo Fisher Scientific, #17184611).
9. Coger 50 μL del sobrenadante y añadirlo a un vial de HPLC con micro-insert (Tisch Scientific, #CV1891).
10. Añadir 5 μL de la solución de patrón interno de palmitoil-carnitina de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y homogeneizar asegurando que no queden burbujas.
11. Realizar las inyecciones de las muestras en el HPLC-MS empleando la columna Kinetex C8 de 2,6 μm (Phenomenex, #00B-4497-E0) con la precolumna SecurityGuard ULTRA (Phenomenex, #AJ0-8770) y el filtro SecurityGuard ULTRA Holder (Phenomenex, #AJ0-9000). Las condiciones de elución son las siguientes:

Tiempo (minutos)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)
0,00	60,0	40,0
0,50	60,0	40,0
7,00	0,0	100,0
9,00	0,0	100,0
10,0	60,0	40,0
12,0	60,0	40,0

Donde el disolvente A es H₂O Milli-Q con un 0,1% de ácido fórmico (Sigma, #5438040100) y el disolvente B es acetonitrilo (Sigma, #34851) con un 0,1% de ácido fórmico.

12. Calcular la actividad teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$A.E \left(\frac{\text{pmol}}{\text{minuto} \cdot \text{mg de proteína}} \right) = \frac{\frac{A_{409}}{A_{400}} \cdot C_{PC} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \cdot \frac{V_f}{V_i} \cdot 0,14 \text{ (mL)} \cdot \frac{1000}{Mw_{D9} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)}}{t \cdot \text{mg}_{\text{proteína}}}$$

Donde:

A₄₀₉/A₄₀₀ = Relación entre áreas de la integración de los picos correspondientes a las masas de la palmitoil-carnitina-d⁹ y palmitoil-carnitina respectivamente

C_{PC} = Concentración del patrón interno en el vial de HPLC

V_f = Volumen final en el vial de HPLC

V_i = Volumen de muestra antes de añadir el patrón interno

MW_{D9} = Masa molecular de la palmitoil-carnitina- d^9

t = Tiempo de reacción en minutos

$mg_{proteína}$ = Masa de proteína en mg

- Mezcla de reacción:
 - HEPES 11 mM a pH 7,2
 - Sucrosa 70 mM
 - NaCl 100 mM
 - KCl 3,6 mM
 - $MgSO_4$ 0,8 mM
 - KH_2PO_4 0,56 mM
 - $CaCl_2$ 3 mM
 - ATP 4 mM
 - Glutati3n reducido 250 μ M
 - Palmitoil-CoA 50 μ M
 - BSA deslipidizado 0,1%
 - L-carnitina- d^9 400 μ M
 - Digitonina 46,5 μ M

8.2.2.4 Estudio de la inhibici3n de CPT1A en c3lulas por HPLC-MS

El protocolo que se detalla a continuaci3n fue utilizado para el estudio de la capacidad de inhibici3n de diferentes compuestos en las c3lulas HepG2 permeabilizadas sin necesidad de extraer las mitocondrias:

1. El d3a anterior al experimento, sembrar las c3lulas en las placas de 96 pocillos a la densidad adecuada en medio de crecimiento. En el caso de las HepG2, se sembraron 100 μ L a 20.0000 c3lulas/mL. Sembrar 3 pocillos extra para la determinaci3n de prote3na en las c3lulas.
2. A la ma1ana siguiente, descartar el medio de cultivo de las c3lulas y lavar con 100 μ L de PBS 1X atemperado a 37 $^{\circ}$ C.
3. A1adir el volumen necesario de una disoluci3n stock de los inhibidores y ajustar el volumen a 100 μ L con medio de crecimiento.
4. Incubar las c3lulas durante 1 h.
5. Descartar el medio y lavar los pocillos con PBS 1X atemperado a 37 $^{\circ}$ C.
6. Continuar a partir de aqu3 desde el punto 3 de la determinaci3n de la actividad de CPT1A en c3lulas por HPLC-MS.

8.2.3 Levaduras y vectores plasm3dicos

Para la expresi3n de la prote3na recombinante CPT1Awt se utiliz3 la cepa YPH499 de *Saccharomyces cerevisiae* (Invitrogen, #K500053). El genotipo/fenotipo de la cepa es el siguiente: MAT a ura3-52 leu2-DI ade2-101 lys2-801 his3-D200 trp1-D63. El vector empleado para la expresi3n proteica fue el pYES2 (Invitrogen, #V825-20) que se trata un pl3smido episomal de alto n3mero de copias. En levaduras el marcador de selecci3n del

plásmido es el gen URA3 que codifica el enzima orotidina-5'-fosfatodecarboxilasa y permite una selección por auxotrofia, consiguiendo que solo las células que hayan incorporado el plásmido puedan crecer en un medio sin uracilo. La expresión del gen está bajo el control del promotor GAL1, inducible por galactosa que se encuentra reprimido cuando la fuente de carbono es glucosa.

8.2.3.1 Crecimiento

La cepa YPH499 se creció en medio completo YPD esterilizado que se compone de 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa (pH ajustado a 6,6 antes de autoclavar). En el caso del medio sólido, se añade además un 2% de agar (pH ajustado a 7,2 antes de autoclavar). Los medios de cultivo se almacenan a 4 °C.

El crecimiento en medio líquido se realizó a 30 °C en agitación continua. La densidad del cultivo se determinó por espectrofotometría utilizando la siguiente regla: $0,1 DO_{660} \approx 3 \times 10^6$ células/mL, donde DO_{660} es la densidad óptica del cultivo a 660 nm.

8.2.3.2 Transformación

El plásmido de expresión pYES-CPT1Awt se transformó en la cepa *S. cerevisiae* mediante la modificación del método descrito por Schiestl *et al.* que se basa en el uso de acetato de litio como disruptor parcial de la pared celular. En esta metodología la captación de DNA transformante por las células viables se produce tras la adición de polietilenglicol (PEG) y un choque térmico. El procedimiento se describe con detalle a continuación:

1. Inocular 15 μ L del cultivo líquido de la cepa de interés en 15 mL de medio YPD líquido. Se dejan crecer a 30 °C con agitación durante aproximadamente 16 h, hasta que la DO_{660} se encuentre entre un valor de 2 y 9.
2. Inocular 5 mL del preinóculo en 50 mL de medio YPD líquido y se deja crecer durante 3 h a 30 °C en agitación hasta obtener una DO_{660} de 0,2 – 0,3.
Para el cálculo de x se puede aplicar la fórmula: $V_{inicial} \times DO_{inicial} = V_{final} \times DO_{final}$.
3. Centrifugar las células a 100 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar las células con 30 mL de H₂O Milli-Q, resuspendiendo las células por inversión. Centrifugar a 100 x g durante 5 minutos.
5. Resuspender las células en 200 μ L de solución tamponada de acetato de litio (TE 1X/AcOLi 1X).
6. Transformar en tubos “ependorf” con 1 μ L de TE 1X/AcOLi 1X, 100 ng de DNA plasmídico y 100 μ L de levaduras. Mezclar sin vortex.
7. Añadir 600 μ L de solución de PEG (TE 1X/AcOLi 1X/PEG 4000 40%). Mezclar sin vortex y dejar incubando durante 30 minutos a 30 °C.
8. Añadir 70 μ L de DMSO, previamente esterilizado por filtración, y mezclar por inversión.
9. Someter el cultivo a un choque térmico mediante la incubación a 42 °C durante 15 minutos y seguidamente enfriar en hielo durante 1-3 minutos.
10. Centrifugar las células unos segundos a velocidad máxima y descartar el sobrenadante. Se resuspenden las células en 100 μ L de TE 1X.

11. Sembrar los 100 μ L en una placa selectiva para el marcador plasmídico en medio CMura⁻ e incubar a 30 °C hasta la aparición de colonias.

Todo el proceso se llevó bajo condiciones de esterilidad y los diferentes reactivos fueron preparados de manera extemporánea. Las soluciones stock a partir de las que se prepararon son las que se detallan a continuación:

- Tampón TE 10X esterilizado por filtración:
 - Tris-HCl 100 mM a pH 7,5.
 - EDTA 10 mM a pH 8.
- Acetato de litio 10X esterilizado por filtración:
 - Acetato de litio 1M (Sigma, #L6883) en H₂O Milli-Q a pH 7,5.
- PEG 4000 al 50% (p/v), esterilizado por filtración.
- DNA transportador (100 mg/mL):
 - DNA (sal sódica de esperma de salmón) (Sigma, #D1626).
 - TE 1X a pH 8,0.
- Plásmido (100 ng):
 - Si es necesario concentrar o diluir con H₂O Milli-Q esterilizada.
- CMura⁻:
Para el medio líquido:
 - 0,5% de (NH₄)₂SO₄.
 - 0,17% de YNB (yeast nitrogen base).
 - 0,077% de yeast synthetic drop-out sin uracilo (CSM-Ura).
 - 2% de glucosa o ácido láctico.Se ajusta el pH a 5,0 antes de autoclavar.

Para el medio sólido:
 - Añadir 2% de agar al medio líquido.Se ajusta el pH a 6,0 antes de autoclavar.

8.2.3.3 Selección de los transformantes

Los transformantes se pueden seleccionar mediante el crecimiento en placas con medio sin uracilo (CMura⁻) donde únicamente pueden crecer las levaduras que han incorporado el plásmido. Tras la transformación de las levaduras, se inocula una colonia en 30 mL de medio CMura⁻ líquido suplementado con un 2% de glucosa. El cultivo se mantiene en agitación a 30 °C hasta obtener una DO₆₆₀ ≤ 1.

Una vez alcanzado este punto, como la enzima CPT1A se localiza en mitocondrias, las levaduras transformadas se crecen en un medio con un de ácido láctico como fuente de

carbono para favorecer la biosíntesis de las mismas. Para ello se inocula la cantidad adecuada del cultivo de glucosa en medio CMura líquido con un 2% de ácido láctico para obtener un DO₆₆₀ de 0,1. Se dejan las levaduras en agitación a 30 °C hasta llegar a un DO₆₆₀ de 1 aproximadamente.

En este punto se induce la expresión de proteína añadiendo un 2% de galactosa al medio líquido, dejando las levaduras en agitación a 30 °C durante 20 h.

Estudio de actividad CPT1

8.2.3.3.1 Método radiométrico

Para la determinación radiométrica de la actividad de CPT1 se llevó a cabo la reacción enzimática según se detalla en el siguiente protocolo:

1. Preparar la mezcla de reacción en un tubo de 15 mL y mantenerla en hielo. El GSH se debe preparar de manera extemporánea inmediatamente antes de utilizarlo.
2. Preparar la mezcla de proteína correspondiente a la fracción mitocondrial de los extractos. La muestra se prepara por duplicado en un tubo eppendorf de 1,5 mL como se describe a continuación:

Mezcla de proteína	
Proteína	10-15 µg
Tampón de reacción CPT1 4X	10 µL
H ₂ O Milli-Q (c.s.p.)	40 µL

3. Añadir a cada tubo de reacción con la proteína 160 µL de la mezcla de reacción. Mezclar con vortex e incubar durante 4 minutos a 30 °C.
4. Parar la reacción con 200 µL de HCl 1,2 M.
5. Extraer la ³H-palmitoil-carnitina con 600 µL de n-butanol saturado con agua. Mezclar con vortex y centrifugar a 16000 x g durante 2 minutos.
6. Separar 400 µL de la fase butanólica con 200 µL de H₂O Milli-Q. Mezclar con vortex las muestras y centrifugar a 16000 x g durante 2 minutos.
7. Traspasar 250 µL de la fase superior a un vial de plástico con 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold MV (PerkinElmer, #6013159). El contador empleado es el liquid scintillation analyzer (Packard, TRI-CARB 2100TR) del servicio de radioisótopos de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

Para el cálculo de la actividad enzimática (A.E.) de la CPT1 se aplicó la fórmula:

$$A.E \left(\frac{nmol}{min \cdot mg \text{ de proteina}} \right) = \frac{c.p.m}{R.E} \cdot \frac{1}{t} \cdot \frac{1000}{\mu g} \cdot f$$

Donde:

C.p.m: cuentas por minuto

R.E: radioactividad específica de la carnitina (3000 c.p.m/nmol aproximadamente)

t: tiempo de reacción del ensayo en minutos

Las disoluciones y reactivos necesarios se preparan de manera extemporánea y se pueden almacenar entre -80 y 4 °C. Su preparación y composición se detalla a continuación:

- L-³H-carnitina 16 mM (30 μCi)
 - 6,6 mg de L-carnitina.
 - 1964,6 μL de una mezcla de etanol 95%:H₂O destilada (1:1).
 - 125 μL de L-³H-carnitina hidrocloreuro (de 80 Ci/mmol).Almacenada a -80 °C.

- Tampón CPT1 4X
 - Tris-HCl 420 mM a pH 7,2
 - KCl 60 mM
 - MgCl₂ 16 mMAlmacenada a 4 °C.

- Mezcla de reacción:
 - Tris-HCl 105 mM a pH 7,2
 - KCl 15 mM
 - MgCl₂ 4 mM
 - ATP 4 mM
 - Glutación reducido (GSH) 250 μM
 - Palmitoil-CoA 50 μM
 - BSA deslipidizado 0,1%
 - L-³H-carnitina (30 μCi) 400 μM

8.2.3.3.2 Ensayo radiométrico con inhibidores

En el caso del estudio de actividad en presencia de inhibidores, estos se añaden a la mezcla de proteína con tampón de CPT1 4X según se indica a continuación:

Mezcla de proteína	
Proteína	10-15 µg
Tampón de reacción CPT1 4X	10 µL
Inhibidor	x µL
H ₂ O Milli-Q (c.s.p.)	40 µL

Donde x es el volumen necesario del inhibidor para conseguir la concentración deseada.

El volumen que se añade dependerá de la concentración deseada. En el caso de inhibición con malonil-CoA se añaden un volumen tal que la concentración final en el medio de reacción sea de 100 µM. La mezcla se preincuba durante 1 minuto a 30 °C antes de continuar con el paso 3 del protocolo del estudio de la actividad.

8.2.3.3.3 Método HPLC-MS

Para la determinación por HPLC-MS de la actividad de CPT1 se llevó a cabo la reacción enzimática según se detalla en el siguiente protocolo:

13. Preparar la mezcla de reacción en un “eppendorf” de 5 mL (Eppendorf, #0030119401) y mantenerla en hielo.
14. Preparar la mezcla de proteína correspondiente a la fracción mitocondrial de los extractos, ya sean de levaduras o de tejidos de ratón, como se describe a continuación:

Mezcla de proteína	
Proteína	10 µg
Tampón de reacción CPT1 4X	2,5 µL
H ₂ O Milli-Q (c.s.p.)	10 µL

15. Añadir los 10 µL de la mezcla de proteína a cada pocillo.
16. Añadir 40 µL de mezcla de la mezcla de reacción a cada pocillo previamente atemperada a 37 °C y dejar en agitación a 30 °C durante 4 minutos en un agitador Thermo-Shaker PTS-100HL (Biosan, #BS-010142-AAI).
17. Detener la reacción con 150 µL de MeOH a -20 °C.
18. Cubrir la placa con Parafilm y dejar reposar durante 1-2 h a -20 °C.
19. Centrifugar la placa durante 15 minutos a 4000 rpm durante 15 minutos.
20. Coger 120 µL del sobrenadante y filtrarlo usando la placa filtrante Pall AcroPrep Advance 96-well (Thermo Fisher Scientific, #17184611).
21. Coger 60 µL del sobrenadante y añadirlo a un vial de HPLC con micro-insert (Tisch Scientific, #CV1891).
22. Añadir 5 µL de la solución de patrón interno de palmitoil-carnitina de 5 µg/mL y homogeneizar asegurando que no queden burbujas.

23. Realizar las inyecciones de las muestras en el HPLC-MS empleando la columna Kinetex C8 de 2,6 μm (Phenomenex, #00B-4497-E0) con la precolumna SecurityGuard ULTRA (Phenomenex, #AJ0-8770) y el filtro SecurityGuard ULTRA Holder (Phenomenex, #AJ0-9000). Las condiciones de elución son las siguientes:

Tiempo (minutos)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)
0,00	60,0	40,0
0,50	60,0	40,0
7,00	0,0	100,0
9,00	0,0	100,0
10,0	60,0	40,0
12,0	60,0	40,0

Donde el disolvente A es H₂O Milli-Q con un 0,1% de ácido fórmico (Sigma, #5438040100) y el disolvente B es acetonitrilo (Sigma, #34851) con un 0,1% de ácido fórmico.

24. Calcular la actividad teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$A.E \left(\frac{\text{pmol}}{\text{minuto} \cdot \text{mg de proteína}} \right) = \frac{\frac{A_{409}}{A_{400}} \cdot C_{PC} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \cdot \frac{V_f}{V_i} \cdot 0,14 \text{ (mL)} \cdot \frac{1000}{MW_{D9} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)}}{t \cdot \text{mg}_{\text{proteína}}}$$

Donde:

A_{409}/A_{400} = Relación entre áreas de la integración de los picos correspondientes a las masas de la palmitoil-carnitina-d⁹ y palmitoil-carnitina respectivamente

C_{PC} = Concentración del patrón interno en el vial de HPLC

V_f = Volumen final en el vial de HPLC

V_i = Volumen de muestra antes de añadir el patrón interno

MW_{D9} = Masa molecular de la palmitoil-carnitina-d⁹

t = Tiempo de reacción en minutos

$\text{mg}_{\text{proteína}}$ = Masa de proteína en mg

- Mezcla de reacción:
 - Tris-HCl 105 mM a pH 7,2
 - KCl 15 mM
 - MgCl₂ 4 mM
 - ATP 4 mM
 - Glutación reducido 250 μM
 - Palmitoil-CoA 50 μM
 - BSA deslipidizado 0,1%
 - L-carnitina-d⁹ 400 μM

8.2.3.3.4 Ensayo HPLC-MS con inhibidores

En el caso del estudio de actividad en presencia de inhibidores, estos se añaden a la mezcla de proteína con tampón de CPT1 4X según se indica a continuación:

Mezcla de proteína	
Proteína	10 µg
Tampón de reacción CPT1 4X	2,5 µL
Inhibidor	x µL
H ₂ O Milli-Q (c.s.p.)	10 µL

Donde x es el volumen necesario del inhibidor para conseguir la concentración deseada. El volumen que se añade dependerá de la concentración deseada. En el caso de inhibición con malonil-CoA se añaden un volumen tal que la concentración final en el medio de reacción sea de 100 µM.

La mezcla se preincuba durante 1 minuto a 30 °C antes de continuar con el paso 4 del protocolo del estudio de la actividad por el método de HPLC-MS.

8.3 Materiales y métodos en biología molecular

El análisis de los tejidos y extractos celulares se llevó a cabo empleando técnicas de biología molecular. Estas técnicas ayudan a entender los procesos biológicos que están ocurriendo en organismos vivos. En esta sección se explicarán las diferentes técnicas empleadas durante la presente Tesis.

8.3.1 Métodos con proteínas

8.3.1.1 Extracción de proteína de levaduras

Para el aislamiento de la proteína CPT1A sobreexpresada en las levaduras recombinantes se llevó a cabo la rotura mecánica de las células mediante el vorteador de las mismas con bolas de vidrio (Sigma, #G8772). El protocolo se detalla a continuación:

1. Centrifugar las levaduras inducidas a 4000 x *g* durante 5 minutos a 4 °C.
 2. Hacer dos lavados con H₂O destilada fría centrifugando después de cada lavado.
 3. Descartar el sobrenadante y resuspender las levaduras en 700 µL de tampón con inhibidores de proteasas (Roche, #11697498001) por cada 250 mL de cultivo.
 4. Añadir a cada tubo el mismo volumen de bolas de vidrio (RPI, # 9831) previamente enfriadas a 4 °C.
 5. Romper las levaduras mediante agitación en vortex durante 5-10 minutos, intercalando 30 segundos de vortex con 30 segundos de enfriamiento en hielo para evitar el calentamiento del medio.
 6. Centrifugar los tubos a 4000 x *g* durante 15 minutos a 4 °C para separar las bolas de vidrio y los restos de las paredes celulares.
 7. Centrifugar el sobrenadante a 17000 x *g* durante 30 minutos a 4 °C para obtener la fracción mitocondrial.
 8. Resuspender las mitocondrias con tampón con inhibidores de proteasas a la concentración deseada. Almacenar las alícuotas a -20 °C.
- Tampón de extracción con inhibidores de proteasas:
 - Hepes 10 mM a pH 7,8.
 - EDTA 1 mM.
 - Glicerol al 10% en H₂O destilada.
 - Inhibidores de proteasas, 1 pastilla por cada 50 mL.

8.3.1.2 Extracción de la proteína celular

El protocolo detallado en este apartado se corresponde a la obtención de extractos proteicos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos:

1. Lavar las células con PBS 1x.

2. Añadir 100 µL de tampón de homogenización al pocillo.
 3. Levantar las células con ayuda de una espátula.
 4. Recoger el volumen en un tubo y centrifugar a 4 °C durante 10 minutos a 13200 rpm.
 5. Guardar a 4 °C si su uso es inmediato o a -20 °C si se van a usar en otro momento.
- Tampón de extracción con inhibidores de proteasas:
 - Hepes 10 mM a pH 7,8.
 - EDTA 1 mM.
 - Glicerol al 10% en H₂O destilada.
 - Inhibidores de proteasas, 1 pastilla por cada 50 mL.

8.3.1.3 Extracción de la proteína de tejidos

El protocolo que se detalla a continuación se refiere a la extracción de la fracción proteica de tejidos de ratones C57BL/6JRj extraídos en fresco.

1. Extraer el tejido y pesar aproximadamente 100 mg del mismo.
 2. Cortar el tejido en trozos más pequeños.
 3. Introducirlo en 1 mL de tampón de extracción de proteínas y mantener en hielo.
 4. Homogeneizar utilizando el una trituradora de teflón Potter-Elvehjem (KIMBLE, #SCERSP886000-0020) en ciclos de 30 segundos de triturar y 30 segundos de enfriar.
 5. Traspasar el lisado a un tubo y centrifugar durante 15 minutos a 2500 rpm a 4 °C.
 6. Transferir el sobrenadante a otro tubo y centrifugar a 11600 rpm durante 20 minutos a 4 °C.
 7. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen deseado de tampón de extracción.
 8. Usar inmediatamente o almacenar los extractos a -20 °C.
- Tampón de extracción con inhibidores de proteasas:
 - Hepes 10 mM a pH 7,8.
 - EDTA 1 mM.
 - Glicerol al 10% en H₂O destilada.
 - Inhibidores de proteasas, 1 pastilla por cada 50 mL.

8.3.1.4 Cuantificación de la proteína

Para la determinación de la cantidad de proteína se siguió el método desarrollado por Bradford que se basa en los cambios de absorción a 595 nm del azul Coomassie brillante G-250 en respuesta a las diferentes concentraciones de proteína.²⁴⁵ Para ello se siguió el siguiente protocolo:

1. Preparar la dilución del reactivo de Bradford (Bio-Rad, #5000006) en una proporción 1:5 con agua.
2. Filtrar la disolución resultante con un filtro de 0,2 µm (Thermo Fisher Scientific, #15181499).

- Preparar patrones de proteína con BSA utilizando una disolución stock de 1 mg/mL de BSA según se describe:

Cantidad de proteína (μg)	Volumen de stock (μL)	Volumen de Bradford (μL)
Blanco	0	1000
2	2	998
5	5	995
10	10	990
15	15	985
20	20	980
Muestra	2-10	1000 (c.s.p)

- Medir la absorbancia los patrones y la muestra a 595 en un espectrofotómetro.
- Obtener la recta de calibrado con los patrones y la regresión lineal. Interpolar el valor de absorbancia de las muestras en la ecuación y calcular la cantidad de proteína en la muestra.

8.3.2 Métodos con RNA

8.3.2.1 Extracción del RNA de tejidos

Se introducen 30-70 mg de tejido en un tubo de 2 mL (Fiser Scientific, #11393613) junto a 1 mL de Trizol (Invitrogen, #15596-018). El tejido se lisa con perlas de acero inoxidable de 3,2 mm (Qiagen, #69997) en el Tissuelyser LT (Qiagen, #85600) a una frecuencia de 50 Hz durante 3-5 minutos dependiendo del tejido. Para el aislamiento del RNA se siguió el protocolo descrito por Invitrogen.

De manera resumida:

- Incubar el lisado durante 5 minutos a 4 °C para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteínas.
- Añadir 200 μL de cloroformo (Sigma, #34854) por cada 1 mL de Trizol empleado y mezclar por agitación vigorosa.
- Incubar durante 2-3 minutos a 4 °C.
- Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 12000 x g a 4 °C y transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo evitando arrastrar las proteínas de la interfase.
- Añadir 500 μL de isopropanol (Thermo Fisher Scientific, #447080010) a la fase acuosa por cada 1 mL de Trizol.
- Incubar durante 10 minutos a 4 °C.
- Centrifugar la muestra durante 10 minutos a 12000 x g a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 1 mL de etanol (Thermo Fisher Scientific, #124790010) al 75% por cada 1 mL de Trizol.
- Mezclar con el vortex la muestra durante 5 minutos a 7500 x g a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y repetir el lavado con etanol 75%.
- Dejar secar el pellet de RNA a temperatura ambiente.

- Resuspender el pellet en 20-50 μL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (Ambion, #9906) y cuantificar el RNA en el espectrofotómetro (Nanodrop Thermo NanoDrop 1000).

8.3.2.2 Síntesis de cDNA

El mRNA purificado se retrotranscribe a cDNA usando la transcriptasa reversa del virus murino Moloney de leucemia (M-MLV) (Invitrogen, #10338842) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

De manera resumida:

- Incubar 500 ng de mRNA en un tubo junto a 1 μL de dNTPs mix (10 mM cada uno) (Invitrogen, #16498753), 0,5 μL de hexámeros aleatorios 50 μM (Applied Biosystems, #10609275) y 0,5 μL de oligo d(T)₁₆ 50 μM y se incuba durante 5 minutos a 65 °C.
- Añadir 4 μL de tampón de primera cadena 5X (Invitrogen, #10338841), 2 μL de ditioneitol 100 mM (DTT) (Invitrogen, #103338843) y 1 μL del inhibidor de la ribonucleasa recobinante RNaseOUT 40U/ μL (Invitrogen, #10338843). Se incuba durante 2 minutos a 37 °C.
- Se añade 1 μL de transcriptasa reversa M-MLV 200U/ μL y se mezcla por pipeteo. La mezcla resultante se incuba en un termociclador siguiente el siguiente protocolo:

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
25	10
37	50
70	15

- El cDNA resultante se diluye con agua tratada con DEPC hasta una concentración final de 5 ng/ μL .

Se incluyen 2 controles negativos en el procedimiento:

RT1: Una mezcla de todas las muestras de mRNA sin la enzima M-MLV.

RT2: Una muestra con agua en lugar de mRNA que incluya la enzima M-MLV.

8.3.3 PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) se trata de una técnica de biología molecular que amplifica fragmentos específicos de DNA mediante la utilización de moléculas como el SYBR Green I permitiendo la cuantificación de los niveles de DNA de un gen en un tejido. El SYBR Green I es un colorante que se asocia a la molécula de DNA por su interacción con la hendidura menor de la cadena provocando la emisión de fluorescencia por parte de la molécula. Durante la amplificación del material genético de la PCR, la cantidad de DNA amplificado aumenta exponencialmente y, por lo tanto, aumenta la cantidad de SYBR Green I que se asocia a la doble hebra, causando por ende un aumento de la fluorescencia en el medio de reacción que se puede medir en cada ciclo de la PCR y se puede utilizar para cuantificar la cantidad de DNA amplificado.

Para cuantificar los niveles de expresión del gen elegido mediante la PCR, se necesita diseñar un cebador específico para la región del cDNA que se quiera amplificar. Tras los sucesivos ciclos de PCR, se aumenta la cantidad de material genético bicatenario y por tanto la cantidad de fluorescencia derivada de la unión entre este y el SYBR Green I, lo que permite la cuantificación del cDNA presente y, por comparación, obtener valores de expresión génica relativos respecto a un grupo de control.

El proceso se encuentra ilustrado esquemáticamente en la **Figura 82**:

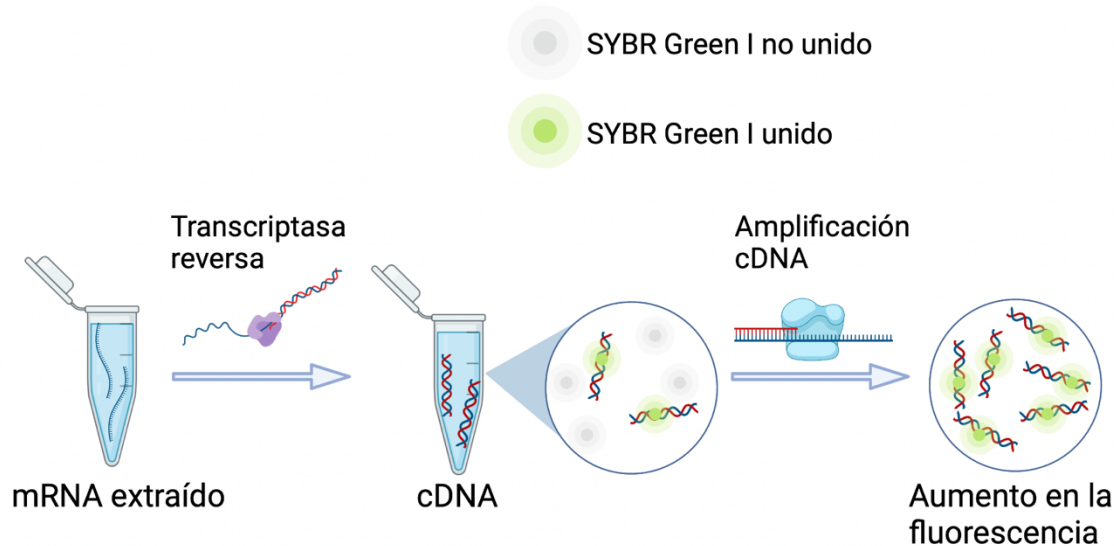


Figura 82. Proceso de cuantificación del cDNA por qRT-PCR a partir de mRNA extraído de tejidos.

La qRT-PCR se llevó a cabo con el instrumento LightCycler 480 II (Roche, #05015243001) siguiendo las instrucciones del fabricante.

De manera resumida:

1. 2,5-5 ng/ μ L de cDNA se mezclan con 5 μ L de SYBR Green PCR Master Mix Reagent Kit 5X (Roche, #4887352001), 0,5 μ L de mezcla de cebadores (forward y reverse, 10 μ M cada uno) y 2 μ L de agua tratada con DEPC. Se incluye un control negativo sin cDNA.
2. Se lleva a cabo la reacción en una placa de 384 pocillos (Roche, #04729749001) que se incuba durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 10 segundos.
3. Los niveles de mRNA se normalizan utilizando diferentes genes de referencia según el tejido analizado: proteína ribosomal L7 (*Rpl7*) para el hipotálamo, peptidil propil isomerasa A (*Ppia*) para el hígado e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*Hprt*) para el tejido adiposo marrón. Los cebadores utilizados se detallan en la **Tabla 8**:

Tabla 8. Lista de oligonucleótidos utilizados para la qRT-PCR. Todos han sido adquiridos en Merck.

Gen	Secuencia 5'→3'	Secuencia 3'→5'
<i>Hprt</i>	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC
<i>Ppia</i>	TGCCAAGACTGAATGGCTGG	ATTCCTGGACCCAAAACGCT
<i>Rpl7</i>	TCGCAGAGTTGAAGGTGAAG	GCCTGTACTCCTTGTGATAGTG
<i>Agrp</i>	CGGAGGTGCTAGATCCACAGA	AGGACTCGTG CAGCCTTACAC
<i>Bsx</i>	CACTGCCCTCAGCCTCTC	CGCTTTCGGTTCGTCTTG
<i>Cpt1a</i>	GACTCCGCTCGCTCATTC	AAGGCCACAGCTTGGTGA
<i>Cpt1c</i>	TATGCAGTCGCCCTTCT	ACATCAATCAGGTGTGTCTGCT
<i>Creb</i>	GGAAGAGAGAGGTCCGTCTAATG	CACATATTCTTTCTTTCTACGACA
<i>Fas</i>	CAGATGATGACAGGAGATGGAA	CACTCACACCCACCCAGA
<i>FoxO1</i>	CTTCAAGGATAAAGGGCGACA	GACAGATTGTGGCGAATTGA
<i>Gad1</i>	ATACAACCTTTGGCTGCATGT	TTCCGGGACATGAGCAGT
<i>Glut1</i>	TTACAGCGCGTCCGTTCT	TCCCACAGCCAACATGAG
<i>Glut3</i>	TTGCCCTGAGAGTCCAAGA	ACAAGCGCTTGCAGGATCT
<i>G6Pasa</i>	AGGAAGGATGGAGGAAGGAA	TGGAACCAGATGGGAAAGAG
<i>Hsl</i>	GCGCTGGAGGAGTGTTTTT	CGCTCTCCAGTTGAACCAAG
<i>Hmgcr</i>	TGCCACACTCTGCACTAAA	CTGAGAGGTCCGACTTGCTT
<i>Hmgcs1</i>	GTTGGAGTGTCTCTTACGGTTCTG	AGTTCTCGAGTCAAGCCTTGATTTA
<i>Hmgcs2</i>	GAGATGCAGCGCTTTTGGC	TCCTGGACCGAACAGAAGC
<i>Mgl</i>	TCTTCCTCCTGGGCCACT	AAAGTAGGTTGGCCTCTCT
<i>Pdk4</i>	TTTCTCGTCTCTACGCCAAG	GATACACCAGTCATCAGCTTCG
<i>Pepck</i>	GTCAACACCGACCTCCCTTA	CCCTAGCCTGTTCTCTGTGC
<i>Plin2</i>	GAGTCCCCTGTGTTGAGCA	CCAGGACAGTCTGGCATGT
<i>Plin5</i>	TGTGTGTAGTGTGACTACCTGTGC	GGCAAGATCATTCACTGTGG
<i>Pomc</i>	ACCTCACACCGGAGAGCAA	CGGGGGTTTTT CAGTCAGGG
<i>Ucp1</i>	GGCCTCTACGACTCAGTCCA	TAAGCCGGCTGAGATCTTGT
<i>Vgat</i>	GGCAACCACCATGTA CTCTTCT	TGAGGAACAACCC CAGGTAG
<i>Vglut1</i>	AAAAGCAGCAGCCAAGGTT	CGCAGTTTAGCATTT CAGGAC
<i>Vglut2</i>	CTGGGGTCCTTGTGCAGTAT	CCGAAGCTGCCATAGACATAG
<i>Npy</i>	CCGCTCTGCGACACTACAT	TGTCTCAGGGCTGGATCTCT

8.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9 (Versión 9.3.2). Se utilizó el análisis t de Student de dos colas para comparar dos grupos bajo la misma condición. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey cuando se comparaba una variable entre más de dos grupos. Se utilizó un análisis de ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak cuando se comparaban dos variables entre dos o más grupos.

9 Referencias

- (1) World Health Organization. *WHO European Regional Obesity Report 2022*; Copenhagen, 2022.
- (2) World Health Organization. *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed 2022-08-09).
- (3) Global Burden of Disease 2015 Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *New England Journal of Medicine* **2017**, *377* (1), 13–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614362>.
- (4) Lauby-Secretan, B.; Scocciati, C.; Loomis, D.; Grosse, Y.; Bianchini, F.; Straif, K. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine* **2016**, *375* (8), 794–798. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1606602>.
- (5) Brock, J. M.; Billeter, A.; Müller-Stich, B. P.; Herth, F. Obesity and the Lung: What We Know Today. *Respiration* **2020**, *99* (10), 856–866. <https://doi.org/10.1159/000509735>.
- (6) Drewnowski, A.; Specter, S. E. Poverty and Obesity: The Role of Energy Density and Energy Costs. *Am J Clin Nutr* **2004**, *79* (1), 6–16. <https://doi.org/10.1093/AJCN/79.1.6>.
- (7) Prentice, A. M.; Jebb, S. A. Fast Foods, Energy Density and Obesity: A Possible Mechanistic Link. *Obesity Reviews* **2003**, *4* (4), 187–194. <https://doi.org/10.1046/J.1467-789X.2003.00117.X>.
- (8) Wareham, N. J.; van Sluijs, E. M. F.; Ekelund, U. Physical Activity and Obesity Prevention: A Review of the Current Evidence. *Proceedings of the Nutrition Society* **2005**, *64* (2), 229–247. <https://doi.org/10.1079/PNS2005423>.
- (9) Church, T. S.; Thomas, D. M.; Tudor-Locke, C.; Katzmarzyk, P. T.; Earnest, C. P.; Rodarte, R. Q.; Martin, C. K.; Blair, S. N.; Bouchard, C. Trends over 5 Decades in U.S. Occupation-Related Physical Activity and Their Associations with Obesity. *PLoS One* **2011**, *6* (5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0019657>.
- (10) Hill, J. O.; Wyatt, H. R.; Peters, J. C. Energy Balance and Obesity. *Circulation* **2012**, *126* (1), 126–132. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213>.
- (11) Pozo, M.; Claret, M. Hypothalamic Control of Systemic Glucose Homeostasis: The Pancreas Connection. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2018**, *29* (8), 581–594. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2018.05.001>.
- (12) Minokoshi, Y.; Alquier, T.; Furukawa, H.; Kim, Y. B.; Lee, A.; Xue, B.; Mu, J.; Fofelle, F.; Ferré, P.; Birnbaum, M. J.; Stuck, B. J.; Kahn, B. B. AMP-Kinase Regulates Food Intake by Responding to Hormonal and Nutrient Signals in the Hypothalamus. *Nature* **2004**, *428*:6982 **2004**, *428* (6982), 569–574. <https://doi.org/10.1038/nature02440>.
- (13) Riediger, T. The Receptive Function of Hypothalamic and Brainstem Centres to Hormonal and Nutrient Signals Affecting Energy Balance. *Proceedings of the Nutrition Society* **2012**, *71* (4), 463–477. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000778>.
- (14) Clark, G.; Magoun, H. W.; Ranson, S. W. Hypothalamic Regulation of Body Temperature. <https://doi.org/10.1152/jn.1939.2.1.61> **1939**, *2* (1), 61–80. <https://doi.org/10.1152/JN.1939.2.1.61>.
- (15) Palkovits, M. Hypothalamic Regulation of Food Intake. *Ideggyogy Sz* **2003**, *56* (9–10), 288–302.

- (16) McKinley, M. J.; Johnson, A. K. The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake. *News in Physiological Sciences* **2004**, *19* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1152/NIPS.01470.2003/ASSET/IMAGES/LARGE/1470-3.C.JPEG>.
- (17) *The human brain - hypothalamus - The Human Protein Atlas*. <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/brain/hypothalamus> (accessed 2023-04-25).
- (18) Rodríguez, E. M.; Blázquez, J. L.; Guerra, M. The Design of Barriers in the Hypothalamus Allows the Median Eminence and the Arcuate Nucleus to Enjoy Private Milieus: The Former Opens to the Portal Blood and the Latter to the Cerebrospinal Fluid. *Peptides (N.Y.)* **2010**, *31* (4), 757–776. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2010.01.003>.
- (19) Clark, J. T.; Kalra, P. S.; Crowley, W. R.; Kalra, S. P. Neuropeptide Y and Human Pancreatic Polypeptide Stimulate Feeding Behavior in Rats. *Endocrinology* **1984**, *115* (1), 427–429. <https://doi.org/10.1210/ENDO-115-1-427>.
- (20) Glenn Stanley, B.; Kyrkouli, S. E.; Lampert, S.; Leibowitz, S. F. Neuropeptide Y Chronically Injected into the Hypothalamus: A Powerful Neurochemical Inducer of Hyperphagia and Obesity. *Peptides (N.Y.)* **1986**, *7* (6), 1189–1192. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(86\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0196-9781(86)90149-X).
- (21) Egawa, M.; Yoshimatsu, H.; Bray, G. A. Effect of Corticotropin Releasing Hormone and Neuropeptide Y on Electrophysiological Activity of Sympathetic Nerves to Interscapular Brown Adipose Tissue. *Neuroscience* **1990**, *34* (3), 771–775. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90181-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90181-3).
- (22) Billington, C. J.; Briggs, J. E.; Grace, M.; Levine, A. S. Effects of Intracerebroventricular Injection of Neuropeptide Y on Energy Metabolism. *Am J Physiol* **1991**, *260* (2 Pt 2). <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.1991.260.2.R321>.
- (23) Morton, G. J.; Schwartz, M. W. The NPY/AgRP Neuron and Energy Homeostasis. *International Journal of Obesity* **2002**, *25* (5), S56–S62. <https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0801915>.
- (24) Sahu, A.; Kalra, P. S.; Kalra, S. P. Food Deprivation and Ingestion Induce Reciprocal Changes in Neuropeptide Y Concentrations in the Paraventricular Nucleus. *Peptides (N.Y.)* **1988**, *9* (1), 83–86. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(88\)90013-7](https://doi.org/10.1016/0196-9781(88)90013-7).
- (25) Schwartz, M. W.; Baskin, D. G.; Bukowski, T. R.; Kuijper, J. L.; Foster, D.; Lasser, G.; Prunkard, D. E.; Porte, D.; Woods, S. C.; Seeley, R. J.; Weigle, D. S. Specificity of Leptin Action on Elevated Blood Glucose Levels and Hypothalamic Neuropeptide Y Gene Expression in Ob/Ob Mice. *Diabetes* **1996**, *45* (4), 531–535. <https://doi.org/10.2337/DIAB.45.4.531>.
- (26) Benoit, S. C.; Clegg, D. J.; Seeley, R. J.; Woods, S. C. Insulin and Leptin as Adiposity Signals. **2004**.
- (27) Krashes, M. J.; Shah, B. P.; Koda, S.; Lowell, B. B. Rapid versus Delayed Stimulation of Feeding by the Endogenously Released AgRP Neuron Mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metab* **2013**, *18* (4), 588–595. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2013.09.009>.
- (28) Teubner, B. J. W.; Keen-Rhinehart, E.; Bartness, T. J. Third Ventricular Coinjection of Subthreshold Doses of NPY and AgRP Stimulate Food Hoarding and Intake and

- Neural Activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2012**, 302 (1), 37–48. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00475.2011>.
- (29) Lambert, P. D.; Couceyro, P. R.; Mcgirr, K. M.; Dall Vechia, S. E.; Smith, Y.; Kuhar, M. J. CART Peptides in the Central Control of Feeding and Interactions with Neuropeptide Y. *Synapse* **1998**, 29 (4). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199808\)29:4<293::AID-SYN1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199808)29:4<293::AID-SYN1>3.0.CO;2-0).
- (30) Vettor, R.; Fabris, R.; Pagano, C.; Federspil, G. Neuroendocrine Regulation of Eating Behavior. *J Endocrinol Invest* **2002**, 25 (10), 836–854. <https://doi.org/10.1007/BF03344047>.
- (31) Guérardel, A.; Barat-Houari, M.; Vasseur, F.; Dina, C.; Vatin, V.; Clément, K.; Eberlé, D.; Vasseur-Delannoy, V.; Bell, C. G.; Galan, P.; Hercberg, S.; Helbecque, N.; Potoczna, N.; Horber, F. F.; Boutin, P.; Froguel, P. Analysis of Sequence Variability in the CART Gene in Relation to Obesity in a Caucasian Population. *BMC Genet* **2005**, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-19>.
- (32) Yamada, K.; Yuan, X.; Otabe, S.; Koyanagi, A.; Koyama, W.; Makita, Z. Sequencing of the Putative Promoter Region of the Cocaine- and Amphetamine-Regulated-Transcript Gene and Identification of Polymorphic Sites Associated with Obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **2002**, 26 (1), 132–136. <https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0801848>.
- (33) Ellacott, K. L. J.; Cone, R. D. The Central Melanocortin System and the Integration of Short- and Long-Term Regulators of Energy Homeostasis. *Recent Prog Horm Res* **2004**, 59, 395–408. <https://doi.org/10.1210/RP.59.1.395>.
- (34) Lee, Y. S.; Challis, B. G.; Thompson, D. A.; Yeo, G. S. H.; Keogh, J. M.; Madonna, M. E.; Wraight, V.; Sims, M.; Vatin, V.; Meyre, D.; Shield, J.; Burren, C.; Ibrahim, Z.; Cheetham, T.; Swift, P.; Blackwood, A.; Hung, C. C. C.; Wareham, N. J.; Froguel, P.; Millhauser, G. L.; O’Rahilly, S.; Farooqi, I. S. A POMC Variant Implicates Beta-Melanocyte-Stimulating Hormone in the Control of Human Energy Balance. *Cell Metab* **2006**, 3 (2), 135–140. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2006.01.006>.
- (35) Hahn, T. M.; Breininger, J. F.; Baskin, D. G.; Schwartz, M. W. Coexpression of Agrp and NPY in Fasting-Activated Hypothalamic Neurons. *Nature Neuroscience* **1998** 1:4 **1998**, 1 (4), 271–272. <https://doi.org/10.1038/1082>.
- (36) Hill, J. W. Gene Expression and the Control of Food Intake by Hypothalamic POMC/CART Neurons. *Open Neuroendocrinol J* **2010**, 3, 21.
- (37) Obici, S.; Feng, Z.; Morgan, K.; Stein, D.; Karkanias, G.; Rossetti, L. Central Administration of Oleic Acid Inhibits Glucose Production and Food Intake. *Diabetes* **2002**, 51 (2), 271–275. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.51.2.271>.
- (38) Librán-Pérez, M.; Polakof, S.; López-Patiño, M. A.; Míguez, J. M.; Soengas, J. L. Evidence of a Metabolic Fatty Acid-Sensing System in the Hypothalamus and Brockmann Bodies of Rainbow Trout: Implications in Food Intake Regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2012**, 302 (11), 1340–1350. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00070.2012/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH60121279400005.JPEG>.
- (39) López, M.; Tovar, S.; Vázquez, M. J.; Nogueiras, R.; Señarís, R.; Diéguez, C. Sensing the Fat: Fatty Acid Metabolism in the Hypothalamus and the Melanocortin System. *Peptides (N.Y.)* **2005**, 26 (10), 1753–1758. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2004.11.025>.

- (40) Lam, T. K. T.; Poci, A.; Gutierrez-Juarez, R.; Obici, S.; Bryan, J.; Aguilar-Bryan, L.; Schwartz, G. J.; Rossetti, L. Hypothalamic Sensing of Circulating Fatty Acids Is Required for Glucose Homeostasis. **2005**, *11*. <https://doi.org/10.1038/nm1201>.
- (41) Lundsgaard, A. M.; Fritzen, A. M.; Kiens, B. Molecular Regulation of Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle during Aerobic Exercise. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2018**, *29* (1), 18–30. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2017.10.011>.
- (42) Foster, D. W. Malonyl-CoA: The Regulator of Fatty Acid Synthesis and Oxidation. *J Clin Invest* **2012**, *122* (6), 1958. <https://doi.org/10.1172/JCI63967>.
- (43) Obici, S.; Feng, Z.; Arduini, A.; Conti, R.; Rossetti, L. Inhibition of Hypothalamic Carnitine Palmitoyltransferase-1 Decreases Food Intake and Glucose Production. *Nat Med* **2003**, *9*, 756–761. <https://doi.org/10.1038/nm873>.
- (44) Zagmutt, S.; Mera, P.; González-García, I.; Ibeas, K.; Romero, M. del M.; Obri, A.; Martin, B.; Esteve-Codina, A.; Soler-Vázquez, M. C.; Bastias-Pérez, M.; Cañes, L.; Augé, E.; Pelegri, C.; Vilaplana, J.; Ariza, X.; García, J.; Martínez-González, J.; Casals, N.; López, M.; Palmiter, R.; Sanz, E.; Quintana, A.; Herrero, L.; Serra, D. CPT1A in AgRP Neurons Is Required for Sex-Dependent Regulation of Feeding and Thirst. *Biol Sex Differ* **2023**, *14* (1). <https://doi.org/10.1186/S13293-023-00498-8>.
- (45) Fadó, R.; Zagmutt, S.; Herrero, L.; Muley, H.; Rodríguez-Rodríguez, R.; Bi, H.; Serra, D.; Casals, N. To Be or Not to Be a Fat Burner, That Is the Question for Cpt1c in Cancer Cells. *Cell Death Dis* **2023**, *14* (1). <https://doi.org/10.1038/S41419-023-05599-1>.
- (46) Loftus, T. M.; Jaworsky, D. E.; Frehywot, G. L.; Townsend, C. a; Ronnett, G. v; Lane, M. D.; Kuhajda, F. P. Reduced Food Intake and Body Weight in Mice Treated with Fatty Acid Synthase Inhibitors. *Science* **2000**, *288*, 2379–2381. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2379>.
- (47) Gao, S.; Moran, T. H.; Lopaschuk, G. D.; Butler, A. A. Hypothalamic Malonyl-CoA and the Control of Food Intake. *Physiol Behav* **2013**, *122*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2013.07.014>.
- (48) Fantino, M. Role of Lipids in the Control of Food Intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2011**, *14* (2), 138–144. <https://doi.org/10.1097/MCO.0B013E3283437B78>.
- (49) López, M. Hypothalamic AMPK and Energy Balance. *Eur J Clin Invest* **2018**, *48* (9), 12996. <https://doi.org/10.1111/ECI.12996>.
- (50) Shi, Y.; Burn, P. Lipid Metabolic Enzymes: Emerging Drug Targets for the Treatment of Obesity. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3* (8), 695–710. <https://doi.org/10.1038/nrd1469>.
- (51) Mobbs, C. V.; Makimura, H. Block the FAS, Lose the Fat. *Nature Medicine* **2002**, *8* (4), 335–336. <https://doi.org/10.1038/NM0402-335>.
- (52) Sierra, A. Y.; Gratacós, E.; Carrasco, P.; Clotet, J.; Ureña, J.; Serra, D.; Asins, G.; Hegardt, F. G.; Casals, N. CPT1c Is Localized in Endoplasmic Reticulum of Neurons and Has Carnitine Palmitoyltransferase Activity. *J Biol Chem* **2008**, *283* (11), 6878–6885. <https://doi.org/10.1074/JBC.M707965200>.
- (53) López-Viñas, E.; Bentebibel, A.; Gurunathan, C.; Morillas, M.; De Arriaga, D.; Serra, D.; Asins, G.; Hegardt, F. G.; Gómez-Puertas, P. Definition by Functional and Structural Analysis of Two Malonyl-CoA Sites in Carnitine Palmitoyltransferase 1A. *J Biol Chem* **2007**, *282* (25), 18212–18224. <https://doi.org/10.1074/JBC.M700885200>.

- (54) Relat, J.; Pujol-Vidal, M.; Haro, D.; Marrero, P. F. A Characteristic Glu17 Residue of Pig Carnitine Palmitoyltransferase 1 Is Responsible for the Low Km for Carnitine and the Low Sensitivity to Malonyl-CoA Inhibition of the Enzyme. *FEBS J* **2009**, *276* (1), 210–218. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2008.06774.X>.
- (55) Zhu, H.; Shi, J.; De Vries, Y.; Arvidson, D. N.; Cregg, J. M.; Woldegiorgis, G. Functional Studies of Yeast-Expressed Human Heart Muscle Carnitine Palmitoyltransferase I. *Arch Biochem Biophys* **1997**, *347* (1), 53–61. <https://doi.org/10.1006/ABBI.1997.0314>.
- (56) Wolfgang, M. J.; Kurama, T.; Dai, Y.; Suwa, A.; Asaumi, M.; Matsumoto, S. I.; Cha, S. H.; Shimokawa, T.; Lane, M. D. The Brain-Specific Carnitine Palmitoyltransferase-1c Regulates Energy Homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (19), 7282–7287. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0602205103>.
- (57) Casas, M.; Fadó, R.; Domínguez, J. L.; Roig, A.; Kaku, M.; Chohnan, S.; Solé, M.; Unzeta, M.; Miñano-Molina, A. J.; Rodríguez-Álvarez, J.; Dickson, E. J.; Casals, N. Sensing of Nutrients by CPT1C Controls SAC1 Activity to Regulate AMPA Receptor Trafficking. *Journal of Cell Biology* **2020**, *219* (10). <https://doi.org/10.1083/JCB.201912045/152088>.
- (58) Zammit, V. A. Carnitine Palmitoyltransferase 1: Central to Cell Function. *IUBMB Life* **2008**, *60* (5), 347–354. <https://doi.org/10.1002/iub.78>.
- (59) Schreurs, M.; Kuipers, F.; Van Der Leij, F. R. Regulatory Enzymes of Mitochondrial β -Oxidation as Targets for Treatment of the Metabolic Syndrome. *Obesity Reviews* **2010**, *11* (5), 380–388. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00642.x>.
- (60) Ceccarelli, S. M.; Chomienne, O.; Gubler, M.; Arduini, A. Carnitine Palmitoyltransferase (CPT) Modulators: A Medicinal Chemistry Perspective on 35 Years of Research. <https://doi.org/10.1021/jm100809g>.
- (61) Giannessi, F.; Pessotto, P.; Tassoni, E.; Chiodi, P.; Conti, R.; De Angelis, F.; Dell'Uomo, N.; Catini, R.; Deias, R.; Tinti, M. O.; Carminati, P.; Arduini, A. Discovery of a Long-Chain Carbamoyl Aminocarnitine Derivative, a Reversible Carnitine Palmitoyltransferase Inhibitor with Antiketotic and Antidiabetic Activity. *J Med Chem* **2003**, *46* (2), 303–309. <https://doi.org/10.1021/JM020979U>.
- (62) Tassoni, E.; Conti, R.; Gallo, G.; Vincenti, S.; Dell'Uomo, N.; Mastrofrancesco, L.; Ricciolini, R.; Cabri, W.; Carminati, P.; Giannessi, F. Aminocarnitine Ureidic Derivatives as Inhibitors of Carnitine Palmitoyltransferase I. *ChemMedChem* **2010**, *5* (5), 666–669. <https://doi.org/10.1002/CMDC.200900535>.
- (63) Mera, P.; Bentebibel, A.; López-Viñas, E.; Cordente, A. G.; Gurunathan, C.; Sebastián, D.; Vázquez, I.; Herrero, L.; Ariza, X.; Gómez-Puertas, P.; Asins, G.; Serra, D.; García, J.; Hegardt, F. G. C75 Is Converted to C75-CoA in the Hypothalamus, Where It Inhibits Carnitine Palmitoyltransferase 1 and Decreases Food Intake and Body Weight. *Biochem Pharmacol* **2009**, *77* (6), 1084–1095. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.020>.
- (64) Cheng, S.; Wang, G.; Wang, Y.; Cai, L.; Qian, K.; Ju, L.; Liu, X.; Xiao, Y.; Wang, X. Fatty Acid Oxidation Inhibitor Etomoxir Suppresses Tumor Progression and Induces Cell Cycle Arrest via PPAR γ -Mediated Pathway in Bladder Cancer. *Clin Sci* **2019**, *133* (15), 1745–1758. <https://doi.org/10.1042/CS20190587>.

- (65) Pike, L. S.; Smift, A. L.; Croteau, N. J.; Ferrick, D. A.; Wu, M. Inhibition of Fatty Acid Oxidation by Etomoxir Impairs NADPH Production and Increases Reactive Oxygen Species Resulting in ATP Depletion and Cell Death in Human Glioblastoma Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2011**, *1807* (6), 726–734. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2010.10.022>.
- (66) Gao, S.; Serra, D.; Keung, W.; Hegardt, F. G.; Lopaschuk, G. D. Important Role of Ventromedial Hypothalamic Carnitine Palmitoyltransferase-1a in the Control of Food Intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2013**, *305* (3). <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00168.2013>.
- (67) Weis, B. C.; Cowan, A. T.; Brown, N.; Foster, D. W.; McGarry, J. D. Use of a Selective Inhibitor of Liver Carnitine Palmitoyltransferase I (CPT I) Allows Quantification of Its Contribution to Total CPT I Activity in Rat Heart. Evidence That the Dominant Cardiac CPT I Isoform Is Identical to the Skeletal Muscle Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (42), 26443–26448. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)47214-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)47214-6).
- (68) López-Viñas, E.; Bentebibel, A.; Gurunathan, C.; Morillas, M.; de Arriaga, D.; Serra, D.; Asins, G.; Hegardt, F. G.; Gómez-Puertas, P. Definition by Functional and Structural Analysis of Two Malonyl-CoA Sites in Carnitine Palmitoyltransferase 1A. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (25), 18212–18224. <https://doi.org/10.1074/JBC.M700885200>.
- (69) Shin, E. S.; Cho, S. Y.; Lee, E. H.; Lee, S. J.; Chang, I. S.; Lee, T. R. Positive Regulation of Hepatic Carnitine Palmitoyl Transferase 1A (CPT1A) Activities by Soy Isoflavones and L-Carnitine. *European Journal of Nutrition* **2005**, *45* (3), 159–164. <https://doi.org/10.1007/S00394-005-0576-5>.
- (70) Ghadimi, D.; Hemmati, M.; Karimi, N.; Khadive, T. Soy Isoflavone Genistein Is a Potential Agent for Metabolic Syndrome Treatment: A Narrative Review. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research* **2020**, *28* (127), 64–75. <https://doi.org/10.30699/jambs.28.127.64>.
- (71) Dai, J.; Liang, K.; Zhao, S.; Jia, W.; Liu, Y.; Wu, H.; Lv, J.; Cao, C.; Chen, T.; Zhuang, S.; Hou, X.; Zhou, S.; Zhang, X.; Chen, X. W.; Huang, Y.; Xiao, R. P.; Wang, Y. L.; Luo, T.; Xiao, J.; Wang, C. Chemoproteomics Reveals Baicalin Activates Hepatic CPT1 to Ameliorate Diet-Induced Obesity and Hepatic Steatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115* (26), E5896–E5905. https://doi.org/10.1073/PNAS.1801745115/SUPPL_FILE/PNAS.1801745115.SD03.XLSX.
- (72) Kuhajda, F. P.; Pizer, E. S.; Li, J. N.; Mani, N. S.; Frehywot, G. L.; Townsend, C. A. Synthesis and Antitumor Activity of an Inhibitor of Fatty Acid Synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97* (7), 3450–3455. <https://doi.org/10.1073/pnas.050582897>.
- (73) Aja, S.; Landree, L. E.; Kleman, A. M.; Medghalchi, S. M.; Vadlamudi, A.; McFadden, J. M.; Aplasca, A.; Hyun, J.; Plummer, E.; Daniels, K.; Kemm, M.; Townsend, C. A.; Thupari, J. N.; Kuhajda, F. P.; Moran, T. H.; Ronnett, G. V. Pharmacological Stimulation of Brain Carnitine Palmitoyl-Transferase-1 Decreases Food Intake and Body Weight. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2008**, *294* (2). <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00862.2006/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH60020861840009.JPEG>.
- (74) National Cancer Institute. *What Is Cancer?* - NCI. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed 2023-01-03).

- (75) International Agency for Research on Cancer. *Cancer Today*. <https://gco.iarc.fr/today/home> (accessed 2023-01-03).
- (76) National Cancer Institute. *Common Cancer Types - NCI*. <https://www.cancer.gov/types/common-cancers> (accessed 2023-01-03).
- (77) Anand, P.; Kunnumakara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Tharakan, S. T.; Lai, O. S.; Sung, B.; Aggarwal, B. B. Cancer Is a Preventable Disease That Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res* **2008**, *25* (9), 2097. <https://doi.org/10.1007/S11095-008-9661-9>.
- (78) Boffetta, P.; Hashibe, M. Alcohol and Cancer. *Lancet Oncol* **2006**, *7* (2), 149–156. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70577-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70577-0).
- (79) Stickel, F.; Schuppan, D.; Hahn, E. G.; Seitz, H. K. Cocarcinogenic Effects of Alcohol in Hepatocarcinogenesis. *Gut* **2002**, *51* (1), 132–139. <https://doi.org/10.1136/GUT.51.1.132>.
- (80) Keramatnia, A.; Hassanipour, S.; Nazarzadeh, M.; Wurtz, M.; Monfared, A. B.; Khayyamzadeh, M.; Bidel, Z.; Mhrvar, N.; Mosavi-Jarrahi, A. Correlation Between Nitrogen Dioxide as an Air Pollution Indicator and Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2016**, *17* (1), 419–424. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.1.419>.
- (81) Sasco, A. J.; Secretan, M. B.; Straif, K. Tobacco Smoking and Cancer: A Brief Review of Recent Epidemiological Evidence. *Lung Cancer* **2004**, *45* (SUPPL. 2), S3–S9. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.07.998>.
- (82) Winzer, B. M.; Whiteman, D. C.; Reeves, M. M.; Paratz, J. D. Physical Activity and Cancer Prevention: A Systematic Review of Clinical Trials. *Cancer Causes and Control* **2011**, *22* (6), 811–826. <https://doi.org/10.1007/S10552-011-9761-4/METRICS>.
- (83) Kushi, L. H.; Byers, T.; Doyle, C.; Bandera, E. V.; McCullough, M.; Gansler, T.; Andrews, K. S.; Thun, M. J. American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for Cancer Prevention: Reducing the Risk of Cancer With Healthy Food Choices and Physical Activity*. **2006**. <https://doi.org/10.3322/canjclin.56.5.254>.
- (84) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>.
- (85) Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* **1927**, *8* (6), 519. <https://doi.org/10.1085/JGP.8.6.519>.
- (86) Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science (1979)* **1956**, *123* (3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.123.3191.309/ASSET/A8D38B53-799F-4009-AAD3-E77CEF33D301/ASSETS/SCIENCE.123.3191.309.FP.PNG>.
- (87) Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E. Energy Metabolism in Tumor Cells. *FEBS J* **2007**, *274* (6), 1393–1418. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2007.05686.X>.
- (88) Fantin, V. R.; St-Pierre, J.; Leder, P. Attenuation of LDH-A Expression Uncovers a Link between Glycolysis, Mitochondrial Physiology, and Tumor Maintenance. *Cancer Cell* **2006**, *9* (6), 425–434. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2006.04.023>.
- (89) Weinhouse, S. The Warburg Hypothesis Fifty Years Later. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* **1976**, *87* (2), 115–126. <https://doi.org/10.1007/BF00284370>.

- (90) Heiden, M. G. V.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, *324* (5930), 1029. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1160809>.
- (91) Kozal, K.; Jóźwiak, P.; Krześlak, A. Contemporary Perspectives on the Warburg Effect Inhibition in Cancer Therapy. *Cancer Control* **2021**, *28*. https://doi.org/10.1177/10732748211041243/ASSET/IMAGES/10.1177_10732748211041243-IMG1.PNG.
- (92) PORTAIS, J. -C; SCHUSTER, R.; MERLE, M.; CANIONI, P. Metabolic Flux Determination in C6 Glioma Cells Using Carbon-13 Distribution upon [1-13C]Glucose Incubation. *Eur J Biochem* **1993**, *217* (1), 457–468. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1993.TB18265.X>.
- (93) Moreno-Sánchez, R.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E.; Pardo, J. P.; Ralph, S. J.; Rodríguez-Enríquez, S. Who Controls the ATP Supply in Cancer Cells? Biochemistry Lessons to Understand Cancer Energy Metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* **2014**, *50* (1), 10–23. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2014.01.025>.
- (94) Lee, H.; Woo, S. M.; Jang, H.; Kang, M.; Kim, S. Y. Cancer Depends on Fatty Acids for ATP Production: A Possible Link between Cancer and Obesity. *Semin Cancer Biol* **2022**, *86*, 347–357. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2022.07.005>.
- (95) Leray, C. *Introduction to Lipidomics: From Bacteria to Man*; 2012.
- (96) Pearce, J. Fatty Acid Synthesis in Liver and Adipose Tissue. *Proceedings of the Nutrition Society* **1983**, *42* (2), 263–271. <https://doi.org/10.1079/PNS19830031>.
- (97) Medes, G.; Thomas, A.; Weinhouse, S. A Study of Lipid Synthesis in Neoplastic Tissue Slices in Vitro*. *Cancer Res* **1953**, *13*, 27–29.
- (98) Rysman, E.; Brusselmans, K.; Scheys, K.; Timmermans, L.; Derua, R.; Munck, S.; van Veldhoven, P. P.; Waltregny, D.; Daniëls, V. W.; Machiels, J.; Vanderhoydonc, F.; Smans, K.; Waelkens, E.; Verhoeven, G.; Swinnen, J. v. De Novo Lipogenesis Protects Cancer Cells from Free Radicals and Chemotherapeutics by Promoting Membrane Lipid Saturation. *Cancer Res* **2010**, *70* (20), 8117–8126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3871/655989/P/DE-NOVO-LIPOGENESIS-PROTECTS-CANCER-CELLS-FROM>.
- (99) Baenke, F.; Peck, B.; Miess, H.; Schulze, A. Hooked on Fat: The Role of Lipid Synthesis in Cancer Metabolism and Tumour Development. *Dis Model Mech* **2013**, *6* (6), 1353–1363. <https://doi.org/10.1242/DMM.011338>.
- (100) Seguin, F.; Carvalho, M. A.; Bastos, D. C.; Agostini, M.; Zecchin, K. G.; Alvarez-Flores, M. P.; Chudzinski-Tavassi, A. M.; Coletta, R. D.; Graner, E. The Fatty Acid Synthase Inhibitor Orlistat Reduces Experimental Metastases and Angiogenesis in B16-F10 Melanomas. *British Journal of Cancer* **2012**, *107* (6), 977–987. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.355>.
- (101) Fhu, C. W.; Ali, A. Fatty Acid Synthase: An Emerging Target in Cancer. *Molecules* **2020**, *25* (17). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25173935>.
- (102) Kim, J. B.; Sarraf, P.; Wright, M.; Yao, K. M.; Mueller, E.; Solanes, G.; Lowell, B. B.; Spiegelman, B. M. Nutritional and Insulin Regulation of Fatty Acid Synthetase and Leptin Gene Expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* **1998**, *101* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1172/JCI1411>.
- (103) Horton, J. D.; Bashmakov, Y.; Shimomura, I.; Shimano, H. Regulation of Sterol Regulatory Element Binding Proteins in Livers of Fasted and Refed Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95* (11), 5987–5992.

- <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.11.5987/ASSET/19481A1D-0A6B-4D8B-ABD3-E4CCE991D813/ASSETS/GRAPHIC/PQ1080890006.JPEG>.
- (104) Shimomura, I.; Bashmakov, Y.; Ikemoto, S.; Horton, J. D.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. Insulin Selectively Increases SREBP-1C mRNA in the Livers of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (24), 13656–13661. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.24.13656/ASSET/F4C82927-A669-40BD-9626-6246986C2FA7/ASSETS/GRAPHIC/PQ2293675004.JPEG>.
- (105) Ye, J.; DeBose-Boyd, R. A. Regulation of Cholesterol and Fatty Acid Synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, *3* (7), 1–13. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A004754>.
- (106) Brusselmans, K.; de Schrijver, E.; Verhoeven, G.; Swinnen, J. v. RNA Interference-Mediated Silencing of the Acetyl-CoA-Carboxylase- α Gene Induces Growth Inhibition and Apoptosis of Prostate Cancer Cells. **2005**.
- (107) Zhou, W.; Simpson, P. J.; Mcfadden, J. M.; Townsend, C. A.; Medghalchi, S. M.; Vadlamudi, A.; Pinn, M. L.; Ronnett, G. v; Kuhajda, F. P. Fatty Acid Synthase Inhibition Triggers Apoptosis during S Phase in Human Cancer Cells 1. *Cancer Res* **2003**, *63*, 7330–7337.
- (108) Pizer, E. S.; Jackisch, C.; Wood, F. D.; Pasternack, G. R.; Davidson, N. E.; Kuhajda, F. P. Inhibition of Fatty Acid Synthesis Induces Programmed Cell Death in Human Breast Cancer Cells 1. *Cancer Res* **1970**, *56*, 2745–2747.
- (109) Menendez, J. A.; Lupu, R. Fatty Acid Synthase and the Lipogenic Phenotype in Cancer Pathogenesis. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7* (10), 763–777. <https://doi.org/10.1038/NRC2222>.
- (110) Vance, D.; Goldberg, I.; Mitsuhashi, O.; Bloch, K.; Omura, S.; Nomura, S. Inhibition of Fatty Acid Synthetases by the Antibiotic Cerulenin. *Biochem Biophys Res Commun* **1972**, *48* (3), 649–656. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(72\)90397-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(72)90397-X).
- (111) Ōmura, S. [39] Cerulenin. *Methods Enzymol* **1981**, *72* (C), 520–532. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)72041-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)72041-X).
- (112) Funabashi, H.; Kawaguchi, A.; Tomoda, H.; Omura, S.; Okuda, S.; Iwasaki, S. Binding Site of Cerulenin in Fatty Acid Synthetase. *J. Biochem* **1989**, *105*, 751–755.
- (113) Ho, T. S.; Ho, Y. P.; Wong, W. Y.; Chi-Ming Chiu, L.; Wong, Y. S.; Eng-Choon Ooi, V. Fatty Acid Synthase Inhibitors Cerulenin and C75 Retard Growth and Induce Caspase-Dependent Apoptosis in Human Melanoma A-375 Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2007**, *61* (9), 578–587. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2007.08.020>.
- (114) Furuya, Y.; Akimoto, S.; Yasuda, K.; Ito, H. Apoptosis of Androgen-Independent Prostate Cell Line Induced by Inhibition of Fatty Acid Synthesis. *Anticancer Res* **1997**, *17* (6D), 4589–4593.
- (115) Shiragami, R.; Murata, S.; Kosugi, C.; Tezuka, T.; Yamazaki, M.; Hirano, A.; Yoshimura, Y.; Suzuki, M.; Shuto, K.; Koda, K. Enhanced Antitumor Activity of Cerulenin Combined with Oxaliplatin in Human Colon Cancer Cells. *Int J Oncol* **2013**, *43* (2), 431–438. <https://doi.org/10.3892/IJO.2013.1978/HTML>.
- (116) Murata, S.; Yanagisawa, K.; Fukunaga, K.; Oda, T.; Kobayashi, A.; Sasaki, R.; Ohkohchi, N. Fatty Acid Synthase Inhibitor Cerulenin Suppresses Liver Metastasis of Colon Cancer in Mice. *Cancer Sci* **2010**, *101* (8), 1861–1865. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.2010.01596.X>.

- (117) Murata, S.; Shiragami, R.; Maruyama, T.; Koda, K.; Ohkohchi, N. Fatty Acid Synthase Inhibitor Cerulenin Suppresses Colorectal Cancer in Combination with Oxaliplatin. *Austin J Surg* **2014**, *1* (3).
- (118) Liu, Z.; Zhou, Y.; Luo, Q.; Hu, M.; Wang, G.; Huang, S.; Shu, Y. Inhibition of Fatty Acid Synthase Suppresses Osteosarcoma Cell Invasion and Migration. *Indian J Pathol Microbiol* **2012**, *55* (2), 163. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.97849>.
- (119) Oliveras, G.; Blancafort, A.; Urruticoechea, A.; Campuzano, O.; Gómez-Cabello, D.; Brugada, R.; López-Rodríguez, M. L.; Colomer, R.; Puig, T. Novel Anti-Fatty Acid Synthase Compounds with Anti-Cancer Activity in HER2+ Breast Cancer. *Ann N Y Acad Sci* **2010**, *1210* (1), 86–92. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2010.05777.X>.
- (120) Oishi, H.; Noto, T.; Sasaki, H.; Suzuki, K.; Hayashi, T.; Okazaki, H.; Ando, K.; Sawada, M. THIOLACTOMYCIN, A NEW ANTIBIOTIC I. TAXONOMY OF THE PRODUCING ORGANISM, FERMENTATION AND BIOLOGICAL PROPERTIES. *J Antibiot (Tokyo)* **1982**, *35* (4), 391–395. <https://doi.org/10.7164/ANTIBIOTICS.35.391>.
- (121) Hayashi, T.; Yamamoto, O.; Sasaki, H.; Kawaguchi, A.; Okazaki, H. Mechanism of Action of the Antibiotic Thiolactomycin Inhibition of Fatty Acid Synthesis of Escherichia Coli. *Biochem Biophys Res Commun* **1983**, *115* (3), 1108–1113. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(83\)80050-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(83)80050-3).
- (122) McFadden, J. M.; Medghalchi, S. M.; Thupari, J. N.; Pinn, M. L.; Vadlamudi, A.; Miller, K. I.; Kuhajda, F. P.; Townsend, C. A. Application of a Flexible Synthesis of (5R)-Thiolactomycin to Develop New Inhibitors of Type I Fatty Acid Synthase. *J Med Chem* **2005**, *48* (4), 946–961. <https://doi.org/10.1021/JM049389H>.
- (123) Alli, P. M.; Finn, M. L.; Jaffee, E. M.; McFadden, J. M.; Kuhajda, F. P. Fatty Acid Synthase Inhibitors Are Chemopreventive for Mammary Cancer in Neu-N Transgenic Mice. *Oncogene* **2005**, *24*:1 **2004**, *24* (1), 39–46. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208174>.
- (124) McNeely, W.; Benfield, P.; Drent, L.; Pi-Sunyer, F. X. Orlistat. *Drugs* **1998**, *56* (2), 241–249. <https://doi.org/10.2165/00003495-199856020-00007>.
- (125) Kridel, S. J.; Axelrod, F.; Rozenkrantz, N.; Smith, J. W. Orlistat Is a Novel Inhibitor of Fatty Acid Synthase with Antitumor Activity. *Cancer Res* **2070**, *64*.
- (126) Schcolnik-Cabrera, A.; Chávez-Blanco, A.; Domínguez-Gómez, G.; Taja-Chayeb, L.; Morales-Barcenas, R.; Trejo-Becerril, C.; Perez-Cardenas, E.; Gonzalez-Fierro, A.; Dueñas-González, A. Orlistat as a FASN Inhibitor and Multitargeted Agent for Cancer Therapy. *Expert Opin Investig Drugs* **2018**, *27* (5), 475–489. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1471132>.
- (127) Chuang, H. Y.; Chang, Y. F.; Hwang, J. J. Antitumor Effect of Orlistat, a Fatty Acid Synthase Inhibitor, Is via Activation of Caspase-3 on Human Colorectal Carcinoma-Bearing Animal. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2011**, *65* (4), 286–292. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2011.02.016>.
- (128) Yang, P.; Liu, K.; Lear, M. J.; Yao, S. Q. Activity-Based Proteome Profiling of Potential Cellular Targets of Orlistat-An FDA-Approved Drug with Anti-Tumor Activities Chemical Probes View Project Drug Repurposing View Project. **2009**. <https://doi.org/10.1021/ja907716f>.
- (129) Heuer, T. S.; Ventura, R.; Mordec, K.; Lai, J.; Fridlib, M.; Buckley, D.; Kemble, G. FASN Inhibition and Taxane Treatment Combine to Enhance Anti-Tumor Efficacy in Diverse Xenograft Tumor Models through Disruption of Tubulin Palmitoylation

- and Microtubule Organization and FASN Inhibition-Mediated Effects on Oncogenic Signaling and Gene Expression. *EBioMedicine* **2017**, *16*, 51–62. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2016.12.012>.
- (130) Zhi, J.; Melia, A. T.; Eggers, H.; Joly, R.; Patel, I. H. Review of Limited Systemic Absorption of Orlistat, a Lipase Inhibitor, in Healthy Human Volunteers. *J Clin Pharmacol* **1995**, *35* (11), 1103–1108. <https://doi.org/10.1002/J.1552-4604.1995.TB04034.X>.
- (131) Zhang, R.; Xiao, W.; Wang, X.; Wu, X.; Tian, W. Novel Inhibitors of Fatty-Acid Synthase from Green Tea (*Camellia Sinensis* Xihu Longjing) with High Activity and a New Reacting Site. *Biotechnol Appl Biochem* **2006**, *43* (1), 1. <https://doi.org/10.1042/BA20050064>.
- (132) Evanchik, M.; Cai, H.; Feng, Q.; Hu, L. W.; Johnson, R.; Kemble, G.; Kosaka, Y.; Lai, J.; Oslob, J.; Sivaraja, M.; Tep, S.; Yan, H.-Q.; Zaharia, C.; Mcdowell, R. TvB-2640, a Novel Anti-Hcv Agent, Safely Causes Sustained Host-Target Inhibition in Vivo : 1876. *Hepatology* **2012**.
- (133) Montesdeoca, N.; López, M.; Ariza, X.; Herrero, L.; Makowski, K. Inhibitors of Lipogenic Enzymes as a Potential Therapy against Cancer. *FASEB Journal* **2020**, *34* (9), 11355–11381. <https://doi.org/10.1096/FJ.202000705R>.
- (134) Patel, M.; Infante, J.; von Hoff, D.; Jones, S.; Burris, H.; Brenner, A.; McCulloch, W.; Zhukova-Harrill, V.; Kemble, G.; Parsey, M. Abstract CT203: Report of a First-in-Human Study of the First-in-Class Fatty Acid Synthase (FASN) Inhibitor TVB-2640. *Cancer Res* **2015**, *75* (15_Supplement), CT203–CT203. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-CT203>.
- (135) Syed-Abdul, M. M.; Parks, E. J.; Gaballah, A. H.; Bingham, K.; Hammoud, G. M.; Kemble, G.; Buckley, D.; McCulloch, W.; Manrique-Acevedo, C. Fatty Acid Synthase Inhibitor TVB-2640 Reduces Hepatic de Novo Lipogenesis in Males With Metabolic Abnormalities. *Hepatology* **2020**, *72* (1), 103–118. <https://doi.org/10.1002/HEP.31000>.
- (136) Dean, E. J.; Falchook, G. S.; Patel, M. R.; Brenner, A. J.; Infante, J. R.; Arkenau, H.-T.; Borazanci, E. H.; Lopez, J. S.; Pant, S.; Schmid, P.; Frankel, A. E.; Jones, S. F.; McCulloch, W.; Kemble, G.; O'Farrell, M.; Burris, H. Preliminary Activity in the First in Human Study of the First-in-Class Fatty Acid Synthase (FASN) Inhibitor, TVB-2640. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.2512 **2016**, *34* (15_suppl), 2512–2512. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_SUPPL.2512.
- (137) Falchook, G.; Infante, J.; Arkenau, H. T.; Patel, M. R.; Dean, E.; Borazanci, E.; Brenner, A.; Cook, N.; Lopez, J.; Pant, S.; Frankel, A.; Schmid, P.; Moore, K.; McCulloch, W.; Grimmer, K.; O'Farrell, M.; Kemble, G.; Burris, H. First-in-Human Study of the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of First-in-Class Fatty Acid Synthase Inhibitor TVB-2640 Alone and with a Taxane in Advanced Tumors. *EClinicalMedicine* **2021**, *34*, 100797. <https://doi.org/10.1016/J.ECLINM.2021.100797>.
- (138) Kuhajda, F. P.; Pizer, E. S.; Li, J. N.; Mani, N. S.; Frehywot, G. L.; Townsend, C. A. Synthesis and Antitumor Activity of an Inhibitor of Fatty Acid Synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97* (7), 3450–3454. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.7.3450>.
- (139) Rendina, A. R.; Cheng, D. Characterization of the Inactivation of Rat Fatty Acid Synthase by C75: Inhibition of Partial Reactions and Protection by Substrates. *Biochem J* **2005**, *388* (Pt 3), 895–903. <https://doi.org/10.1042/BJ20041963>.

- (140) Pizer, E. S.; Thupari, J.; Han, W. F.; Pinn, M. L.; Chrest, F. J.; Frehywot, G. L.; Townsend, C. A.; Kuhajda, F. P. Malonyl-Coenzyme-A Is a Potential Mediator of Cytotoxicity Induced by Fatty-Acid Synthase Inhibition in Human Breast Cancer Cells and Xenografts 1. *Cancer Res* **2000**, *60*, 213–218.
- (141) Thupari, J. N.; Landree, L. E.; Ronnett, G. v.; Kuhajda, F. P. C75 Increases Peripheral Energy Utilization and Fatty Acid Oxidation in Diet-Induced Obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (14), 9498–9502. <https://doi.org/10.1073/PNAS.132128899>.
- (142) Takahashi, K. A.; Smart, J. L.; Liu, H.; Cone, R. D. The Anorexigenic Fatty Acid Synthase Inhibitor, C75, Is a Nonspecific Neuronal Activator. *Endocrinology* **2004**, *145* (1), 184–193. <https://doi.org/10.1210/EN.2003-0337>.
- (143) Makowski, K.; Mera, P.; Paredes, D.; Herrero, L.; Ariza, X.; Asins, G.; Hegardt, F. G.; García, J.; Serra, D. Differential Pharmacologic Properties of the Two C75 Enantiomers: (+)-C75 Is a Strong Anorectic Drug; (-)-C75 Has Antitumor Activity. *Chirality* **2013**, *25* (5), 281–287. <https://doi.org/10.1002/chir.22139>.
- (144) Makowski, K.; Mir, J. F.; Mera, P.; Ariza, X.; Asins, G.; Hegardt, F. G.; Herrero, L.; García, J.; Serra, D. (-)-UB006: A New Fatty Acid Synthase Inhibitor and Cytotoxic Agent without Anorexic Side Effects. *Eur J Med Chem* **2017**, *131*, 207–221. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.012>.
- (145) Pappenberger, G.; Benz, J.; Gsell, B.; Hennig, M.; Ruf, A.; Stihle, M.; Thoma, R.; Rudolph, M. G. Structure of the Human Fatty Acid Synthase KS–MAT Didomain as a Framework for Inhibitor Design. *J Mol Biol* **2010**, *397* (2), 508–519. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2010.01.066>.
- (146) Puig, T.; Vázquez-Martín, A.; Relat, J.; Pétriz, J.; Menéndez, J. A.; Porta, R.; Casals, G.; Marrero, P. F.; Haro, D.; Brunet, J.; Colomer, R. Fatty Acid Metabolism in Breast Cancer Cells: Differential Inhibitory Effects of Epigallocatechin Gallate (EGCG) and C75. *Breast Cancer Res Treat* **2008**, *109* (3), 471–479. <https://doi.org/10.1007/S10549-007-9678-5/METRICS>.
- (147) Pizer, E. S.; Pflug, B. R.; Steven Bova, G.; Han, W. F.; Udan, M. S.; Nelson, J. B. Increased Fatty Acid Synthase as a Therapeutic Target in Androgen-Independent Prostate Cancer Progression. *Prostate* **2001**, *47* (2), 102–110. <https://doi.org/10.1002/PROS.1052>.
- (148) Wagner, R.; Stübiger, G.; Veigel, D.; Wuczkowski, M.; Lanzerstorfer, P.; Weghuber, J.; Karteris, E.; Nowikovsky, K.; Wilfinger-Lutz, N.; Singer, C. F.; Colomer, R.; Benhamú, B.; López-Rodríguez, M. L.; Valent, P.; Grunt, T. W. Multi-Level Suppression of Receptor-PI3K-MTORC1 by Fatty Acid Synthase Inhibitors Is Crucial for Their Efficacy against Ovarian Cancer Cells. *Oncotarget* **2017**, *8* (7), 11600–11613. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.14591>.
- (149) Rae, C.; Fragkoulis, G. I.; Chalmers, A. J. Cytotoxicity and Radiosensitizing Activity of the Fatty Acid Synthase Inhibitor C75 Is Enhanced by Blocking Fatty Acid Uptake in Prostate Cancer Cells. *Adv Radiat Oncol* **2020**, *5* (5), 994–1005. <https://doi.org/10.1016/J.ADRO.2020.06.022>.
- (150) Kumar, M. v.; Shimokawa, T.; Nagy, T. R.; Lane, M. D. Differential Effects of a Centrally Acting Fatty Acid Synthase Inhibitor in Lean and Obese Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (4), 1921. <https://doi.org/10.1073/PNAS.042683699>.
- (151) Clegg, D. J.; Wortman, M. D.; Benoit, S. C.; McOsker, C. C.; Seeley, R. J. Comparison of Central and Peripheral Administration of C75 on Food Intake, Body Weight, and

- Conditioned Taste Aversion. *Diabetes* **2002**, *51* (11), 3196–3201. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.51.11.3196>.
- (152) Shimokawa, T.; Kumar, M. v.; Lane, M. D. Effect of a Fatty Acid Synthase Inhibitor on Food Intake and Expression of Hypothalamic Neuropeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (1), 66–71. <https://doi.org/10.1073/PNAS.012606199>.
- (153) Cha, S. H.; Hu, Z.; Chohnan, S.; Lane, M. D. Inhibition of Hypothalamic Fatty Acid Synthase Triggers Rapid Activation of Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (41), 14557. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0507300102>.
- (154) Cassolla, P.; Uchoa, E. T.; Mansur Machado, F. S.; Guimarães, J. B.; Rissato Garófalo, M. A.; de Almeida Brito, N.; Kagohara Elias, L. L.; Coimbra, C. C.; do Carmo Kettelhut, I.; Carvalho Navegantes, L. C. The Central Administration of C75, a Fatty Acid Synthase Inhibitor, Activates Sympathetic Outflow and Thermogenesis in Interscapular Brown Adipose Tissue. *Pflugers Arch* **2013**, *465* (12), 1687–1699. <https://doi.org/10.1007/S00424-013-1301-5/METRICS>.
- (155) Tu, Y.; Thupari, J. N.; Kim, E. K.; Pinn, M. L.; Moran, T. H.; Ronnett, G. v.; Kuhajda, F. P. C75 Alters Central and Peripheral Gene Expression to Reduce Food Intake and Increase Energy Expenditure. *Endocrinology* **2005**, *146* (1), 486–493. <https://doi.org/10.1210/EN.2004-0976>.
- (156) Thupari, J. N.; Landree, L. E.; Ronnett, G. v.; Kuhajda, F. P. C75 Increases Peripheral Energy Utilization and Fatty Acid Oxidation in Diet-Induced Obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (14), 9498–9502. <https://doi.org/10.1073/PNAS.132128899>.
- (157) Nicot, C.; Napal, L.; Relat, J.; González, S.; Llebaria, A.; Woldegiorgis, G.; Marrero, P. F.; Haro, D. C75 Activates Malonyl-CoA Sensitive and Insensitive Components of the CPT System. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**, *325* (3), 660–664. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.10.085>.
- (158) Yang, N.; Kays, J. S.; Skillman, T. R.; Burris, L.; Seng, T. W.; Hammond, C. C75 [4-Methylene-2-Octyl-5-Oxo-Tetrahydro-Furan-3-Carboxylic Acid] Activates Carnitine Palmitoyltransferase-1 in Isolated Mitochondria and Intact Cells without Displacement of Bound Malonyl CoA. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, *312* (1), 127–133. <https://doi.org/10.1124/JPET.104.074104>.
- (159) Rohrbach, K. W.; Han, S.; Gan, J.; O'Tanyi, E. J.; Zhang, H.; Chi, C. L.; Taub, R.; Largent, B. L.; Cheng, D. Disconnection between the Early Onset Anorectic Effects by C75 and Hypothalamic Fatty Acid Synthase Inhibition in Rodents. *Eur J Pharmacol* **2005**, *511* (1), 31–41. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2005.01.034>.
- (160) Bentebibel, A.; Sebastián, D.; Herrero, L.; López-Viñas, E.; Serra, D.; Asins, G.; Gómez-Puertas, P.; Hegardt, F. G. Novel Effect of C75 on Carnitine Palmitoyltransferase I Activity and Palmitate Oxidation. *Biochemistry* **2006**, *45* (14), 4339–4350. <https://doi.org/10.1021/BI052186Q/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BI052186QN00001.GIF>.
- (161) Makowski, K. Síntesis de Análogos de C75 y Su Evaluación Como Potenciales Fármacos Anoréxicos y Antitumorales, Universitat de Barcelona, 2012. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=253238&info=resumen&idioma=SPA> (accessed 2023-01-11).

- (162) Zhou, W.; Simpson, P. J.; McFadden, J. M.; Townsend, C. A.; Medghalchi, S. M.; Vadlamudi, A.; Pinn, M. L.; Ronnett, G. v.; Kuhajda, F. P. Fatty Acid Synthase Inhibition Triggers Apoptosis during S Phase in Human Cancer Cells. *Cancer Res* **2003**, *63* (21), 7330–7337.
- (163) Murta, M. M.; Azevedo, M. B. M. de; Greene, A. E. An Improved Procedure for α -Methylenation of Lactones. *Synth Commun* **1993**, *23* (4), 495–503. <https://doi.org/10.1080/00397919308009804>.
- (164) Yamada, K.; Kato, M.; Hirata, Y. New Methods for α -Methylenation of γ -Butyrolactones. *Tetrahedron Lett* **1973**, *14* (29), 2745–2746. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)96128-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)96128-3).
- (165) Tanaka, A.; Yamashita, K. A Simple Procedure for α -Methylenation or γ - and δ -Lactones. *Agric Biol Chem* **1978**, *42* (8), 1585–1588. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863208>.
- (166) Baldwin, J. E. Rules for Ring Closure. *J Chem Soc Chem Commun* **1976**, *18*, 734–736. <https://doi.org/10.1039/C39760000734>.
- (167) Jones, G. The Knoevenagel Condensation. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, 2011. <https://doi.org/10.1002/0471264180.or015.02>.
- (168) Rao, B. V. S. K.; Vijayalakshmi, P.; Subbarao, R. Synthesis of Long-Chain (E)-3-Alkenoic Acids by the Knoevenagel Condensation of Aliphatic Aldehydes with Malonic Acid. *J Am Oil Chem Soc* **1993**, *70* (3), 297–299. <https://doi.org/10.1007/BF02545311>.
- (169) VanRheenen, V.; Kelly, R. C.; Cha, D. Y. An Improved Catalytic OsO₄ Oxidation of Olefins to Cis-1,2-Glycols Using Tertiary Amine Oxides as the Oxidant. *Tetrahedron Lett* **1976**, *23*, 1973–1976. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)78093-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)78093-2).
- (170) Deubel, D. v.; Frenking, G. [3+2] versus [2+2] Addition of Metal Oxides across C=C Bonds. Reconciliation of Experiment and Theory. *Acc Chem Res* **2003**, *36* (9), 654–651. <https://doi.org/10.1021/ar020268q>.
- (171) Riofski, M. v.; John, J. P.; Zheng, M. M.; Kirshner, J.; Colby, D. A. Exploiting the Facile Release of Trifluoroacetate for the α -Methylenation of the Sterically Hindered Carbonyl Groups on (+)-Sclareolide and (-)-Eburnamonine. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76* (10), 3676–3683. <https://doi.org/10.1021/jo102114f>.
- (172) Koyama, K.; Kojima, K. A Stereoselective Total Synthesis of a Stable Prostacyclin Analog, DI-9(O)-Methano- $\Delta^6(9\alpha)$ -Prostaglandin I₁. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **1984**, *32* (7), 2866–2869. <https://doi.org/10.1248/cpb.32.2866>.
- (173) Fernandes, R. A.; Kattanguru, P.; Bethi, V. Stereoselective Inversion of γ -Vinyl- γ -Butyrolactone under Palladium Catalysis: Application to the Synthesis of (+)-Exo- and (+)-Endo-Brevicomins. *RSC Adv* **2014**, *4* (28), 14507–14512. <https://doi.org/10.1039/C4RA00814F>.
- (174) Evans, M. E.; Parrish, F. W.; Long, L. Acetal Exchange Reactions. *Carbohydr Res* **1967**, *3* (4), 453–462. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81677-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81677-8).
- (175) Kitamura, M.; Isobe, M.; Ichikawa, Y.; Goto, T. Stereocontrolled Total Synthesis of (\pm)-Maytansinol. *J Am Chem Soc* **1982**, *104*, 4997–4999. <https://doi.org/10.1021/ja00323a032>.
- (176) Lin, M. H.; Lin, L. Z.; Chuang, T. H. SnCl₂/KI-Mediated Allylation Reactions of Formaldehyde in Water. *Synlett* **2011**, *13*, 1871–1874. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1260757>.

- (177) Li, C.-J.; Li, C. J. Aqueous Barbier-Grignard Type Reaction: Scope, Mechanism, and Synthetic Applications. *Tetrahedron* **1996**, *52* (16), 5643–5668. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)01056-4](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)01056-4).
- (178) Mendgen, T.; Scholz, T.; Klein, C. D. Structure-Activity Relationships of Tulipalines, Tuliposides, and Related Compounds as Inhibitors of MurA. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20* (19), 5757–5762. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.139>.
- (179) Stephenson, L. M.; Speth, D. R. Mechanism of Allylic Hydroxylation by Selenium Dioxide. *Journal of Organic Chemistry* **1979**, *44* (25), 4683–4689. <https://doi.org/10.1021/jo00393a045>.
- (180) Sakai, R.; Oiwa, C.; Takaishi, K.; Kamiya, H.; Tagawa, M. Dysibetaine: A New α , α -Disubstituted α -Amino Acid Derivative from the Marine Sponge *Dysidea Herbacea*. *Tetrahedron Lett* **1999**, *40* (38), 6941–6944. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)01356-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)01356-8).
- (181) Boyd, D. B.; Elzey, T. K.; Hatfield, L. D.; Kinnick, M. D.; Morin, J. M. γ -Lactam Analogues of the Penems. *Tetrahedron Lett* **1986**, *27* (30), 3453–3456. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)84820-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)84820-0).
- (182) Baldwin, J. E.; Lowe, C.; Schofield, C. J.; Lee, E. A γ -Lactam Analogue of Penems Possessing Antibacterial Activity. *Tetrahedron Lett* **1986**, *27* (30), 3461–3464. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)84822-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)84822-4).
- (183) Santos Álvarez, D. Síntesis de Estructuras β -Metilén- γ -Butirolactónicas y Análogos Nitrogenados. Evaluación Como Posibles Agentes Antitumorales, Universitat de Barcelona, Barcelona, 2015. www.tdx.cat (accessed 2023-02-15).
- (184) Elaas, N. A.; Huang, D.; Wang, K. H.; Su, Y.; Hu, Y. Tin Powder-Promoted Allylation and Cyclization of 2-(Benzylideneamino)Isoindoline-1,3-Diones. *Heterocycl Comm* **2018**, *24* (3), 159–163. <https://doi.org/10.1515/HC-2017-0249/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- (185) Xu, Y.; Huang, D.; Wang, K. H.; Ma, J.; Su, Y.; Fu, Y.; Hu, Y. Tin Powder-Promoted One-Pot Construction of α -Methylene- γ -Lactams and Spirolactams from Aldehydes or Ketones, Acylhydrazines, and 2-(Bromomethyl)Acrylate. *Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80* (24), 12224–12233. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02154>.
- (186) Staas, D. D.; Savage, K. L.; Homnick, C. F.; Tsou, N. N.; Ball, R. G. Asymmetric Synthesis of α , α -Difluoro- β -Amino Acid Derivatives from Enantiomerically Pure N-Tert-Butylsulfinimines. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (23), 8276–8279. <https://doi.org/10.1021/jo0259313>.
- (187) Dema, H. K.; Foubelo, F.; Yus, M. Enantioselective Synthesis of α -Methylene γ -Butyrolactams Using N-Tert-Butanesulfinamides. *Heterocycles* **2010**, *82* (2), 1411–1421. [https://doi.org/10.3987/COM-10-S\(E\)94](https://doi.org/10.3987/COM-10-S(E)94).
- (188) Pulla, L. S. S.; Begum Ahil, S. Review on Target Domains and Natural Compound-Based Inhibitors of Fatty Acid Synthase for Anticancer Drug Discovery. *Chem Biol Drug Des* **2021**, *98* (5), 869–884. <https://doi.org/10.1111/CBDD.13942>.
- (189) Wang, X.; Lin, J.; Chen, Y.; Zhong, W.; Zhao, G.; Liu, H.; Li, S.; Wang, L.; Li, S. Novel Fatty Acid Synthase (FAS) Inhibitors: Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Studies. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17* (5), 1898–1904. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2009.01.050>.
- (190) Cheng, F.; Wang, Q.; Chen, M.; Quiocho, F. A.; Ma, J. Molecular Docking Study of the Interactions between the Thioesterase Domain of Human Fatty Acid Synthase

- and Its Ligands. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **2008**, *70* (4), 1228–1234. <https://doi.org/10.1002/PROT.21615>.
- (191) Baldwin, J. E.; Lynch, G. P.; Pitlik, J. γ -LACTAM ANALOGUES OF β -LACTAM ANTIBIOTICS. *J Antibiot (Tokyo)* **1991**, *44* (1), 1–24. <https://doi.org/10.7164/ANTIBIOTICS.44.1>.
- (192) Veinberg, G.; Potorocina, I.; Vorona, M. Recent Trends in the Design, Synthesis and Biological Exploration of β -Lactams. *Curr Med Chem* **2014**, *21* (4), 393–416. <https://doi.org/10.2174/09298673113206660268>.
- (193) Caruano, J.; Muccioli, G. G.; Robiette, R. Biologically Active γ -Lactams: Synthesis and Natural Sources. *Org Biomol Chem* **2016**, *14* (43), 10134–10156. <https://doi.org/10.1039/C6OB01349J>.
- (194) Baldwin, J. E.; Lowe, C.; Schofield, C. J.; Lee, E. A γ -Lactam Analogue of Penems Possessing Antibacterial Activity. *Tetrahedron Lett* **1986**, *27* (30), 3461–3464. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)84822-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)84822-4).
- (195) Zhang, W.; Richardson, R. D.; Chamni, S.; Smith, J. W.; Romo, D. Beta-Lactam Congeners of Orlistat as Inhibitors of Fatty Acid Synthase. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (7), 2491–2494. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2008.02.043>.
- (196) Badshah, S. L.; Naeem, A. Bioactive Thiazine and Benzothiazine Derivatives: Green Synthesis Methods and Their Medicinal Importance. *Molecules* **2016**, *Vol. 21*, Page 1054 **2016**, *21* (8), 1054. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21081054>.
- (197) Faazil, S.; Malik, M. S.; Ahmed, S. A.; Jamal, Q. M. S.; Basha, S. T.; Al-Rooqi, M. M.; Obaid, R. J.; Qurban, J.; Shaikh, I. N.; Asghar, B. H.; Kamal, A. New Quinoline-Thiolactone Conjugates as Potential Antitubercular and Antibacterial Agents. *J Mol Struct* **2023**, *1271*, 134099. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2022.134099>.
- (198) Dembitsky, V. M.; Savidov, N.; Glorizova, T. A. Natural Sulphur-Containing Steroids: Origin and Biological Activities. *Vietnam Journal of Chemistry* **2018**, *56* (5), 533–541. <https://doi.org/10.1002/VJCH.201800043>.
- (199) Faazil, S.; Shaheer Malik, M.; Ahmed, S. A.; Mohammad, Q.; Jamal, S.; Thoukhir Basha, S.; Al-Rooqi, M.; Obaid, R. J.; Qurban, J.; Shaikh, I. N.; Asghar, B. H.; Kamal, A. New Quinoline-Thiolactone Conjugates as Potential Antitubercular and Antibacterial Agents. *J Mol Struct* **2023**, *1271*, 134099. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134099>.
- (200) Hadad, C. M.; Rablen, P. R.; Wiberg, K. B. C-O and C-S Bonds: Stability, Bond Dissociation Energies, and Resonance Stabilization. *Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (24), 8668–8681. <https://doi.org/10.1021/jo972180+>.
- (201) Noel, A.; Delpech, B.; Crich, D. Comparison of the Reactivity of β -Thiolactones and β -Lactones toward Ring-Opening by Thiols and Amines. *Org Biomol Chem* **2012**, *10* (32), 6480–6483. <https://doi.org/10.1039/C2OB25640A>.
- (202) Seijas, J. A.; Vázquez-Tato, M. P.; Crecente-Campo, J. Straightforward Microwave-Assisted Synthesis of 2-Thiazolines Using Lawesson's Reagent under Solvent-Free Conditions. *Tetrahedron* **2008**, *64* (39), 9280–9285. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2008.07.027>.
- (203) Rao, Y.; Li, X.; Nagorny, P.; Hayashida, J.; Danishefsky, S. J. A Simple Method for the Conversion of Carboxylic Acids into Thioacids with Lawesson's Reagent. *Tetrahedron Lett* **2009**, *50* (48), 6684–6686. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2009.09.080>.

- (204) Mutta, M. M.; de Azevedo, M. B. M.; Greene, A. E. An Improved Procedure for α -Methylenation of Lactones. <http://dx.doi.org/10.1080/00397919308009804> **2006**, 23 (4), 495–503. <https://doi.org/10.1080/00397919308009804>.
- (205) Curphey, T. J. Thionation with the Reagent Combination of Phosphorus Pentasulfide and Hexamethyldisiloxane. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67 (18), 6461–6473. <https://doi.org/10.1021/jo0256742>.
- (206) Mattsson, S.; Dahlström, M.; Karlsson, S. A Mild Hydrolysis of Esters Mediated by Lithium Salts. *Tetrahedron Lett* **2007**, 48 (14), 2497–2499. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.02.029>.
- (207) Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1978**, 17 (7), 522–524. <https://doi.org/10.1002/ANIE.197805221>.
- (208) Dhaon, M. K.; Olsen, R. K.; Ramasamy, K. Esterification of N-Protected α -Amino Acids with Alcohol/Carbodiimide/4-(Dimethylamino)-Pyridine. Racemization of Aspartic and Glutamic Acid Derivatives. *Journal of Organic Chemistry* **1982**, 47 (10), 1962–1965. https://doi.org/10.1021/JO00349A028/ASSET/JO00349A028.FP.PNG_V03.
- (209) Filippi, J. J.; Fernandez, X.; Duñach, E. Lewis Acid-Catalysed Isomerisation of Thionolactones to Thiolactones: Inversion of Configuration. *Tetrahedron Lett* **2006**, 47 (34), 6067–6070. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.06.104>.
- (210) Afanasyev, O. I.; Kuchuk, E.; Usanov, D. L.; Chusov, D. Reductive Amination in the Synthesis of Pharmaceuticals. *Chem Rev* **2019**, 119 (23), 11857–11911. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.9B00383/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR9B00383_0200.GIF.
- (211) Hutchins, R. O.; Natale, N. R. CYANOBOROHYDRIDE. UTILITY AND APPLICATIONS IN ORGANIC SYNTHESIS. A REVIEW. <http://dx.doi.org/10.1080/00304947909354852> **2009**, 11 (5), 201–246. <https://doi.org/10.1080/00304947909354852>.
- (212) Morillas, M.; Clotet, J.; Rubí, B.; Serra, D.; Asins, G.; Ariño, J.; Hegardt, F. G. Identification of the Two Histidine Residues Responsible for the Inhibition by Malonyl-CoA in Peroxisomal Carnitine Octanoyltransferase from Rat Liver. *FEBS Lett* **2000**, 466 (1), 183–186. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01788-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01788-3).
- (213) Damiani, E.; Solorio, J. A.; Doyle, A. P.; Wallace, H. M. How Reliable Are in Vitro IC50 Values? Values Vary with Cytotoxicity Assays in Human Glioblastoma Cells. *Toxicol Lett* **2019**, 302, 28–34. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2018.12.004>.
- (214) Parker, W. L.; Johnson, F. The Total Synthesis of DL-Avenaciolide. *Journal of Organic Chemistry* **1973**, 38 (14), 2489–2496. https://doi.org/10.1021/JO00954A015/ASSET/JO00954A015.FP.PNG_V03.
- (215) Snyder, H. R.; Kruse, C. W. A Synthesis of Diisopropylidene Ethylenetetra-carboxylate. *J Am Chem Soc* **1958**, 80 (8). <https://doi.org/10.1021/ja01541a040>.
- (216) Bloch, R. 5,5-Dibromo-2,2-Dimethyl-4,6-Dioxo-1,3-Dioxane; a New Brominating Agent for Saturated and α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds. *Synthesis (Germany)* **1978**, 1978 (2). <https://doi.org/10.1055/s-1978-24691>.
- (217) Sakai, T.; Horikawa, H.; Takeda, A. Efficient Synthesis of a Bislactone Skeleton Leading to DL-Avenaciolide. *Journal of Organic Chemistry* **1980**, 45 (10), 2039–2040. <https://doi.org/10.1021/jo01298a071>.

- (218) Raminelli, C.; Kagohara, E.; Pellizari, V. H.; Comasseto, J. V.; Andrade, L. H.; Porto, A. L. M. Biotransformations of Mannich Bases and Propiophenones by Brazilian Microorganisms and Enzymatic Resolution of Phenylpropanols by Lipase from *Candida Antarctica* (Novozym 435). *Enzyme Microb Technol* **2007**, *40* (2), 362–369. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2006.06.002>.
- (219) Sasaki, T.; Kitamura, T. Roles of FoxO1 and Sirt1 in the Central Regulation of Food Intake. *Endocr J* **2010**, *57* (11), 939–946. <https://doi.org/10.1507/ENDOCRJ.K10E-320>.
- (220) Sakkou, M.; Wiedmer, P.; Anlag, K.; Hamm, A.; Seuntjens, E.; Ettwiller, L.; Tschöp, M. H. H.; Treier, M. A Role for Brain-Specific Homeobox Factor Bsx in the Control of Hyperphagia and Locomotory Behavior. *Cell Metab* **2007**, *5* (6), 450–463. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2007.05.007>.
- (221) Neale, S. A.; Copeland, C. S.; Salt, T. E. Effect of VGLUT Inhibitors on Glutamatergic Synaptic Transmission in the Rodent Hippocampus and Prefrontal Cortex. *Neurochem Int* **2014**, *73* (1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2013.10.001>.
- (222) Ziegler, D. R.; Cullinan, W. E.; Herman, J. P. Distribution of Vesicular Glutamate Transporter mRNA in Rat Hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* **2002**, *448* (3), 217–229. <https://doi.org/10.1002/CNE.10257>.
- (223) Chaudhry, F. A.; Reimer, R. J.; Bellocchio, E. E.; Danbolt, N. C.; Osen, K. K.; Edwards, R. H.; Storm-Mathisen, J. The Vesicular GABA Transporter, VGAT, Localizes to Synaptic Vesicles in Sets of Glycinergic as Well as GABAergic Neurons. *The Journal of Neuroscience* **1998**, *18* (23), 9733. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-09733.1998>.
- (224) Jewett, B. E.; Sharma, S. Physiology, GABA. *StatPearls* **2022**.
- (225) Koepsell, H. Glucose Transporters in Brain in Health and Disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **2020**, *472* (9), 1299–1343. <https://doi.org/10.1007/S00424-020-02441-X>.
- (226) Kim, S.; Lee, I.; Piao, S.; Nagar, H.; Choi, S. jeong; Kim, Y. R.; Irani, K.; Jeon, B. H.; Kim, C. S. MiR204 Potentially Promotes Non-Alcoholic Fatty Liver Disease by Inhibition of Cpt1a in Mouse Hepatocytes. *Communications Biology* **2022**, *5* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03945-1>.
- (227) Weber, M.; Mera, P.; Casas, J.; Salvador, J.; Rodríguez, A.; Alonso, S.; Sebastián, D.; Soler-Vázquez, M. C.; Montironi, C.; Recalde, S.; Fucho, R.; Calderón-Domínguez, M.; Mir, J. F.; Bartrons, R.; Escola-Gil, J. C.; Sánchez-Infantes, D.; Zorzano, A.; Llorente-Cortes, V.; Casals, N.; Valentí, V.; Frühbeck, G.; Herrero, L.; Serra, D. Liver CPT1A Gene Therapy Reduces Diet-Induced Hepatic Steatosis in Mice and Highlights Potential Lipid Biomarkers for Human NAFLD. *The FASEB Journal* **2020**, *34* (9), 11816–11837. <https://doi.org/10.1096/FJ.202000678R>.
- (228) Palou, M.; Sánchez, J.; Rodríguez, A. M.; Priego, T.; Picó, C.; Palou, A. Induction of NPY/AgRP Orexigenic Peptide Expression in Rat Hypothalamus Is an Early Event in Fasting: Relationship with Circulating Leptin, Insulin and Glucose. *Cellular Physiology and Biochemistry* **2009**, *23* (1–3), 115–124. <https://doi.org/10.1159/000204100>.
- (229) Meister, B. Neurotransmitters in Key Neurons of the Hypothalamus That Regulate Feeding Behavior and Body Weight. *Physiol Behav* **2007**, *92* (1–2), 263–271. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2007.05.021>.

- (230) Weiz, G.; Breccia, J. D.; Mazzaferro, L. S. Screening and Quantification of the Enzymatic Deglycosylation of the Plant Flavonoid Rutin by UV-Visible Spectrometry. *Food Chem* **2017**, *229*, 44–49. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.02.029>.
- (231) Henzler, K.; Haupt, B.; Ballauff, M. Enzymatic Activity of Immobilized Enzyme Determined by Isothermal Titration Calorimetry. *Anal Biochem* **2008**, *378* (2), 184–189. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2008.04.011>.
- (232) Katsumata, H.; Sekine, T.; Teshima, N.; Kurihara, M.; Kawashima, T. A New Flow-Injection Determination of Glucose Based on the Redox Reaction of Hydroquinone with Iron(III) in the Presence of 1,10-Phenanthroline. *Talanta* **2000**, *51* (6), 1197–1204. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00313-1](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00313-1).
- (233) Glatz, Z. Determination of Enzymatic Activity by Capillary Electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **2006**, *841* (1–2), 23–37. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2006.02.051>.
- (234) Tao, Y.; Zhang, Y.; Cheng, Y.; Wang, Y. Rapid Screening and Identification of α -Glucosidase Inhibitors from Mulberry Leaves Using Enzyme-Immobilized Magnetic Beads Coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical Chromatography* **2013**, *27* (2), 148–155. <https://doi.org/10.1002/BMC.2761>.
- (235) Gómez-Ruiz, J. Á.; López-Expósito, I.; Pihlanto, A.; Ramos, M.; Recio, I. Antioxidant Activity of Ovine Casein Hydrolysates: Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology* **2008**, *227* (4), 1061–1067. <https://doi.org/10.1007/S00217-008-0820-3/METRICS>.
- (236) Hernández-Ledesma, B.; Dávalos, A.; Bartolomé, B.; Amigo, L. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem* **2005**, *53* (3), 588–593. <https://doi.org/10.1021/JF048626M>.
- (237) Jáuregui, O.; Sierra, A. Y.; Carrasco, P.; Gratacós, E.; Hegardt, F. G.; Casals, N. A New LC–ESI-MS/MS Method to Measure Long-Chain Acylcarnitine Levels in Cultured Cells. *Anal Chim Acta* **2007**, *599* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2007.07.066>.
- (238) Minkler, P. E.; Stoll, M. S. K.; Ingalls, S. T.; Kerner, J.; Hoppel, C. L. Validated Method for the Quantification of Free and Total Carnitine, Butyrobetaine, and Acylcarnitines in Biological Samples. *Anal Chem* **2015**, *87* (17), 8994–9001. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.5B02198/SUPPL_FILE/AC5B02198_SI_001.PDF.
- (239) Vernez, L.; Hopfgartner, G.; Wenk, M.; Krähenbühl, S. Determination of Carnitine and Acylcarnitines in Urine by High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2003**, *984* (2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01838-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01838-1).
- (240) Minkler, P. E.; Ingalls, S. T.; Hoppel, C. L. Strategy for the Isolation, Derivatization, Chromatographic Separation, and Detection of Carnitine and Acylcarnitines. *Anal Chem* **2005**, *77* (5), 1448–1457. <https://doi.org/10.1021/AC0487810>.
- (241) Picard, M.; Taivassalo, T.; Ritchie, D.; Wright, K. J.; Thomas, M. M.; Romestaing, C.; Hepple, R. T. Mitochondrial Structure and Function Are Disrupted by Standard Isolation Methods. **2011**. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018317>.
- (242) Cook, G. A.; Gattone, V. H.; Evan, A. P.; Harris, R. A. Structural Changes of Isolated Hepatocytes during Treatment with Digitonin. *Biochimica et Biophysica Acta*

- (BBA) - *Molecular Cell Research* **1983**, 763 (4), 356–367.
[https://doi.org/10.1016/0167-4889\(83\)90097-6](https://doi.org/10.1016/0167-4889(83)90097-6).
- (243) Bentebibel, A.; Sebastián, D.; Herrero, L.; López-Viñas, E.; Serra, D.; Asins, G.; Gómez-Puertas, P.; Hegardt, F. G. Novel Effect of C75 on Carnitine Palmitoyltransferase I Activity and Palmitate Oxidation. *Biochemistry* **2006**, 45 (14), 4339–4350.
<https://doi.org/10.1021/BI052186Q/ASSET/IMAGES/MEDIUM/BI052186QN00001.GIF>.
- (244) Faesel, N.; Schünemann, M.; Koch, M.; Fendt, M. Angiotensin II-Induced Drinking Behavior as a Method to Verify Cannula Placement into the Cerebral Ventricles of Mice: An Evaluation of Its Accuracy. *Physiol Behav* **2021**, 232, 113339.
<https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2021.113339>.
- (245) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248–254.