



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Diseño racional, síntesis y estudio de mecanismo de acción de inhibidores reversibles de caspasa-3 como potenciales fármacos frente a la Enfermedad de Alzheimer

Lic. Lucía Minini Rivas

Programa de Doctorado en Química

Facultad de Química – PEDECIBA Química

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Abril 2020

Diseño racional, síntesis y estudio de mecanismo de acción de inhibidores reversibles de caspasa-3 como potenciales fármacos frente a la Enfermedad de Alzheimer

Lic. Lucía Minini Rivas

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Química por UdelaR y PEDECIBA.

Directoras de Tesis

Dra. Alicia Merlino

Laboratorio de Química Teórica y Computacional-Facultad de Ciencias

Dra. María Laura Lavaggi

Laboratorio de Química Biológica Ambiental – Centro Universitario de Rivera

Codirectora de Tesis

Dra. Beatriz Álvarez

Laboratorio de Enzimología- Facultad de Ciencias

Directoras académicas

Dra. Alicia Merlino (2013-2018)

Dra. María Laura Lavaggi (2018-2020)

Montevideo-Uruguay
Abril 2020

*Esta Tesis de Doctorado es en memoria de la **Dra. Alicia Merlino** (1976-2018) quien fue la ideóloga de la temática abordada y Directora Académica del trabajo (2013-2018).*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a Alice por introducirme en el tema, por estar siempre. Espero que, donde estés, te sientas orgullosa del trabajo terminado.

A María Laura por los años compartidos, por las enseñanzas y por tomar las responsabilidades que hacían falta en momentos complicados.

A Beatriz por incorporarse a este trabajo y siempre estar disponible para lo que necesitara, por los aportes al trabajo que fueron muy importantes para su desarrollo.

A Fernando Ferreira por permitirme trabajar en su laboratorio en momentos difíciles cuando nada estaba claro. Por hacerme sentir parte de su grupo y siempre estar disponible para cualquier ensayo necesario para el desarrollo de este trabajo. Estoy eternamente agradecida.

A Laura Coitiño por los años compartidos en el LQTC, especialmente por la dedicación y ayuda en la corrección de la parte *in silico* de este trabajo.

A la Dra. Ileana Corbo, Msc. Florencia Ferraro y Msc. Cintia Perdomo del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Moléculas Bioactivas del Polo de Desarrollo Universitario de Paysandú por la producción y purificación de las enzimas caspasa-3 y -7.

A Paola Hernández del Laboratorio de Epigenética por enseñarme a realizar los ensayos de citotoxicidad.

A la Dra. Luzeneide Tinoco por permitirme trabajar en su laboratorio, por hacerme sentir como en casa cuando estaba lejos.

A mis compañeros del LQTC por los años compartidos. A los que siguen y a los que ya no están, Florcita, Saira, Jenner, Sastre, Stepha.

A Nicolás mi compañero y amor de toda la vida, gracias por siempre estar a mi lado y apoyarme siempre en el desarrollo de mi carrera. Y por la hermosa familia que estamos formando.

A mi familia por siempre estar atentos a mi carrera aunque hasta ahora no entienden bien a qué me dedico.

A las Chikis de Ciencias, Stepha, Pauli, Pau, Maru y Lu porque sin ellas este camino no hubiera sido posible.

A mis amigas de toda la vida Lety, Pao, Lety, Vero, Jessy, por los momentos compartidos y hacerme olvidar del trabajo y la facultad.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la financiación de las becas de Maestría y Doctorado.

A PEDECIBA por los apoyos económicos como estudiante y la financiación de una pasantía.

La Enfermedad de Alzheimer ha sido reconocida como la causa más común de demencia en la población geriátrica, estando presente en aproximadamente el 60% de los casos de demencia. En el año 2016 se estimó que globalmente hay 47.5 millones de personas que la presentan. Al día de hoy no ha sido posible establecer el origen de la enfermedad y se han desarrollado diversas hipótesis. Entre éstas, las que presentan más relevancia son la hipótesis colinérgica, que se basa en la disminución de la acetilcolina en las terminales sinápticas, con la consecuente disminución de la sinapsis colinérgica, y la hipótesis de la cascada amiloide, que inicialmente relacionó la aparición de las placas seniles en los espacios extracelulares con el desencadenamiento de la enfermedad. Ninguna de estas hipótesis ha sido confirmada como disparadora de la enfermedad, y no ha sido posible desarrollar un tratamiento efectivo. Las terapias disponibles no son capaces de revertir o detener el daño causado por esta dolencia. La enzima caspasa-3 constituye un posible blanco terapéutico debido a que está relacionada con la formación del péptido beta amiloide y de los ovillos neurofibrilares por acumulación de la proteína tau. Además, se encuentra sobreactivada selectivamente en etapas tempranas de la enfermedad en cerebro humano.

En esta Tesis de Doctorado se buscó diseñar nuevos compuestos orgánicos como posibles inhibidores selectivos y reversibles de caspasa-3 en base a una serie de 10 inhibidores de caspasa-3 y -7 derivados de 2-(1,4-benzodioxan)-1,3-tiazol reportados (Fattoruso *et al.*, 2005, *J. Med. Chem.* **48**, 1649–1656). Se realizaron en primer lugar estudios *in silico* exploratorios de la interacción de estos inhibidores en caspasa-3 y -7, los cuales fueron publicados (Minini *et al.*, 2017, *J. Mol. Struct.* **1147**, 558–568). A partir de las conclusiones de ese primer trabajo se diseñaron cuatro nuevas series de derivados tiazólicos (derivados de 4-feniltiazol-2-carbamato, 2-amino-4-feniltiazol, 2-amino-4-naftiltiazol y 4-feniltiazol-2-éter). Se obtuvieron 41 de estos derivados mediante metodologías de síntesis orgánica convencional con rendimiento moderado a bajo. Hasta donde se tiene conocimiento, la preparación de la serie de derivados de feniltiazoléter, basada en la síntesis de Williamson de éteres, no ha sido reportada.

Se evaluó la capacidad inhibitoria sobre la actividad de caspasa-3 de los derivados obtenidos utilizando enzima recombinante humana y como sustrato un péptido fluorogénico. En ensayos preliminares, a una concentración de 100 μM de compuesto, se obtuvo que ciertos derivados resultaron capaces de inhibir la caspasa-3. Se continuó la caracterización de los derivados seleccionados, realizando estudios preclínicos.

Se realizaron ensayos de citotoxicidad de los compuestos en la línea celular de hipocampo de ratón HT22; a una concentración de 100 μM , los compuestos estudiados afectaron en distinta magnitud

la viabilidad celular. Se evaluó si se generaban metabolitos de los compuestos al ser sometidos a la fracción S9 (citósólica y microsomal) obtenida a partir de un homogeneizado de hígado de rata; seis de los compuestos seleccionados generaron nuevas entidades en las condiciones de ensayo. A su vez, se evaluó la posible capacidad de estos derivados de cruzar la barrera hematoencefálica mediante el ensayo *in vitro* en paralelo de permeabilidad artificial (PAMPA). Para su realización fue necesario llevar a cabo una técnica para la extracción de lípidos polares de cerebro porcino. Los resultados obtenidos sugieren que los derivados serían capaces de cruzar la barrera hematoencefálica en las condiciones del ensayo. Por último, se evaluó la mutagenicidad de los compuestos mediante el ensayo AMES; sólo uno de los evaluados no resultó mutagénico en ninguna de las cepas de *Salmonella* entérica typhimurium utilizadas.

Paralelamente, mediante estudios *in silico* de *docking* ligando-proteína y *dinámica molecular* de una selección de derivados, se identificaron los posibles sitios de interacción no covalente con caspasa-3 y -7. Se identificaron como sitios preferenciales de interacción, regiones cercanas a los bolsillos catalíticos de las enzimas. A su vez se estudió si la interacción con estos derivados generaba cambios estructurales en las enzimas, que pudieran explicar la inhibición. En este sentido, la presencia de los derivados no mostró inducir cambios significativos en el posicionamiento de residuos claves para la actividad de las enzimas.

Por último, se realizaron ensayos de diferencia de la transferencia de la saturación por resonancia magnética nuclear (RMN) para verificar la posible interacción entre los ligandos y caspasa-3 y -7. No fue posible obtener resultados con estos ensayos debido a problemas en la solubilidad de los derivados en el amortiguador del ensayo y a las altas concentraciones necesarias para su realización.

Los intentos para obtener valores de constante de inhibición de los derivados sobre la caspasa-3 fueron infructuosos debido a la interferencia de algunos de los compuestos en el ensayo de fluorescencia así como a problemas en la solubilidad de los mismos, que generaron variabilidad en los resultados obtenidos y no permitieron reproducir los porcentajes de inhibición de los ensayos preliminares.

En suma, esta Tesis de Doctorado aporta elementos para el desarrollo de derivados con potencial inhibitorio sobre caspasa-3.

ABREVIATURAS

A β	Péptido beta-amiloide
Ach	Acetilcolina
AMC	7-amino-4-metilcumaria
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
C α	Carbono alfa
Cys	Cisteína
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
DFT	Teoría de los funcionales de la densidad
D ₂ O	Agua deuterada
DTS	Diferencia en la transferencia de saturación
DM	Dinámica molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDH	Enlace de hidrógeno
EA	Enfermedad de Alzheimer
EM	Espectro de masa
EtOH	Etanol
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
His	Histidina
iAch	Inhibidores acetilcolinesteras
IEF-PCM	Modelo implícito de solvente del continuo polarizable
MeOH	Metanol
MITT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltizol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

ONF	Ovillos neurofibrilares
TA	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
Tyr	Tirosina
Papp	Permeabilidad aparente
PBL	Lípidos polares de cerebro porcino
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
PPA	Proteína precursora amiloide
PF	Punto de fusión
RMSD	Desviación media cuadrática
RMSF	Fluctuación media cuadrática

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN	0
1.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	0
1.1.1 Generalidades.....	0
1.1.2 Hipótesis acerca de su desencadenamiento.....	3
1.1.3 Terapia	6
1.2 CASPASA-3	11
1.2.1 Generalidades.....	11
1.2.2 Rasgos estructurales.....	13
1.2.3 Caspasa-3 como nuevo blanco terapéutico.....	18
1.2.4 Inhibidores de caspasa-3	20
1.3 DISEÑO DE LOS COMPUESTOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GENERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. SÍNTESIS ORGÁNICA	27
3.1 GENERALIDADES.....	27
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	27
3.3 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE FENILTIAZOLCARBAMATO (SERIE A)	28
3.3.1 Materiales y métodos particulares.....	28
3.3.2 Resultados y discusión.....	28
3.4 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE FENILTIAZOLAMINA (SERIE B).....	32
3.4.1 Materiales y métodos particulares.....	32
3.4.2 Resultados y Discusión.....	32
3.5 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE NAFTILTIAZOLAMINA (SERIE C)	37
3.5.1 Materiales y métodos particulares.....	37
3.5.1 Resultados y discusión.....	37
3.6 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE FENILTIAZOLÉTER (SERIE D)	38
3.6.1 Materiales y métodos particulares.....	38
3.6.1 Resultados y discusión.....	39
4. ACTIVIDAD DE CASPASA-3 Y -7 Y ENSAYO PRELIMINAR DE INHIBICIÓN.....	41
4.1 GENERALIDADES.....	41
4.2 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CASPASA-3 Y -7	41
4.2.1 Materiales y métodos	41
4.2.2 Resultados y discusión.....	43
4.3 ENSAYO PRELIMINAR DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA	53
4.3.1 Materiales y métodos	53
4.3.2 Resultados y discusión.....	54
5. EVALUACIÓN PRECLÍNICA	58
5.1 EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD EN LÍNEA CELULAR HT22	59

5.1.2 Materiales y métodos	60
5.2 METABOLIZACIÓN	65
5.2.1 Generalidades.....	65
5.2.2 Materiales y métodos	66
5.2.3 Resultados y discusión.....	68
5.3 APROXIMACIÓN A LA PERMEABILIDAD A TRAVÉS DE LA MEMBRANA HEMATOENCEFÁLICA (PAMPA).....	71
5.3.1 Generalidades.....	71
5.3.2 Materiales y métodos	72
5.3.3 Resultados y discusión.....	75
5.4 EVALUACIÓN DE MUTAGÉNESIS (TEST DE AMES)	81
5.4.1 Generalidades.....	81
5.4.2 Materiales y métodos	82
5.4.2.1 Ensayo de mutagénesis	83
5.4.3 Resultados y discusión.....	83
6. EVALUACIÓN IN SILICO.....	89
6.1 GENERALIDADES.....	89
6.2 MÉTODOS TEÓRICOS PARA ESTUDIAR LAS INTERACCIONES LIGANDO-ENZIMA.....	90
6.2.1 Docking ligando-proteína	90
6.2.2 Dinámica molecular	91
6.3 MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.....	93
6.3.1 Preparación de la estructura de los compuestos orgánicos	93
6.3.2 Preparación de estructuras de referencia de las enzimas	93
6.3.3 Docking ligando-proteína en caspasas -3 y -7	94
6.3.4 Simulaciones de dinámica molecular clásica de las proteínas y sus complejos.....	94
6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
6.4.1 Docking ligando-proteína en caspasas -3 y -7	95
6.4.2 Simulaciones de dinámica molecular.....	99
7. INTERACCIÓN INHIBIDOR-CASPASA POR RMN.....	107
7.1 GENERALIDADES.....	107
7.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	108
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	108
8. REEVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN EN CASPASA-3.....	114
8.1 GENERALIDADES.....	114
8.2 REEVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3	114
8.2.1 Materiales y métodos	114
8.2.2 Resultados y discusión.....	114
8.3 CONTROL DE INTERFERENCIA DE LOS COMPUESTOS EN LA MEDIDA DE FLUORESCENCIA.....	115
8.3.1 Materiales y métodos	115
8.3.2 Resultados y discusión.....	116
8.4 ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD EN LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACTIVIDAD	117
9. DISCUSIÓN GENERAL.....	123
10. CONCLUSIONES.....	127
10.1 SÍNTESIS ORGÁNICA	127

10.2 ACTIVIDAD DE CASPASA-3 Y -7 Y ENSAYO PRELIMINAR DE INHIBICIÓN.....	127
10.3 EVALUACIÓN PRECLÍNICA	128
10.3.1 Evaluación de la citotoxicidad en la línea celular HT22	128
10.3.2 Metabolización	128
10.3.2 Aproximación a la permeabilidad a través de la membrana hematoencefálica (PAMPA)	128
10.4 EVALUACIÓN IN SILICO	129
10.5 INTERACCIÓN COMPUESTO-CASPASA POR RMN	129
11. PERSPECTIVAS	130
12. ANEXO ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	132
13. REFERENCIAS	145

1. INTRODUCCIÓN

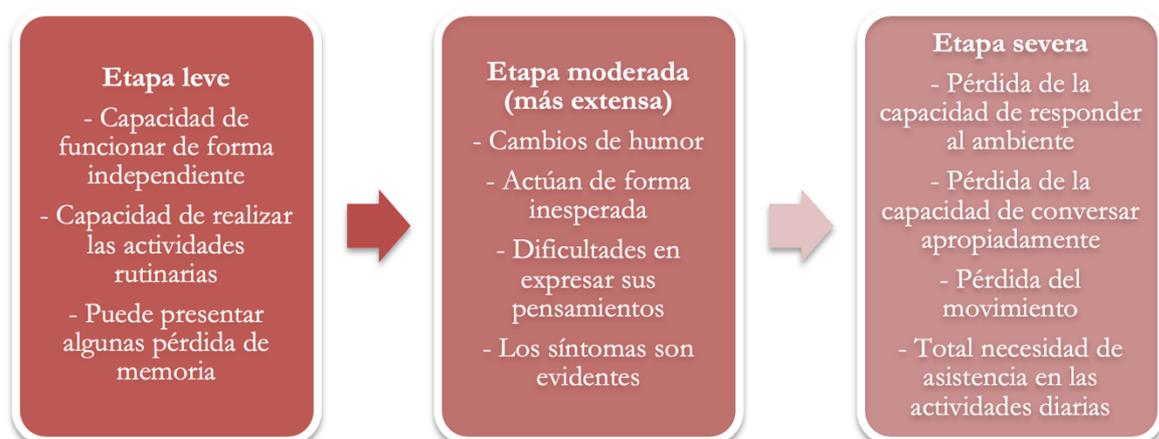
1.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1.1 GENERALIDADES

La Enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez por el neuropatólogo alemán Alois Alzheimer en 1906. A comienzos del siglo XXI fue reconocida como una enfermedad cerebral degenerativa. Es la causa más común de demencia en la población geriátrica, estando presente en aproximadamente el 60 % de los casos de demencia^{1,2,3}. En el año 2016 fue estimado que globalmente hay 47.5 millones de personas que presentan EA. Debido al aumento constante en el número de casos y al envejecimiento de la población, se espera que para el año 2030 este número aumente a 75.6 millones¹. Uruguay presenta una elevada tasa de muerte debido a EA, con un valor igual a 21.55 cada 100000 habitantes⁴.

La forma más común de esta enfermedad es la EA de inicio tardío. En ésta, que comprende el 95 % de los casos, los síntomas aparecen después de los 65 años. En el 5 % restante los pacientes desarrollan síntomas antes de los 65 años y en este caso se denomina EA de inicio temprano. Dentro de este grupo la mayoría de los casos son esporádicos, pero en 10-15 % de los casos se observan mutaciones en ciertos genes que se heredan de forma autosómica dominante. A esta forma de la enfermedad se la conoce como EA familiar^{5,6}.

La enfermedad se divide en tres etapas que difieren en la severidad de los síntomas y el deterioro cognitivo que presenta el individuo: etapa leve, etapa moderada y etapa severa (Esquema 1.1.1). En la etapa leve, el paciente es capaz de desarrollar casi todas las actividades cotidianas con independencia, pero requiere de asistencia, debido a que puede presentar pérdida de memoria.



Esquema 1.1.1 Etapas de la EA y síntomas asociados a cada una, adaptado de Anand *et al.* ¹.

En la etapa moderada, el paciente tiene dificultades para realizar actividades de rutina; puede estar confundido y tener cambios en la personalidad y comportamiento. En la etapa severa, el paciente requiere ayuda para realizar todas las actividades habituales como bañarse y vestirse; además la capacidad de comunicarse verbalmente es limitada³.

Sumado a los síntomas clínicos, los pacientes presentan características neuropatológicas que definen la enfermedad. Estas características son la formación de placas amiloides extracelulares y de ovillos neurofibrilares intracelulares (ONF)^{2,7,8,9,10}(Figura 1.1.1).

Existen dos tipos de placas amiloides, placas de núcleo denso y placas difusas. Las placas de núcleo denso están formadas mayoritariamente por péptido beta-amiloide ($A\beta$) que tiene una longitud de 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$), entremezclado con astrocitos reactivos y células microgliales. Estas placas se encuentran asociadas a la pérdida neuronal y la pérdida de sinapsis. Las placas difusas presentan un contorno mal definido, están formadas por péptido $A\beta$ pero no hay presentes astrocitos ni células microgliales. Este tipo de placas no está asociado con pérdida neuronal ni de sinapsis⁸. El péptido $A\beta$ se obtiene por el procesamiento proteolítico concertado de la proteína precursora amiloide (PPA). Es una proteína transmembrana con un dominio extracelular grande, producida en grandes cantidades en las neuronas y metabolizada rápidamente. Existen vías alternativas para su procesamiento. La vía, que genera la producción del péptido $A\beta$, es llevada a cabo por parte de la enzima β -secretasa y del complejo enzimático γ -secretasa, conocida como la vía amiloidogénica. El péptido $A\beta_{1-42}$ liberado en esta vía forma fragmentos monoméricos, los cuales se asocian unos con otros formando oligómeros solubles, que a su vez forman estructuras superiores, con mayor cantidad de péptido y otros componentes, y forman las placas amiloides definidas anteriormente¹¹. Por otra parte, la PPA puede ser procesada por una vía no amiloidogénica en la cual el procesamiento es llevado a cabo por una escisión concertada de las enzimas α -secretasa y del complejo enzimático γ -secretasa^{12,13}.

Los ONF se localizan en el soma de la neurona, están formados por filamentos helicoidales que contienen una forma aberrante de la proteína tau, la cual se encuentra hiperfosforilada o mal plegada^{7,8}. La proteína tau está asociada a microtúbulos e implicada en la estabilidad de los mismos y en el transporte axonal en la neurona¹⁴. Las modificaciones de tau por fosforilación afectan la interacción con los microtúbulos y facilitan el ensamblaje de los ONF. La fosforilación de tau depende del balance de las actividades quinasas y fosfatasa¹².

Otra lesión característica de EA es la formación de hilos del neuropilo. Éstos presentan filamentos rectos y helicoidales que contienen la proteína tau hiperfosforilada y ubiquitina asociada a los

microtúbulos. Estos hilos se extienden en los axones y dendritas^{15,16}.

Los pacientes con EA sufren de pérdida de sinapsis y de neuronas. Es importante destacar que la pérdida de neuronas excede el número de ONF, por tanto, habría más de un mecanismo para la muerte neuronal. Por otra parte, ha sido demostrado que la pérdida de sinapsis antecede la muerte neuronal, y que la disminución de la densidad sináptica correlaciona con el decaimiento colinérgico observado en los pacientes⁸.

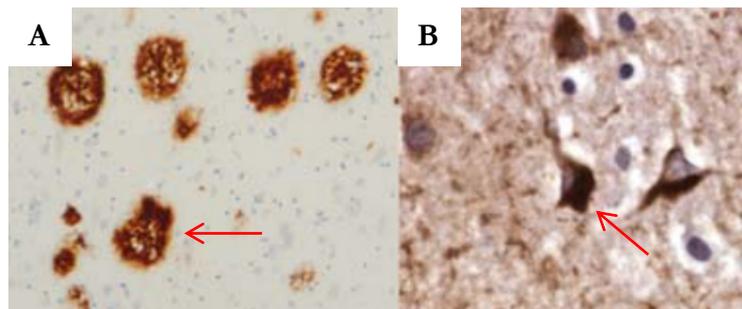


Figura 1.1.1 Fotomicrografías de inmunohistoquímica contra (A) beta amiloide, A β , la flecha roja señala las placas amiloides; B) proteína tau, la flecha roja señala los ONFs. Adaptado de Serrano-Pozo *et al.*⁸.

Las alteraciones cerebrales comienzan antes de que el individuo presente síntomas clínicos de la enfermedad^{1,3,17}. A pesar de estas alteraciones tempranas, hoy en día para el diagnóstico de demencia causado por la EA únicamente se realiza una evaluación médica cuidadosa que puede llevar días y hasta semanas, debido a que no se encuentran disponibles biomarcadores que brinden información confirmatoria para diagnosticarla^{3,17}. Hoy en día no existe ningún biomarcador que defina inequívocamente la presencia de la enfermedad, debido a que las características neuropatológicas, como lo son la presencia de placas amiloides y ONFs, detectadas mediante tomografía de emisión de positrones, están presentes en pacientes mayores que no sufren de un deterioro cognitivo^{17,18,19}.

Aunque se conocen cuáles son las características neuropatológicas de la enfermedad hasta la fecha no ha sido posible determinar cuál es su desencadenante¹. A lo largo de los años se han desarrollado distintas hipótesis que han tratado de explicar la aparición de EA pero ninguna de ellas ha sido capaz de demostrar su desencadenamiento^{20,21,22}. Esto se ve reflejado en que los tratamientos que se realizan hoy en día no son capaces de detener o revertir la enfermedad, sino que sólo permiten a los pacientes la estabilización del rendimiento cognitivo y el funcionamiento diario durante el primer año de tratamiento^{7,23,24}.

1.1.2 HIPÓTESIS ACERCA DE SU DESENCADENAMIENTO

A lo largo de los años la comunidad científica ha intentado descifrar cuál es la causa que genera la EA, para así comprender el desencadenamiento de esta devastadora enfermedad. Se han propuesto diversas hipótesis alternativas, las más relevantes son hipótesis colinérgica y la hipótesis amiloide (Esquema 1.1.2).

1.1.2.1 HIPÓTESIS COLINÉRGICA

Fue la primera teoría propuesta para explicar la aparición de EA. Propone que en cerebros de adultos mayores y pacientes con demencia ocurren perturbaciones funcionales en la actividad colinérgica. Éstas perturbaciones parecen tener un rol en la pérdida de memoria y estar relacionadas con problemas cognitivos^{25,26}.

Las perturbaciones en la actividad colinérgica se ven reflejadas en una disminución de la cantidad de acetilcolina (ACh) disponible para la sinapsis colinérgica y se relacionan con la disminución de distintos mecanismos que promueven la producción de ACh. La actividad de la enzima responsable de la síntesis de ACh, colina acetiltransferasa, se ha encontrado ampliamente disminuida en muestras patológicas de corteza e hipocampo de pacientes con EA. Otros dos marcadores de la sinapsis colinérgica, la despolarización inducida por ACh y la recaptación de ACh en las terminales nerviosas, también se encuentran disminuidos en los mismos tejidos. Además, el complejo de la enzima piruvato deshidrogenasa, enzima clave para la síntesis de ACh, presenta una disminución en la actividad en tejidos cerebrales *post-mortem* de pacientes con EA. Adicionalmente, se ve disminuido el transporte vesicular de ACh, el cual es esencial para reponer la cantidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica²⁷.

Esta hipótesis ha sido respaldada por el descubrimiento de los primeros fármacos usados para el tratamiento, que demostraron efectos cognitivos positivos en los pacientes con EA leve y moderado^{20,25}. Por otra parte, estudios experimentales en humanos y otros primates han sugerido que la acetilcolina (ACh) participa en el aprendizaje y la memoria. Estos estudios mostraron que al bloquear la actividad colinérgica central con escopolamina, sujetos jóvenes presentaban déficits de memoria similares a los observados en individuos ancianos. Estas dificultades podían ser revertidas realizando un tratamiento con el agonista colinérgico fisostigmina^{20,26}.

1.1.2.2 HIPÓTESIS AMILOIDE

La hipótesis amiloide sostiene que las placas amiloides son la causa de la EA generando el proceso neurodegenerativo que lleva a la pérdida de memoria y habilidades cognitivas^{28,29,21}. Las placas

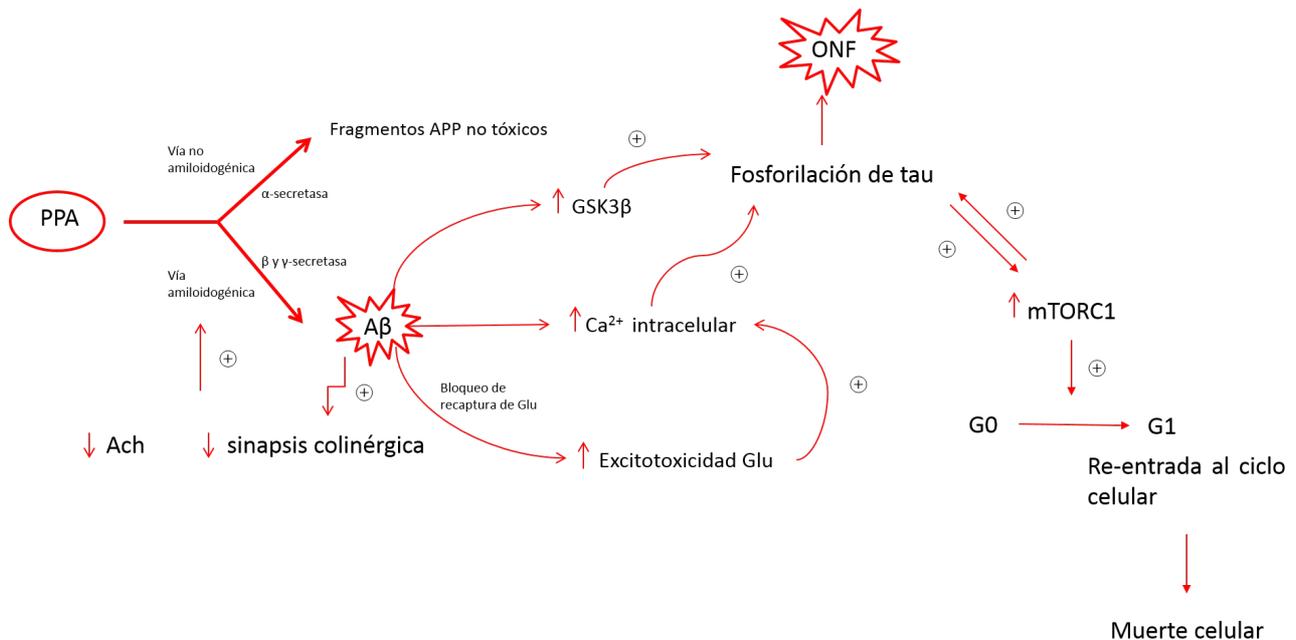
amiloides se forman por acumulación del péptido A β debido a un aumento en la cantidad del mismo, ya sea por un aumento en su síntesis o por una disminución en su eliminación o un desbalance entre ambos procesos²².

En primera instancia se relacionó la presencia de placas amiloide con la EA familiar. Esta variante de la enfermedad se da en pacientes jóvenes y está relacionada con mutaciones a nivel del cromosoma 21, en regiones que codifican para PPA, así como mutaciones a nivel del cromosoma 14, en regiones que codifican para las enzimas presenilina 1 y 2, perteneciente al complejo γ -secretasa²⁹. Ambos tipos de mutaciones generan aumento en la cantidad del péptido A β lo que favorece su deposición en las placas. Como las placas están íntimamente relacionadas con la EA familiar y se observan también en los casos de EA de inicio tardío, se supuso que su formación estaba implicada en la enfermedad. Cabe agregar que el aumento en la concentración del péptido A β también se encuentra potenciado por disminuciones en la concentración de neuropéptidos, como el neuropéptido Y, que se encarga de proteger a las células neuronales de los efectos citotóxicos del péptido A β , o de la somatostatina, que ayuda a la eliminación de A β ²¹.

A lo largo de los años se ha relacionado la presencia del péptido A β con diversas características neuropatológicas de la enfermedad, lo cual podría posicionar a dicha hipótesis como la más acertada para explicar el desencadenamiento de EA²⁸. Se ha relacionado con la hiperfosforilación de la proteína tau, vía la fosforilasa GSK3³⁰. A su vez, la deposición del péptido A β se ha relacionado con la neuroinflamación que se genera en la EA, debido a que promueve la activación local de la microglía, la liberación de citoquinas y la activación de astrocitos reactivos²¹. Recientemente, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se ha determinado que la presencia de oligómeros solubles de A β sería la responsable de la neurotoxicidad y no así las placas amiloides. Estos oligómeros participarían en la excitotoxicidad del glutamato generando una disminución de los receptores Glut-1 y promoviendo así un aumento del neurotransmisor en la hendidura sináptica^{31,32}. Esto traería como consecuencia un aumento en la concentración de calcio en la neurona a través de los receptores NMDARs lo que contribuiría a la disfunción sináptica. Por otra parte, se ha observado que el aumento en la concentración de calcio podría ser responsable de una re-entrada en el ciclo celular de las neuronas, lo que estaría precediendo a la muerte celular observada en EA³³.

1.1.2.3 INTERACCIÓN EXISTENTE ENTRE AMBAS HIPÓTESIS

En los últimos años se ha estudiado a nivel molecular el efecto de la presencia del péptido A β (formando oligómeros solubles o placas amiloides) en el deterioro colinérgico observado en la EA. Mediante estos estudios ha sido posible hallar un punto de encuentro entre ambas hipótesis. Se ha identificado que la disminución en la sinapsis colinérgica promueve la formación del péptido A β favoreciendo la vía amiloidogénica en el procesamiento de la PPA (Esquema 1.1.2).



Esquema 1.1.2 Interacción entre la hipótesis colinérgica y la hipótesis amiloide

Esto se debe a que existe cierta relación de los receptores nicotínicos y muscarínicos (ambos receptores de membrana que reconocen acetilcolina) con el procesamiento de PPA y la consiguiente producción del péptido A β . Así, la activación de los receptores muscarínicos y nicotínicos, mediada por acetilcolina, conduce a la activación de la enzima α -secretasa la cual está involucrada en el procesamiento de PPA para dar fragmentos solubles de la proteína precursora, los cuales carecen de toxicidad. Esto a su vez disminuye la concentración de PPA disponible para su participación en la vía amiloidogénica, reduciendo la cantidad de A β y otros fragmentos citotóxicos. Es necesario tener en cuenta que A β es capaz de retroalimentar su producción al causar una disminución en la actividad colinérgica. Además, la hiperfosforilación de tau promovida por A β suprime la expresión de genes nicotínicos^{34,35}.

1.1.3 TERAPIA

El tratamiento farmacológico disponible para los pacientes hoy en día no es capaz de detener o frenar el daño que genera esta enfermedad^{7,36}. El déficit observado en el tratamiento se debe en gran medida a que la causa de la enfermedad aún no ha sido elucidada, por tanto, no se conoce con exactitud cuál es el blanco terapéutico correcto para tratar esta dolencia. Por otra parte, también influye la inexistencia de biomarcadores que permitan identificarla en forma temprana e inequívoca^{17,18,19}.

El tratamiento habitual se basa en el uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa, así como también de antagonistas del receptor glutamatérgico NMDAR (Figura 1.1.2). Los fármacos que se usan hoy en día para el tratamiento de EA son donepezilo, rivastigmina, galantamina y memantina. Los tres primeros se basan en la hipótesis colinérgica y son usados en todas las etapas de la enfermedad. Son inhibidores de la acetilcolinesterasa que aumentan la concentración de Ach en la hendidura sináptica, promoviendo la sinapsis colinérgica. La memantina, usada en las etapas moderada y severa de EA, actúa como un antagonista de los receptores NMDAR, por tanto disminuye la excitotoxicidad del glutamato^{2,10,37,38}.

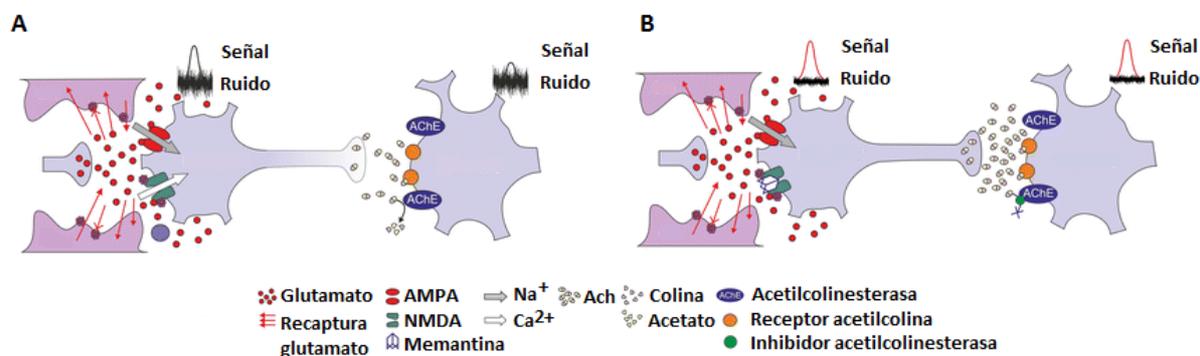


Figura 1.1.2 Mecanismo de acción de los fármacos usados para el tratamiento de EA. A) Alteraciones de la sinapsis colinérgica y glutamatérgica en la EA y cómo se ve afectada la señal. B) Modo de acción de los inhibidores de acetilcolinesterasa y de memantina en la sinapsis colinérgica y glutamatérgica respectivamente. Imagen modificada de Parsons *et al.*³⁸

Paralelamente, en los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para tratar de confirmar que la hipótesis amiloide explicaría la causa de la enfermedad mediante el diseño de nuevos fármacos que atacarían tanto al péptido como a su deposición evitando la formación de las placas amiloides. Se han desarrollado distintos anticuerpos monoclonales humanizados contra el péptido A β . El anticuerpo monoclonal humanizado bapineuzumab no ha tenido buenos resultados clínicos, su uso no genera una mejora en los paciente y a altas concentraciones genera efectos adversos^{39,40}. Por otra parte, el anticuerpo monoclonal humanizado solanezumab es capaz de neutralizar los

oligómeros de A β . En ensayos clínicos de fase III mostró un buen perfil de seguridad pero ningún beneficio clínico para los pacientes^{39,40}. Únicamente el anticuerpo monoclonal humanizado aducanumab ha sido capaz de generar una disminución en la progresión de la enfermedad en ensayos clínicos de fase Ib y no ha tenido efectos adversos, por lo cual se seguirá con el mismo a ensayos clínicos de fase III donde se verificará si presenta realmente una eficacia clínica^{40,41,42}. También se han diseñado compuestos que inhiben la síntesis del péptido A β , como el compuesto semagacestat, inhibidor de alta afinidad del complejo γ -secretasa, implicado en la vía amiloidogénica de PPA (Esquema 1.1.2). Se observaron efectos cognitivos perjudiciales en los pacientes, así como otros efectos adversos entre los que se destacan cáncer de piel e infecciones³⁹. Otro inhibidor de esta enzima es el avagacestat, el cual fue capaz de reducir la cantidad de péptido A β sin presentar efectos adversos, pero los ensayos con este inhibidor se detuvieron por no presentar un efecto clínico positivo³⁹. También se han diseñado inhibidores de la enzima β -secretasa implicada en la vía amiloidogénica de PPA (Esquema 1.1.2), como el inhibidor MK-8931 que en ensayos de fase I es capaz de generar una disminución en la producción de A β pero los efectos clínicos han sido casi nulos^{39,43}. Estos resultados en conjunto muestran que la posibilidad de tratar la EA teniendo como blanco terapéutico al péptido A β , no sería eficaz clínicamente para el tratamiento de EA^{40,44}.

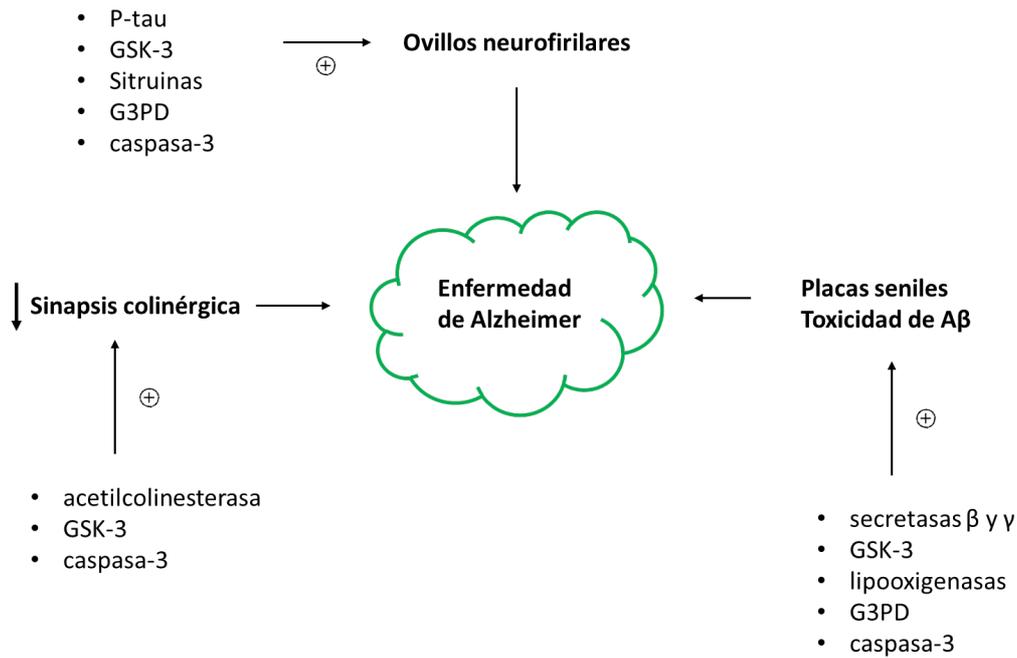
Cabe agregar que la participación de las placas amiloides en el desarrollo de la enfermedad ha sido ampliamente cuestionada. En primer lugar, se ha observado poca correlación entre la concentración y distribución de las placas amiloides y muchos parámetros de la EA, como el grado de demencia, pérdida de sinapsis, pérdida neuronal y anormalidades del citoesqueleto. Adicionalmente, no se encuentran placas amiloides en regiones adyacentes a la pérdida de neuronas y sinapsis en los comienzos de la enfermedad, por lo que no se explica cómo dichas placas generarían neurotoxicidad^{29,39,45}. Por otra parte, la cantidad de placas amiloides no correlaciona con el avance de la enfermedad y la ausencia de un comportamiento dosis-respuesta genera dudas respecto a la toxicidad de dichas placas²⁹. Se han observado placas amiloides en individuos mayores sanos mediante análisis *post-mortem* y usando tomografía de emisión de positrones para identificar A β . Hoy en día se sabe que la deposición de A β aumenta con la edad, existe un aumento del 24-45 % en la deposición del péptido en individuos mayores a 75 años que no presentan declive cognitivo^{19,29,46}. En la autopsia de individuos muy mayores que presentan una EA de desarrollo tardío con una evolución más lenta, frecuentemente se observan pocas placas y pueden faltar otros factores neuropatológicos de la enfermedad, indicando que las placas no son necesarias para el síndrome clínico de EA²⁹. No sólo se ha encontrado poca correlación de las placas amiloides con características patológicas de EA sino que también se las ha relacionado con una acción protectora

y un rol potencial en la respuesta inmune innata, como atenuadoras de la neuroinflamación³⁹. También se ha encontrado evidencia de que el péptido A β podría actuar como un péptido antimicrobiano; esto va de la mano con la hipótesis de Alois Alzheimer respecto a que esta enfermedad era causada por microorganismos. Las placas amiloides serían respuesta a una infección.

Por otra parte, a partir del Esquema 1.1.2 donde se muestra la interacción entre los distintos factores asociados a la etiología de la enfermedad, es posible concluir que el tratamiento basado en la hipótesis colinérgica también promovería una reducción del péptido A β , debido a que el aumento en la sinapsis colinérgica promovería la vía no amiloidogénica de la PPA. Por tanto, este tipo de tratamiento debería ser eficiente para atacar ambas hipótesis. Como se mencionó anteriormente, los tratamientos basados en la hipótesis colinérgica no son capaces de detener la enfermedad, por lo cual se puede concluir que ni la hipótesis colinérgica ni la hipótesis amiloide contemplarían la causa de la enfermedad. Teniendo en cuenta la interacción existente entre ambas hipótesis, los resultados poco prometedores obtenidos en los ensayos clínicos basados en la hipótesis amiloide, así como la incertidumbre acerca del rol del péptido A β en esta dolencia, llevan a concluir que el origen de esta enfermedad no estaría contemplado en estas hipótesis. Por lo tanto, surge la necesidad de buscar nuevos blancos terapéuticos para la enfermedad.

1.1.4 NUEVOS BLANCOS TERAPÉUTICOS

Como se explicó en la sección anterior, hoy en día no existen pistas claras de cuál es el desencadenante de la enfermedad, lo que ha generado a lo largo de los años grandes dificultades para encontrar un tratamiento óptimo que permita revertirla o detenerla. Las hipótesis más aceptadas para el desencadenamiento de EA no han llevado a la obtención de resultados clínicos que muestren eficacia contra la enfermedad. Por esto, en los últimos años se han buscado nuevos blancos terapéuticos para tratarla. Ha surgido interés en señalar a la proteína tau hiperfosforilada (p-tau) como blanco terapéutico. Esta proteína forma parte de ONFs, los cuales constituyen una de las características neuropatológicas más relevantes de EA⁴⁷. Adicionalmente, se han propuesto como blancos terapéuticos enzimas que presentan actividades implicadas en la enfermedad. Entre éstas se encuentran las lipooxigenasas (LOs), secretasas (α , β , γ), sirtuinas, glicógeno sintasa quinasa (GSK-3) y caspasas (Esquema 1.1.3)^{6,36}.



Esquema 1.1.3 Interacción de distintos posibles nuevos blancos terapéuticos con los marcos neuropatológicos de EA

1.1.4.1 PROTEÍNA TAU

La proteína tau forma parte de las características neuropatológicas de EA. Sus formas escindidas aberrantes e hiperfosforiladas constituyen los ONFs característicos de la enfermedad. Últimamente ha aumentado el interés en estudiar a la proteína tau fosforilada (p-tau) como posible blanco terapéutico^{47,48,11,49}. La p-tau es capaz de sedimentar y secuestrar a proteínas de unión a microtúbulos, lo cual dificulta el transporte axonal hacia organelos desde las terminaciones nerviosas al soma celular. Esto la hace un blanco terapéutico interesante, por lo que se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas basadas en incrementar la estabilidad de los microtúbulos o en inhibir la producción de p-tau, ya sea inhibiendo quinasas encargadas de la fosforilación como activando fosfatasas^{47,48}.

1.1.4.2 LIPOOXIGENASAS

Las enzimas lipooxigenasas participan en la biosíntesis de varios lípidos biológicamente activos, así como en la oxidación de lípidos de membranas celulares, causando perturbaciones estructurales. Debido a su capacidad de oxidar lípidos, disminuciones en la actividad de estas enzimas generan una disminución del estrés oxidativo celular. Si se inhibe su actividad se promueve la tasa de supervivencia celular cuando se induce estrés oxidativo. En el cerebro, la lipooxigenasa 12/15 LO se encuentra en neuronas y en células gliales, en el ganglio basal y en el

hipocampo. El rol sugerido para esta enzima en la neurodegeneración es vía la oxidación de ácidos grasos de membrana. Además su inhibición presenta una actividad protectora contra la toxicidad del péptido A β ⁵⁰.

1.1.4.3 α y γ -SECRETASA

Como se mencionó anteriormente las enzimas α - y β -secretasa y el complejo γ -secretasa están involucradas en el procesamiento de la PPA; la α -secretasa en la vía no amiloidogénica y las β -secretasa y el complejo γ -secretasa en la vía amiloidogénica. Al estar implicadas en la producción de A β , suponiendo que la hipótesis amiloide está involucrada en el desencadenamiento de la enfermedad, un aumento de la vía no amiloidogénica o una disminución en la vía amiloidogénica sería beneficioso para la enfermedad. Se ha observado que potenciando la actividad de la enzima α -secretasa o bien inhibiendo la actividad de β - y γ -secretasa se obtiene una disminución del péptido A β . No obstante, como se dijo anteriormente, los anticuerpos anti-secretasa no han tenido resultados prometedores para un posible tratamiento³⁹.

1.1.4.4 SIRTUINAS

Por otra parte, las enzimas sirtuinas, desacetilasas dependientes de NAD implicadas en muchas cascadas de señalización, han sido relacionadas con la resistencia al estrés oxidativo, modulación del ciclo celular, inflamación, cáncer y neurodegeneración. Particularmente, la enzima SIRT2 se ha relacionado con la desacetilación de histonas y otras proteínas no histonas, como la α -tubulina. Estudios en ratones han demostrado que la inhibición de SIRT2 promueve un aumento de la α -tubulina acetilada, generando una reducción de la proteína tau hiperfosforilada y efectuando una restauración cognitiva en modelos de EA de ratones transgénicos. Se ha observado que el bloqueo de SIRT2 en modelos animales presenta efectos neuroprotectores. Además, se ha observado que esta enzima se acumula en cerebros envejecidos^{6,36}.

1.1.4.5 QUINASA GLUCÓGENO SINTASA

La enzima quinasa glucógeno sintasa (GSK3) ha sido descrita como una reguladora clave de la síntesis del glucógeno y del metabolismo de la glucosa, así como en la vía de señalización Wnt. Esta enzima presenta diversos sustratos entre los cuales se encuentran proteínas metabólicas (ciclina D1, PPA y presenilina), proteínas estructurales (tau y otras proteínas asociadas a microtúbulos) y factores de transcripción (NF-KB, p53). Las actividades de esta enzima la posicionan como una pieza importante en el ciclo celular y el desarrollo, la bioenergética y la apoptosis. Por tanto, una señalización correcta de GSK-3 es crucial para el desarrollo neuronal y

el control de variados aspectos como la neurogénesis, migración, diferenciación y supervivencia neuronal. Problemas en la señalización de GSK-3 se encuentran relacionados con varios desórdenes neuronales y psiquiátricos, particularmente enfermedades neurodegenerativas como la EA. En efecto, GSK-3 es central en la fisiopatología de EA, se encuentra involucrada en la hiperfosforilación de la proteína tau, así como también en los problemas de memoria, en la amiloidogénesis, en la respuesta inflamatoria y en el déficit de acetilcolina. Adicionalmente, se ha visto que se encuentra sobrerregulada en el hipocampo de cerebros con EA^{6,30,36}.

1.1.4.6 GLICERALDEHÍDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA

La enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PD), que participa en la vía glicolítica y cataliza la conversión del gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, se ha presentado como un posible blanco terapéutico para EA. Esta enzima presenta afinidad por compuestos anti-apoptóticos, que son capaces de generar modificaciones en la enzima impidiendo que la misma sea transportada al núcleo, generando la inhibición de la apoptosis³⁶. Por otra parte, existe evidencia de que esta proteína interacciona con el péptido A β y la proteína tau, favoreciendo la formación de sus contrapartes insolubles; aún no se conoce bien el mecanismo por el cual interaccionan^{36,51}.

1.1.4.7 CASPASAS

Por último, las caspasas constituyen una familia de proteasas de cisteína que se clasifican en caspasas iniciadoras y ejecutoras, y participan en el proceso de muerte celular programada (apoptosis). La cascada apoptótica consiste en la activación de caspasas iniciadoras (caspasa-8, -9, -10) por un corte autocatalítico. Éstas activan a las caspasas ejecutoras (caspasa-3, -6, -7), las cuales llevan a cambios celulares característicos de la apoptosis. Estudios recientes han mostrado que estas enzimas no están únicamente involucradas en los eventos finales de la EA. De hecho, ha sido reportado que la activación de caspasa y la escisión de la proteína tau se llevan a cabo en el sitio donde se da la formación de ONFs. También se han relacionado con la formación del péptido A β ^{6,36}. Principalmente, se han relacionado las caspasas ejecutoras con la EA; entre éstas, la caspasa-3 se encuentra anormalmente activada y relacionada con problemas sinápticos en estadios tempranos de la enfermedad^{52,53}.

1.2 CASPASA-3

1.2.1 GENERALIDADES

Como ya se mencionó, las caspasas constituyen una familia de proteasas de cisteína multifuncional, altamente regulada, que cataliza una diversidad de reacciones. Las actividades principales de estas

enzimas se centran en la apoptosis y en algunos mecanismos celulares de remodelación. Adicionalmente, existe evidencia que relaciona su actividad con el comienzo de procesos inflamatorios, de diferenciación celular y otros, vitales para el desarrollo celular⁵⁴. Las propiedades bioquímicas de estas proteasas permiten que se encuentren altamente reguladas, asegurando que las reacciones proteolíticas irreversibles que catalizan ocurran en forma eficiente y únicamente cuando son requeridas. Estas enzimas son mayoritariamente reconocidas por su poli-especificidad, debido a que una única caspasa puede escindir cientos de sustratos diferentes. A pesar de esto, mantienen una alta fidelidad por sus blancos y evitan una actividad proteolítica generalizada⁵⁴.

Los dos roles mejor conocidos de las caspasas radican en su participación en la apoptosis y en procesos inflamatorios. Dentro de las caspasas pro-inflamatorias se encuentran la caspasa-1, -4 y -5; estas enzimas son capaces de mediar la respuesta inmune innata en mamíferos. La escisión por caspasa-1 activa las citoquinas pro-inflamatorias pro-interleuquina-1 β y pro-interleuquina-18. Las caspasas apoptóticas se clasifican en caspasas iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras (caspasa-8, -9, -10) son activadas luego de un reclutamiento para formar complejos que escinden y activan a las caspasas efectoras (caspasa-3, -6, -7). Es importante destacar que las caspasas, así como otras proteasas, son sintetizadas como zimógenos que requieren de una escisión específica para ser activadas. Los zimógenos están formados por una subunidad grande, una pequeña y un predominio N-terminal. Las caspasas efectoras presentan pre-dominios más pequeños que las caspasas iniciadoras y presentan dominios de reclutamiento de caspasa^{54,55}.

Las caspasas iniciadoras se encargan del paso inicial para la cascada apoptótica. Su característica más interesante es su especificidad por sustrato, la cual le permite reconocer a sus blancos, las caspasas efectoras. En humanos existen dos vías independientes de activación de la apoptosis, la vía extrínseca, definida por la activación vía transmembrana de caspasa-8 a través de receptores del factor de necrosis tumoral 1 (TNF-1), y una vía intrínseca, la cual responde al estrés, al daño genotóxico y a algunas señales de desarrollo activadas por caspasa-9⁵⁵.

Las caspasas efectoras son las responsables de los eventos proteolíticos que se combinan para generar los cambios celulares morfológicos conocidos como apoptosis. Dentro de este grupo, la caspasa-3 y la caspasa-7 se encuentran íntimamente relacionadas y parecen tener la misma especificidad por sustrato e inhibidores. Las mayores diferencias se observan en los residuos que forman los péptidos N-terminales, región que parece estar relacionada con los blancos celulares de estas enzimas. En cambio, la caspasa-6 presenta péptidos N-terminales más cortos y la especificidad por sustrato es totalmente diferente a la observada para caspasa-3 y caspasa-7. De éstas, la caspasa-3 es la más estudiada por su relacionamiento con el desarrollo⁵⁵.

1.2.2 RASGOS ESTRUCTURALES

1.2.2.1 BOLSILLOS CATALÍTICOS

Las caspasas están formadas por tetrámeros $\alpha\beta\alpha$ que constan de dos tipos de subunidades, cada una formada por una cadena polipeptídica, dos grandes (α , 17-20 kDa) y dos pequeñas (β , 10-12 kDa). Su forma activa presenta dos sitios activos idénticos ubicados en la interfaz entre las subunidades grande y pequeña (Figura 1.2.1; A). Las caspasas activas son conocidas como dímeros de heterodímeros $\alpha\beta$, donde las subunidades están ordenadas según una configuración $\alpha\beta\alpha$. Cada sitio activo consiste en un motivo conservado formado por la díada catalítica **Cys163-His121** y un bolsillo catalítico grande que se encarga de acomodar los residuos P1-P4 del sustrato, que son aquellos ubicados sucesivamente del lado acilo del enlace peptídico que es hidrolizado por la enzima (Figura 1.2.1)⁵⁴. Los residuos S1-S5 del bolsillo catalítico son los encargados de determinar la diferente especificidad de sustrato de cada caspasa (Figura 1.2.1; B).

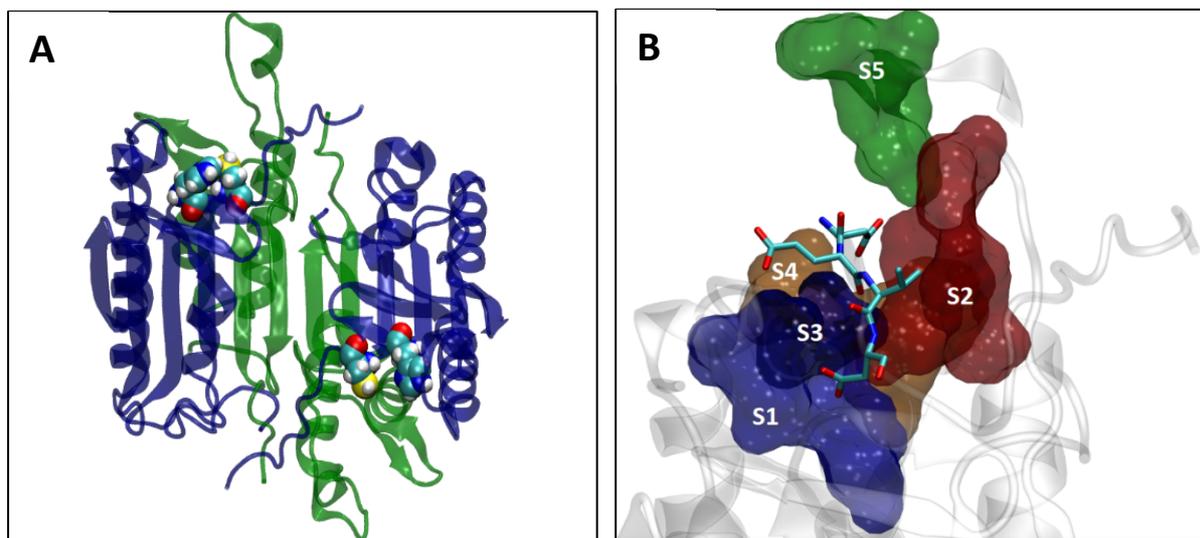


Figura 1.2.1 A) Estructura cristalográfica de caspasa-3 en interacción con un inhibidor (código pdb 1RHM) donde se destacan los aminoácidos del sitio activo presente en cada heterodímero $\alpha\beta$. En azul y verde se evidencian las subunidades α y β , respectivamente. B) Posicionamiento de los bolsillos catalíticos S1-S5 en caspasa-3 y de los sitios P1-P4 de un inhibidor análogo del sustrato. Imágenes obtenidas con el programa VMD⁵⁶.

El bolsillo S1 es el que presenta mayor especificidad por P1 entre las caspasas. Está formado mayoritariamente por las cadenas laterales de los residuos estrictamente conservados Arg64, Arg207 y Gln161. Este bolsillo profundo y altamente básico es ideal para acomodar una cadena lateral de aspartato, lo que explica la disminución en cuatro órdenes de magnitud en la eficiencia catalítica cuando P1 está conformado por un residuo de glutamato. Adicionalmente, en caspasa-3, el residuo Ser205 es capaz de interactuar con el residuo de Asp del sustrato mediante un enlace de hidrógeno (EDH)⁵⁷.

El bolsillo S2 puede contribuir a la especificidad de sustrato. Lo más destacado es el carácter aromático del S2 en caspasa-3 y caspasa-7, formado por las cadenas laterales de Tyr204, Trp206 y Phe247, donde preferentemente se posicionan residuos alifáticos pequeños (Ala, Val) del sustrato. Por el contrario, las caspasas pro-inflamatorias son capaces de acomodar residuos alifáticos grandes debido a que presentan un residuo de Val en lugar de Tyr204⁵⁸. Este bolsillo es el único que muestra alteraciones considerables una vez que se une el sustrato. En la enzima caspasa-3 no unida a sustrato, la cadena lateral del residuo Tyr204 se encuentra ocupando el bolsillo. Durante la unión a inhibidores tetrapeptídicos análogos a sustrato, la cadena lateral de Tyr204 rota 90° sobre el enlace C α -C β para así permitir la ocupación del bolsillo. Esto sugiere que en caspasa-3 el bolsillo S2 cumple un rol importante en el reconocimiento de sustrato así como en la regulación de actividad de caspasa-3⁵⁷.

El bolsillo S3 se encuentra expuesto y está formado únicamente por el residuo Arg207, el cual presenta un rol dual anclando al sustrato y a los péptidos inhibidores. Por un lado, se encarga de realizar enlaces de hidrógeno (EDH) entre átomos de su cadena principal y la cadena principal de los sustratos e inhibidores. Además mediante su grupo funcional guanidinio interactúa con el grupo carboxilato del residuo de Glu en P3. En la enzima caspasa-3 este bolsillo es capaz de aceptar residuos cargados negativamente o polares; además es capaz de acomodar residuos no polares como la Val y la Ala^{54,55,57}.

Por su parte, el bolsillo S4 provee elementos para una mayor especificidad entre las distintas subclases de caspasas. Las caspasas apoptóticas presentan un residuo de Trp214 que reduce considerablemente el tamaño de S4. El grupo indol del Trp contribuye a la preferencia por residuos pequeños con cadenas laterales ramificadas en P4, los cuales pueden realizar interacciones de van der Waals o EDH con el indol. Este bolsillo también está constituido por un residuo de Asn208 en caspasa-3 y Gln208 en caspasa-7, que pueden interactuar con un residuo de Asp en P4. Se ha observado que este bolsillo presenta cierta flexibilidad para el posicionamiento de diferentes residuos en P4⁵⁹.

El bolsillo S5 no se encuentra en todas las subclases de caspasas. La caspasa-2 escinde sustratos formados por pentapéptidos de forma más eficiente que aquellos formados por tetrapéptidos. Se ha observado que caspasa-3 presenta un bolsillo S5 hidrofóbico formado por los residuos Phe250 y Phe252, el cual no está presente en caspasa-7, cuyo bolsillo S5 se encuentra formado por Gln250 y Asp252^{54,59}. La caspasa-3 es capaz de procesar más eficientemente a pentapéptidos con residuos hidrofóbicos en P5 que la caspasa-7; eso ha sido validado usando residuos de Lys en la posición

P5 del sustrato, obteniéndose que la caspasa-7 es más eficiente que caspasa-3 al cortar este tipo de sustrato⁵⁷.

1.2.2.2 LOOPS CATALÍTICOS

Las caspasas, como muchas proteasas, son sintetizadas como zimógenos inactivos y su activación se encuentra ampliamente regulada. En el caso de caspasa-3 y caspasa-7, ambas caspasas efectoras, su activación se da por la escisión de un *loop* flexible que constituye el nexo entre subunidades α y β , encargado de mantener la subunidad grande y pequeñas unidas de forma covalente a nivel del zimógeno. Cuando este *loop* flexible es escindido se da un reordenamiento en la estructura de la enzima y se forman varios *loops* catalíticos. El correcto posicionamiento e interacción entre los *loops* es fundamental para la actividad de estas caspasas⁶⁰.

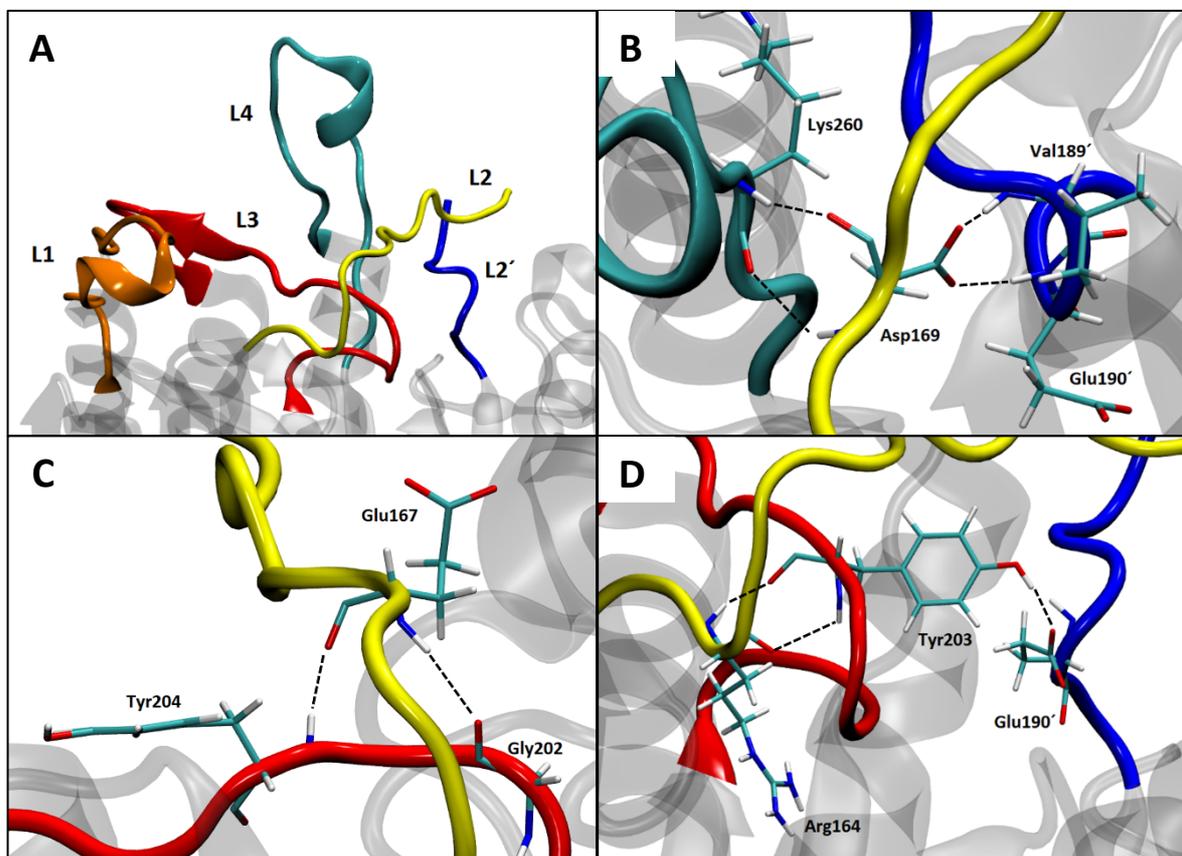


Figura 1.2.3 A) Posición de los *loops* catalíticos L1-L4 y L2' en la estructura del sitio activo de caspasa-3 (código pdb 1RHM); B) EDHs entre el residuo Asp169 de L2 y residuos de L4 y L2'; C) EDHs entre el residuo Glu167 de L2 y residuos de L3; D) EDHs entre el residuo Tyr203 de L3 y residuos de L2 y L2'. Imágenes generadas con el programa VMD⁵⁶.

Presentan cuatro *loops* catalíticos, L1-L4, provienen de un heterodímero, y L2' proviene del otro heterodímero $\alpha'\beta'$ (Figura 1.2.3; A). Los *loops* L1 (residuos 52-66) y L4 (residuos 247-263) componen los lados del sitio activo, L3 (residuos 198-213) forma el fondo del sitio activo y L2

(residuos 163-175) presenta la cisteína catalítica (Cys163). Adicionalmente, interacciones entre el *loop* L2' (residuos 176'-192') del otro heterodímero, y los *loops* L2 y L4 parecen estabilizar la conformación activa. En el zimógeno los *loops* L2 y L2' se encuentran enlazados covalentemente, esto se pierde al realizar el corte en el residuo de Asp175.

Las interacciones más relevantes se dan entre los *loops* L2, L4 y L2'. La cadena lateral del residuo de Asp169 (Figura 1.2.3; B) forma EDH cruzando la interfaz del dímero con los residuos Val189' y Glu190' (ambos pertenecientes al L2'). También establece EDH con la Lys260 del L4 y con el Trp206 mediante una molécula de agua. El anillo aromático del Trp206 es importante porque establece interacción de *stacking* con el Trp214, el cual establece EDH con el sustrato en el sitio P4. Por tanto, el residuo de Asp169 participa en tres interacciones de EDH de suma importancia debido a que parecen estabilizar la interacción entre los *loops* catalíticos L2-L2'-L4.

El residuo Glu167 mediante los grupos carbonilo y amida del esqueleto carbonado establece EDHs con los residuos Gly202 y Tyr204 (Figura 1.2.3; C) y con Pro201 asistido con una molécula de agua. Este residuo de Pro201 está localizado en L3 y establece interacciones de *stacking* con la cadena lateral de Arg164 y Tyr197 en el fondo del sitio activo.

La cadena lateral del residuo Tyr203 se encuentra a la distancia apropiada para formar EDH con la cadena lateral de Glu190' (Figura 1.2.3; D) a través de la interfaz del dímero de heterodímeros. El grupo carbonilo de la Tyr203 establece EDH con la amida de la Arg164 (Figura 1.2.3; D). Por tanto, la Tyr203 interacciona a través de la interfaz del dímero de heterodímeros y también parece estabilizar el *loop* L2 que contiene a la Cys catalítica, Cys163.

Se ha determinado mediante experimentos de mutagénesis dirigida que los residuos Glu167, Asp169, Tyr203 son esenciales para la actividad de caspasa-3, debido a que la actividad de la enzima se ve disminuida o es inexistente en mutantes de caspasa-3 con un residuo de Ala en dichas posiciones. Por tanto, la presencia de los EDHs que involucran estos residuos sería esencial para la correcta actividad de la enzima.

También existen otros EDHs relevantes entre estos loops. Los grupos carbonilo y amida del residuo Ile172 forman dos EDH con Ile187' del *loop* L2'. Al final del *loop* L2', el residuo de Lys186 forma dos EDH con Lys260 y con Ala258, pertenecientes a L4.

Por otra parte, caspasa-3 presenta similitud con los demás integrantes de la familia de caspasas siendo ésta máxima con caspasa-7, llegando a un 54 % de identidad en la secuencia. Estas dos enzimas presentan diferencias en la cantidad de aminoácidos (463 residuos en caspasa-3 y 469

residuos en caspasa-7). También se observan diferencias en la forma de la cavidad central, así como en la distribución de la carga. Estas diferencias son las que permiten que ambas enzimas presenten diferencias en sus blancos moleculares⁵⁸.

1.2.2.3 SITIO ALOSTÉRICO

Las caspasas presentan un sitio alostérico en la interfaz entre los heterodímeros. Este sitio está conformado por los residuos Tyr197, Arg164 y Pro201 (Figura 1.2.4). Estos tres residuos se encuentran realizando interacciones de *stacking* en la interfaz. Se han reportado compuestos que interactúan en la interfaz entre los heterodímeros de caspasa generando inhibición de la actividad de la enzima, sin interactuar con residuos del sitio activo⁶¹. Mutantes de residuos en la interfaz entre heterodímeros han mostrado la importancia de este *cluster* alostérico para la actividad de caspasa⁶².

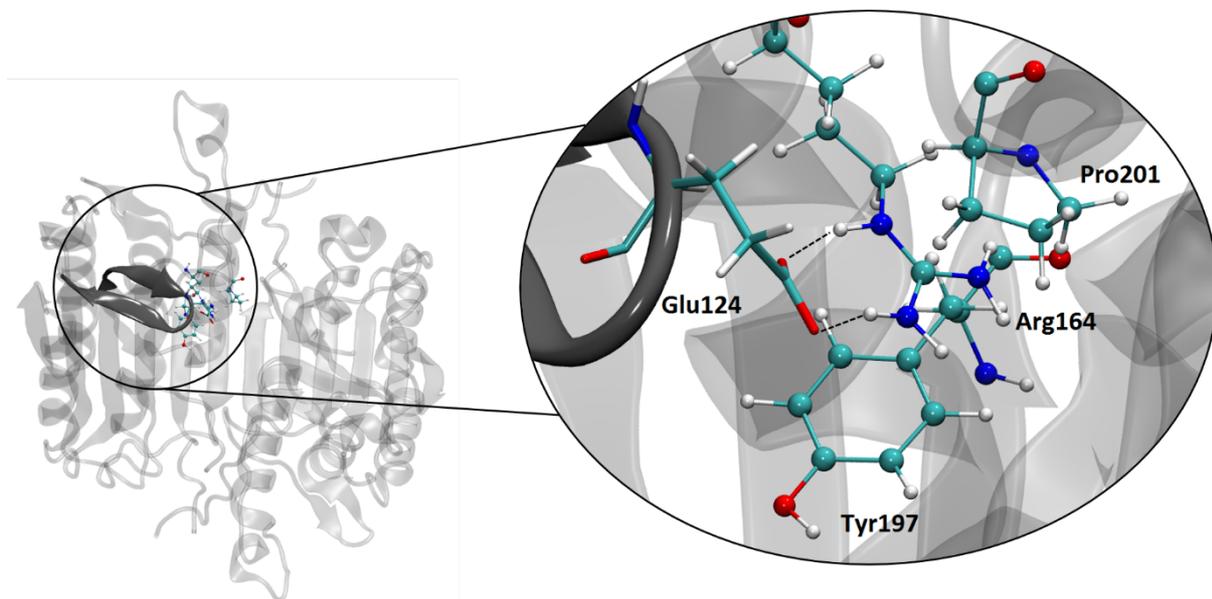


Figura 1.2.4 *Cluster* alostérico entre los residuos Pro201, Arg164 y Tyr197 y la interacción existente entre la Arg164 y el residuo de Glu124 ubicado en la hélice 3 (destacada en gris oscuro) que se encuentra en la interfaz. Imagen generada con VMD⁵⁶

Por otra parte, el residuo Arg164, además de encontrarse en el *loop* L2 y formar parte del *cluster* alostérico, sostiene EDHs con el residuo Glu124. Se ha observado que en mutantes de caspasa-3 inactivos, el residuo Glu124 se mueve hacia afuera de la interfaz de la proteína quedando en una posición expuesta al solvente (a 8 Å de la Arg164)⁶². Por tanto, los residuos del *cluster* alostérico y el residuo Glu124 son los encargados de neutralizar la carga de la Arg164.

1.2.3 CASPASA-3 COMO NUEVO BLANCO TERAPÉUTICO

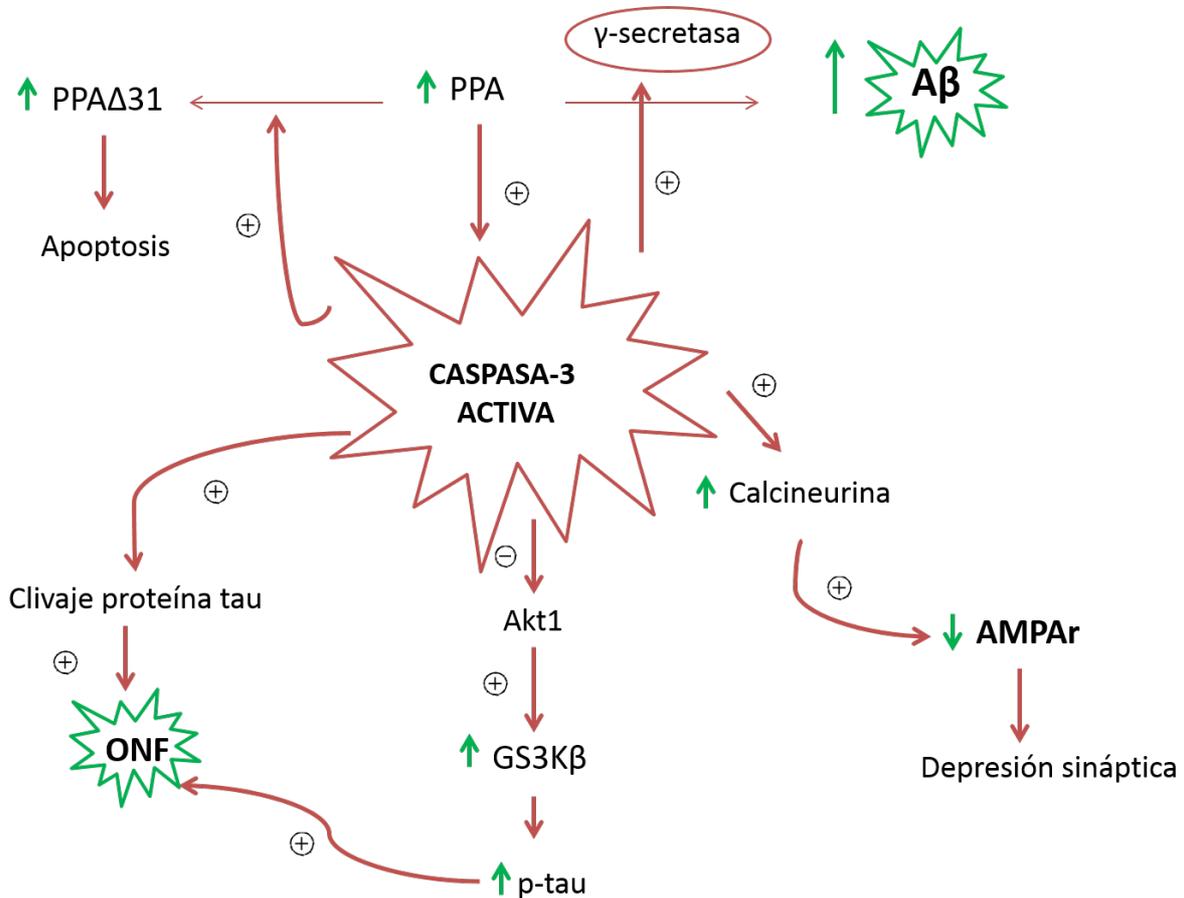
A causa de la falta de un tratamiento efectivo para detener o revertir la EA en los últimos años se han buscado posibles nuevos blanco terapéuticos para su tratamiento los cuales se especificaron en la sección 1.1.4. La caspasa-3 se ha relacionado con distintos procesos que suceden en el sistema nervioso central, no sólo en su rol de caspasa efectora de la apoptosis, sino que también en mecanismos relevantes para el funcionamiento sináptico⁶³.

A lo largo de los años han surgido distintas evidencias que involucran a la enzima caspasa-3 con la EA. Se ha observado la presencia de caspasa-3 activa en cerebros de pacientes con EA, posicionándose principalmente en las terminales post-sinápticas. Su presencia se ha relacionado con las etapas tempranas de la EA^{64,65,66}. Por otra parte, se ha relacionado a esta enzima con los factores neuropatológicos más relevantes de la enfermedad (Esquema 1.1.4), pues la misma se encuentra co-localizada en las regiones de deposición de los ONFs y placas amiloides⁶⁷. También se encontró evidencia de que caspasa-3 estaría relacionada con la formación tanto de las placas amiloides como de los ONF, debido a que sus proteínas precursoras presentan sitios de corte para caspasa-3⁶⁵.

En relación a su participación en la deposición de las placas amiloides, caspasa-3 es capaz de escindir a la PPA y su corte genera fragmentos citotóxicos denominados PPA Δ C31⁶⁸. Se ha demostrado que caspasa-3 activa es capaz de favorecer la vía amoloidogénica de la PPA. Recientemente se relacionó a caspasa-3 con la proteína activadora del complejo γ -secretasa; la actividad de caspasa-3 sería crucial para la formación de esta proteína activadora y por consecuencia para la formación del péptido A β ⁶³.

Respecto a su relevancia en la formación de los ONFs, existe evidencia que caspasa-3 es capaz de modular la hiperfosforilación de la proteína tau. Además, se ha observado la presencia de caspasa-3 activa en neuronas con ONFs inmaduros y maduros, lo que demuestra la participación de caspasa-3 en su desarrollo. La modulación de la hiperfosforilación se basa en que la enzima caspasa-3 escinde a la serin-treonina quinasa Akt en fragmentos pequeños de 45 kDa, lo que disminuye la cantidad de Akt fosforilada activa, esto promueve una menor fosforilación de la quinasa GSK3- β , y una mayor cantidad de GSK3- β activa. Debido a que la quinasa GSK3- β es la

encargada de fosforilar a la proteína tau esto se traduce en mayor cantidad de p-tau lo que promueve la formación de ONFs^{66,69,70}.



Esquema 1.1.4 Relación entre caspasa-3 y los distintos rasgos neuropatológicos de la EA

La actividad de caspasa-3 también ha sido relacionada con la depresión sináptica que conlleva a una desregulación de sinapsis glutamatérgica. En modelos de ratón transgénico Tg2576 que desarrollan deficiencias sinápticas tempranas y placas seniles, se determinó la presencia de la enzima caspasa-3 activa en la sinapsis hipocampal antes de la deposición de las placas amiloides. Se observó que esto causaba una alteración de la transmisión sináptica glutamatérgica, generando una disminución de los receptores GluR1-AMPA por activación de calcineurina, aumentando así la excitotoxicidad del glutamato; también se producía disminución de densidad y tamaño de las espinas dendríticas. Se demostró que al inhibir la caspasa-3 en el modelo transgénico de ratón se generaba una reducción de caspasa-3 activa, lo que generaba también una disminución de calcineurina y el restablecimiento de la cantidad de receptores GluR1-AMPA en las terminales sinápticas. Se restablecía también la densidad post-sináptica y el tamaño de las espinas, y se observaba una mejora en el rendimiento de la memoria (Esquema 1.1.4)^{52,53}.

Teniendo en cuenta la participación de caspasa-3 activa en la síntesis del péptido A β y en la generación de la proteína p-tau, como también su implicancia en la depresión sináptica observada en la EA, esta enzima se ha posicionado como un blanco terapéutico interesante para el tratamiento de EA. Adicionalmente, los recientes hallazgos acerca de la sobreexpresión de caspasa-3 activa en etapas tempranas de la enfermedad apoyan su selección como nuevo blanco.

1.2.4 INHIBIDORES DE CASPASA-3

Debido al creciente interés en la enzima caspasa-3 por su posible participación en la EA, se han diseñado diversos inhibidores que puedan realizar una inhibición selectiva de la actividad de la enzima caspasa-3. Se requiere alta selectividad por caspasa-3 debido a la alta similitud que ésta presenta con el resto de las enzimas integrantes de su familia, particularmente con la caspasa-7 con la cual presenta un 73 y 54 % de similitud e identidad, respectivamente⁷¹. A su vez, se busca que la inhibición sea reversible debido a la importancia fisiológica de esta enzima en la homeostasis del organismo.

Hasta el momento se han diseñado dos categorías de inhibidores de caspasas-3 y -7, inhibidores competitivos y alostéricos. Aquellos inhibidores competitivos interaccionan con los bolsillos de unión al sustrato y se dividen entre derivados peptídicos y derivados no peptídicos, mientras que los inhibidores alostéricos reportados son derivados no peptídicos.

1.2.4.1 DERIVADOS PEPTÍDICOS

Estos inhibidores se basan en análogos de sustrato que se unen de forma covalente al sitio activo de caspasa a través un agrupamiento aldehído o fluorometilcetona. Para favorecer la selectividad por caspasa-3 y -7 se basan en la especificidad observada por los bolsillos de unión a sustrato. Lamentablemente, este tipo de inhibidores no son selectivos para caspasa-3 debido a que no son capaces de discernir entre caspasa-3 y caspasa-7. Cabe agregar que en un posible tratamiento con este tipo de inhibidores, no se esperarían buenos resultados debido a que no presentan buena biodisponibilidad, además que realizan una inhibición covalente irreversible, lo que en este caso no sería recomendable por la importancia de estas enzimas en el organismo^{6,61}.

1.2.4.2 DERIVADOS NO PEPTÍDICOS ALOSTÉRICOS

Se han propuesto compuestos capaces de inhibir a caspasas interaccionando en regiones distantes de los bolsillos catalíticos, por lo cual se denominan inhibidores alostéricos. Este tipo de compuestos interaccionan en la interfaz entre heterodímeros de la enzima. Los primeros inhibidores alostéricos identificados se denominaron DICA y FICA (Figura 1.2.6). Se observó que

los mismos interaccionaban en la interfaz de la enzima de forma irreversible, esto se debe a que forman un enlace covalente disulfuro entre el agrupamiento etilmercapto y el grupo tiol de una cisteína de la interfaz. La unión de estos compuestos generaba la ruptura de la interacción entre los residuos alostéricos Arg164 y Tyr197. Además, el loop L2' interaccionaba con el sitio alostérico, esto generaba una ruptura de las interacciones que se deben llevarse a cabo entre los loops catalíticos para el correcto funcionamiento de la enzima. Estos cambios tienen como consecuencia una distorsión en el sitio activo de la enzima lo que no permite la correcta unión del sustrato, generando una estructura similar a la observada en el zimógeno. Es importante destacar que estos inhibidores son selectivos para caspasa-3 y -7 debido a que los mismos interaccionan con un residuo de cisteína que sólo se encuentra conservado únicamente en estas enzimas^{61,72}.

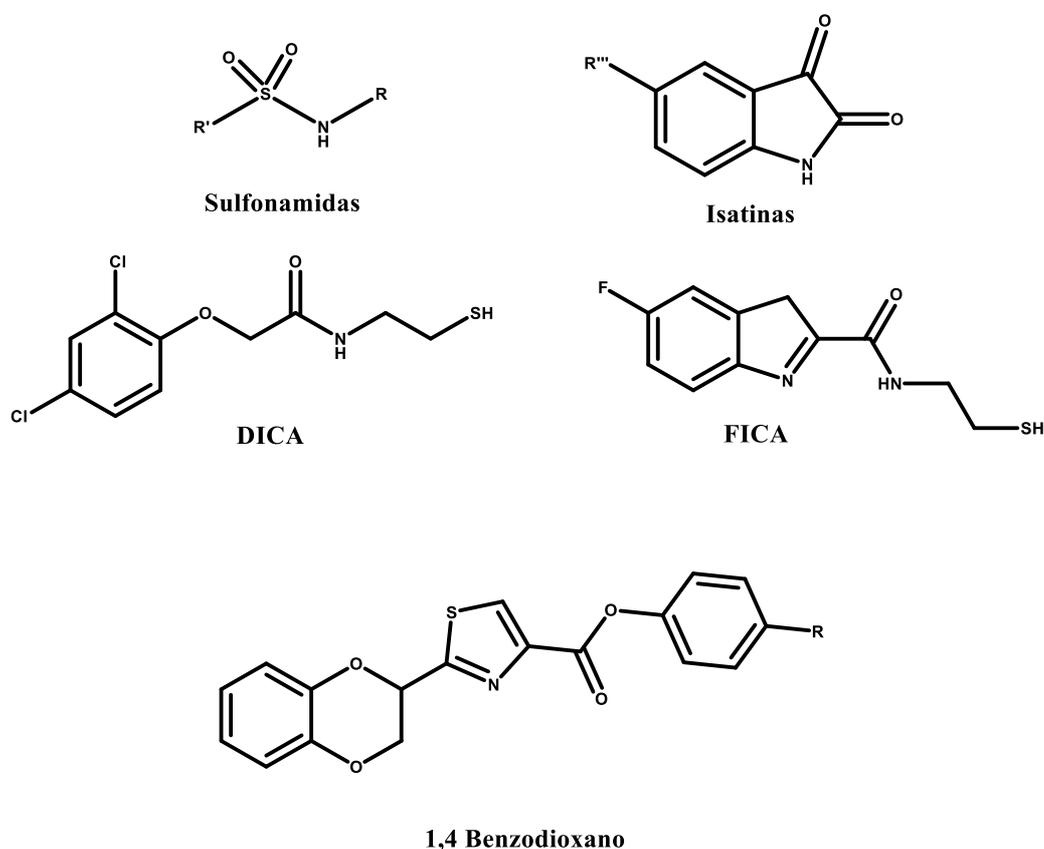


Figura 1.2.6 Agrupamientos relevantes para la inhibición de caspasas.

También se han identificado otros inhibidores alostéricos. A diferencia de los mencionados anteriormente, éstos son inhibidores reversibles. No obstante, tienen la desventaja de no presentar selectividad por ninguna caspasa en particular, se denominan inhibidores pan-caspasa⁷³.

1.2.4.3 DERIVADOS NO PEPTÍDICOS

Debido a las deficiencias observadas en los inhibidores basados en derivados peptídicos, se han realizado esfuerzos en la búsqueda de inhibidores de caspasas basados en derivados no peptídicos^{61,74,75,76}. Entre éstos se encuentran los inhibidores con agrupamientos isatina (Figura 1.2.6). Estos derivados interaccionan en la región de los bolsillos catalíticos y se unen de forma covalente a la enzima a través de la cisteína catalítica. No presentan selectividad entre caspasa-3 y -7^{61,75,76}. También se identificaron derivados de sulfonamidas (Figura 1.2.6) capaces de inhibir a caspasas, presentando buenos índices de selectividad frente a caspasa-3. Interaccionan con los bolsillos catalíticos de caspasa-3, realizando un enlace covalente con la cisteína catalítica⁷⁴.

Recientemente se identificaron derivados de 2-(1,4-benzodioxan)-1,3-tiazol capaces de inhibir a las enzimas caspasa-3, -7 y -8⁷⁷. Dependiendo del sustituyente a nivel de agrupamiento tiazol (Figura 1.2.6) su selectividad varía entre las enzimas mencionadas. Los sustituyentes en posición 4 del anillo tiazólico que presentan fenilos presentan la mayor inhibición en ambas enzimas, mientras que agrupamientos éster en dicha posición que presentan aromáticos favorecen tanto la inhibición como la selectividad por caspasa-3. A diferencia del resto de los inhibidores no peptídicos, éstos no interaccionarían de forma covalente con la enzima, lo que les permitiría realizar una inhibición reversible.

1.3 DISEÑO DE LOS COMPUESTOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

El trabajo planteado en esta tesis tiene como antecedente una publicación donde se describen derivados de 2-(1,4-benzodioxano)-1,3-tiazol como inhibidores reversibles de la enzima con diferentes índices de selectividad entre caspasa-3 y caspasa-7⁷⁷. Dentro de los derivados evaluados, el compuesto con mayor actividad tanto en caspasa-3 como en caspasa-7 presentaba un agrupamiento fenilo en la posición 4 del anillo tiazólico (Figura 1.3.1, compuesto 2) con un índice de selectividad entre caspasa-3 y caspasa-7 igual a 1,4. A su vez los compuestos que presentaban un grupo funcional éster en la misma posición y estaban sustituidos por un fenilo fueron capaces de inhibir la actividad de caspasa-3 con menor afinidad pero presentaron mejores índices de selectividad (Figura 1.3.1). El resto de los compuestos presentaban IC₅₀ mayores a 80 μM respecto a la inhibición de la actividad de caspasa-3 y -7, por lo cual no serían buenos inhibidores. Por tanto, teniendo en cuenta que todos los compuestos presentan al agrupamiento 1,4-benzodioxano en la posición 2 del anillo tiazólico y que no todos son buenos inhibidores, este agrupamiento no parecería aportar para la inhibición de la actividad de ambas caspasas.

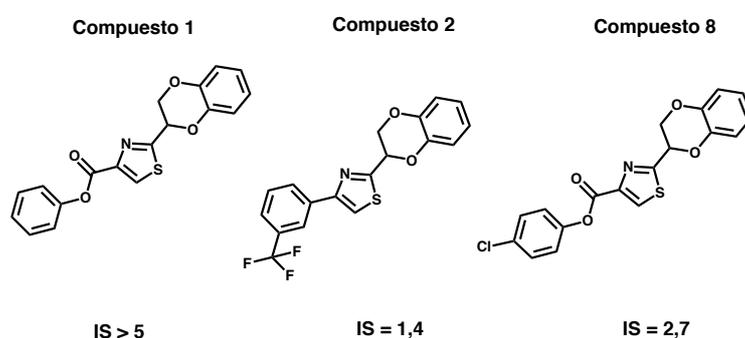


Figura 1.3.1 Estructuras e índices de selectividad (IS) entre caspasa-3 y caspasa-7 de algunos derivados de tiazol reportados⁷⁷

Para entender con mayor profundidad en qué se basaba la inhibición de los derivados de tiazol reportados⁷⁷ en ambas enzimas y la diferencia en la selectividad, previamente al comienzo de esta tesis nuestro grupo realizó un trabajo teórico-computacional⁷⁸ donde se estudiaron en detalle los sitios de interacción y la dinámica de interacción de los compuestos en ambas enzimas. Mediante este trabajo fue posible determinar el posible sitio de interacción de los compuestos seleccionados mediante *docking* y dinámica molecular. Se obtuvo que los compuestos 1 y 8 (Figura 1.3.1) interaccionarían en regiones cercanas a los sitios catalíticos en caspasa-3, mientras que en caspasa-7 interaccionarían en la interfaz entre heterodímeros. El compuesto 2 (Figura 1.3.1) interaccionaría en la interfaz entre heterodímeros en ambas enzimas⁷⁸. A su vez, este trabajo teórico-

computacional sugiere que el agrupamiento 1,4-benzodioxano no asegura la interacción de los derivados en el sitio catalítico, lo cual es consistente con los resultados experimentales reportados⁷⁷.

A la luz de los antecedentes recién descritos, se realizó el diseño de los nuevos derivados de 4-fenil-1,3-tiazol con diferentes sustituyentes (Figura 1.3.2). Para establecer la estructura base (común) de los compuestos diseñados se tuvo en cuenta la estructura del compuesto 2, que presentó mayor actividad frente a ambas enzimas y contenía un agrupamiento fenilo en posición 4 del anillo tiazólico (Figura 1.3.1). Para establecer el tipo de sustituyente en posición 2 del anillo tiazólico se tuvo en cuenta que, de acuerdo a los antecedentes, la presencia del agrupamiento 1,4-benzodioxano no aseguraba la inhibición ni su selectividad entre ambas enzimas. Por lo tanto, se decidió incorporar en dicha posición variaciones estructurales para explorar la posible inhibición y selectividad de los compuestos. En este sentido, se diseñaron cuatro series de compuestos conformadas por derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-carbamato (Serie A), de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol (Serie B), de 4-naftil-1,3-tiazol-2-amina (Serie C) y de 4-fenil-1,3-tiazol-2-éter (Serie D).

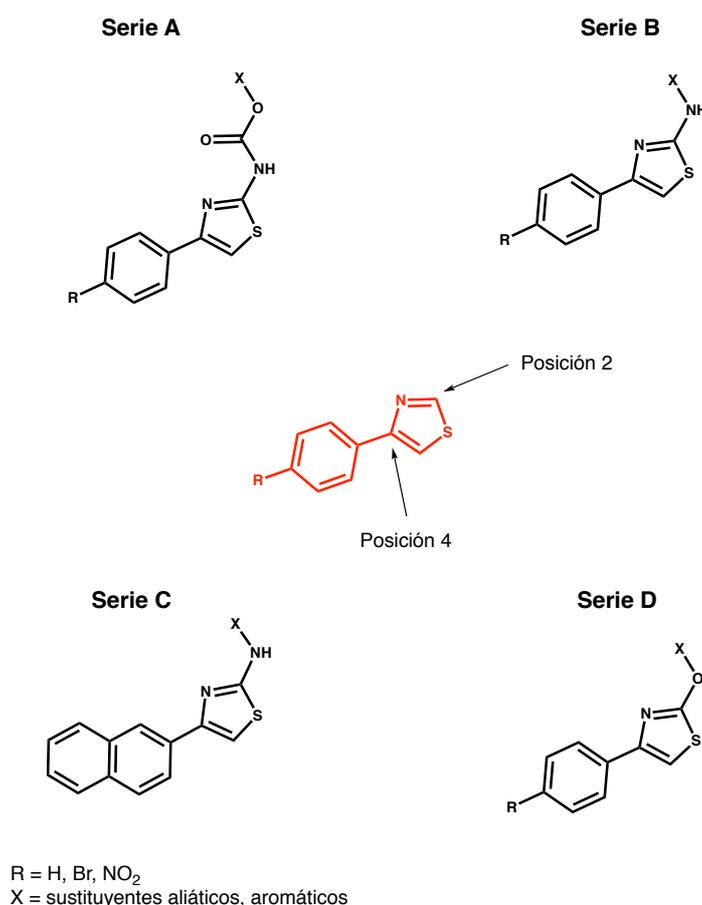


Figura 1.3.2 Estructura de los compuestos diseñados. En el centro se muestra el núcleo común. Se destacan las posiciones donde se realizan las modificaciones para generar las series propuestas.

Teniendo en cuenta los antecedentes propocionados anteriormente, la hipótesis del presente trabajo se basa en que los derivados de 4-fenil-1,3-tiazol propuestos serían capaces de inhibir de forma selectiva y reversible la actividad de caspasa-3.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al desarrollo de nuevos inhibidores reversibles y selectivos para caspasa-3, posible blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Sintetizar nuevos derivados de 4-fenil-1,3-tiazol como posibles inhibidores reversibles y selectivos de caspasa-3.
- 2- Evaluar la capacidad de los derivados de inhibir la actividad de las enzimas caspasa-3 y -7.
- 3- Realizar la caracterización preclínica de los derivados seleccionados como posibles inhibidores: citotoxicidad en la línea celular HT22; metabolización utilizando la fracción S9 de hígado de rata; capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica a partir del ensayo *in vitro* PAMPA; capacidad mutagénica mediante el ensayo Ames.
- 4- Determinar el posible mecanismo de inhibición selectiva a partir de simulaciones de dinámica molecular.
- 5- Identificar los sitios de interacción del ligando con la enzima mediante ensayos de diferencia en la transferencia de saturación por resonancia magnética nuclear.

3. SÍNTESIS ORGÁNICA

3.1 GENERALIDADES

En esta sección se explican los procedimientos realizados para la obtención mediante síntesis orgánica de los derivados de 4-fenil-1,3-tiazol. También se describen los procedimientos realizados para llevar a cabo la elucidación estructural de los compuestos obtenidos; estos resultados se encuentran en la sección sobre elucidación estructural al final del documento de Tesis. Como se explicó anteriormente, se diseñaron 4 nuevas series, Serie A conformada por derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-carbamato, Serie B por derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol, Serie C por derivados de 2-amino-4-naftil-1,3-tiazol y Serie D por derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-éter. En esta sección también se muestran y se discuten los resultados obtenidos para cada serie propuesta.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Consideraciones generales de la síntesis orgánica. Los disolventes se destilaron previo a su uso. Se utilizaron reactivos comerciales provenientes de Aldrich, Merck y Fluka, entre otros. El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinó por cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizó silicagel con indicador fluorescente en placas de poliéster o de aluminio, lo que permite observar la absorción de la luz ultravioleta de los compuestos. Los cromatogramas se revelaron por alguno de los siguientes métodos: exposición a la luz ultravioleta a 254 nm o 365 nm, asperjado con una mezcla de etanol:ácido sulfúrico:anisaldehído (95:4:1) (v/v/v) y posterior quemado, exposición a vapores de yodo. Para las cromatografías en columna (CC) se utilizó silicagel (Merck, 35-70 μm).

Consideraciones generales sobre la elucidación estructural de los compuestos. Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se realizaron en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz) ubicado en Facultad de Química, UdelaR, utilizando tetrametilsilano como referencia interna. Los disolventes deuterados utilizados fueron acetona y dimetilsulfóxido. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm, las multiplicidades de las señales se designan como: **s** singulete, **d** doblete, **t** triplete, **c** cuarteto, **m** multiplete. Las secuencias de pulsos de los experimentos HMQC y HMBC utilizados fueron las disponibles en el software del equipo. Los espectros de masa (EM) se realizaron en un espectrómetro de masas SHIMADZU GC-MS QP2010 SE ubicado en Facultad de Química, UdelaR. Se realizaron ionizaciones de la muestra por impacto electrónico a 20 y 70 eV

3.3 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE FENILTIAZOLCARBAMATO (SERIE A)

3.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS PARTICULARES

3.3.1.1 PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE 4-FENIL-1,3-TIAZOL-2-ARILCARBAMATO

Se disolvió el derivado 2-amino-4-feniltiazol (0.2 mmol) en 5 ml de CH₂Cl₂ seco en presencia de N,N-diisopropilamina (DIPEA) o trietilamina (Et₃N) (0.6 mmol) bajo agitación constante y se adicionó el derivado de fenilcloroformiato correspondiente (0.3 mmol) dejándose bajo agitación constante a 0° C durante 3 h. Una vez consumidos los reactivos se agregó agua y se extrajo con AcOEt, la capa orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. Se purificó por columna utilizando como fase estacionaria silicagel y como fase móvil Hexano:AcOEt 80:20⁷⁹.

3.3.1.2 PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE 4-FENIL-1,3-TIAZOL-2-ARILCARBAMATO CON CARBONILDIIMIDAZOL (CDI)

A una solución de CDI (0.039 mmol) en 5 mL THF seco se adicionó lentamente el alcohol seleccionado (0.039 mmol) en agitación constante. Se dejó la mezcla a temperatura ambiente y agitación constante por 1 h, luego se adicionó una solución de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol (0.039 mmol) en THF seco, dejando la mezcla a temperatura ambiente y en agitación constante por 18 h⁸⁰.

3.3.1.3 PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE 4-FENIL-1,3-TIAZOL-2-ALQUILCARBAMATO

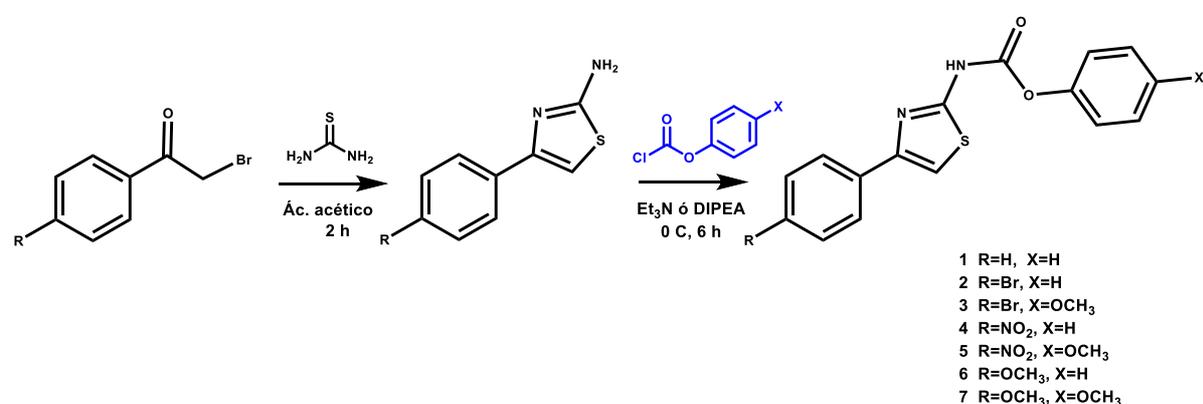
Se disolvió el derivado de 2-amino-4-feniltiazol (0.2 mmol) en 5 mL de CH₂Cl₂ seco en presencia de Et₃N (0.2 mmol) bajo agitación constante en atmósfera de N₂ y se adicionó el derivado de alquilcloroformiato correspondiente (0.3 mmol) dejándose bajo agitación constante a 0° C y tapado de la luz, durante el tiempo necesario para observar reducción o desaparición de la amina de partida. Una vez consumidos los reactivos se agregó agua y se extrajo con AcOEt, la capa orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. Se purificó por columna utilizando como fase estacionaria silicagel y como fase móvil Hex/AcOEt 80:20⁷⁹.

3.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La síntesis de derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-carbamatos se realizó en dos pasos (Esquema 3.3.1). En primer lugar se obtuvieron los derivados de 2-amino-4-feniltiazol, donde en un medio ácido ocurre un ataque nucleofílico por parte de la tiourea sobre el átomo de carbono metilénico de la *p*-bromoacetofenona y posteriormente se da la ciclación del anillo tiazólico, obteniéndose el producto deseado por precipitación⁸¹.

En el segundo paso se obtuvo el derivado de 4-feniltiazol-2-carbamato, donde en presencia de una base orgánica (Et_3N o DIPEA) el derivado de 2-amino-4-feniltiazol realiza un ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono carbonílico del cloroformiato correspondiente. Las reacciones se monitorearon por CCF (fase estacionaria: silicagel; fase móvil: Hex:AcOEt 8:2) y el producto final se purificó por cromatografía en columna⁷⁹.

Para lograr la síntesis de los derivados de la Serie A se consideró partir de diferentes cloroformiatos aromáticos (color azul en Esquema 3.3.1). Como se aprecia en la Tabla 3.3.1 se obtuvieron muy bajos porcentajes de rendimiento y únicamente se logró obtener tres de los compuestos de interés.



Esquema 3.3.1 Ruta sintética de derivados 4-fenil-1,3-tiazol-2-carbamato

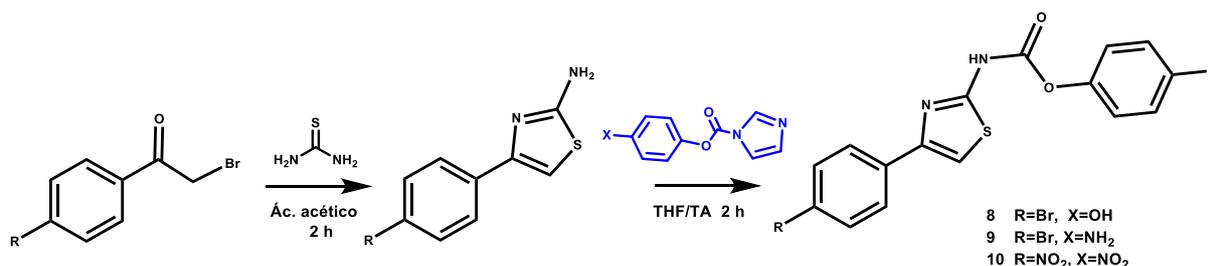
Estos bajos rendimientos en las reacciones a partir de derivados de arilcloroformiatos probablemente se deban a su baja estabilidad en la mezcla de reacción, lo que genera menor cantidad de reactivo disponible para obtener el producto esperado. La baja estabilidad pudo determinarse en el seguimiento de la reacción por CCF, donde se observaba la descomposición del cloroformiato con el transcurso del tiempo. A su vez, es importante destacar que los derivados de 2-amino-4-feniltiazol presentan baja nucleofilia, la cual podría contrarrestarse con un aumento en la temperatura de reacción. En este caso el aumento de la temperatura únicamente favorecía a la descomposición del cloroformiato de partida y no aumentaba el rendimiento de la reacción. Se variaron las condiciones de reacción, utilizando distintas bases orgánicas, distintos disolventes de reacción y cambios en la temperatura, sin conseguir buenos resultados (Tabla 3.3.1), siendo las mejores condiciones las especificadas en el Esquema 3.3.1.

Tabla 3.3.1 Condiciones de reacción para la segunda etapa y resultados obtenidos para la síntesis de derivados de fenil(4-fenil-1,3-tiazol)2-il-carbamatos.

Referencia	% Rendimiento	Condiciones
1*	< 15	THF, atmosfera de N ₂ 0 °C, Et ₃ N
2	-	DIPEA, CH ₂ Cl ₂ seco con atmosfera de N ₂ , 0 °C
3	-	Et ₃ N, CH ₂ Cl ₂ seco con atmosfera de N ₂ , 0 °C
4	-	DIPEA, CH ₂ Cl ₂ seco con atmosfera de N ₂ , 0 °C
5	4	DIPEA, CH ₂ Cl ₂ seco con atmosfera de N ₂ , 0 °C
6	7.5	DIPEA, CH ₂ Cl ₂ seco con atmosfera de N ₂ , 0 °C
7	-	THF, atmosfera de N ₂ 0 °C, Et ₃ N

*Se observó la presencia del compuesto por RMN pero se detectó contaminación del mismo por fenol

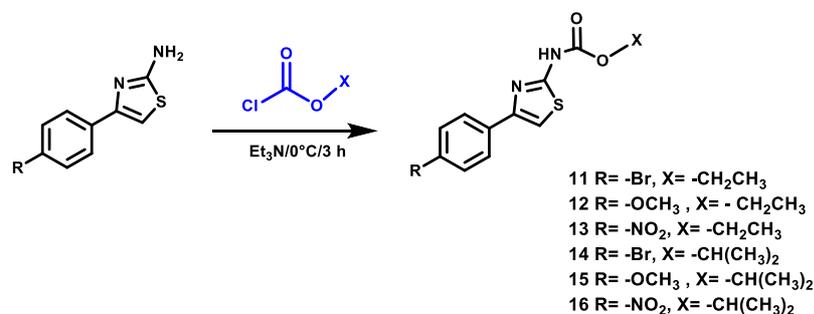
En la búsqueda de mejorar los rendimientos obtenidos se ensayaron nuevas condiciones para obtener estos derivados. Se realizaron cambios en la ruta de síntesis para evitar la utilización de cloroformatos, debido a su baja estabilidad en las mezclas de reacción. En su lugar, la síntesis se basó en la formación de un intermediario éster carboxílico de imidazol (Esquema 3.3.2, destacado en azul) utilizando como reactivos fenol y CDI. Mediante la adición de una amina, en nuestro caso los derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol, se rompería el enlace que conecta el imidazol con el éster, para dar lugar al carbamato de interés (Esquema 3.3.2)⁸⁰.



Esquema 3.3.2 Ruta sintética de derivados 4-feniltiazol-2-arylcarbamato utilizando el intermediario CDI, en azul se destaca el intermediario éster carboxílico de imidazol.

En los distintos intentos se utilizaron distintos fenoles sin lograr resultados positivos. La causa de la falta de resultados puede deberse a que las aminas son aromáticas, con la consecuente escasa nucleofilia. La presencia del intermediario de la reacción se determinó por ¹H-RMN.

Debido a los bajos rendimientos se diseñaron nuevos derivados *p*-feniltiazolcarbamatos, en este caso los cloroformatos utilizados son derivados de alquilcloroformatos (color azul en Esquema 3.3.3), más estables en la mezcla de reacción (Esquema 3.3.3).



Esquema 3.3.3 Ruta sintética de derivados 4-fenil-1,3-tiazol-2-alkilcarbamato

En este caso se obtuvieron los 4-feniltiazol-2-alkilcarbamatos con rendimiento de reacción bajos a moderados (Tabla 3.3.2). Con estos resultados es posible comprobar que la ruta sintética conduce a la obtención de un buen número de compuestos y que la falta de reacción en la obtención de los derivados de ariltiazolcarbamatos se debió probablemente a la baja estabilidad de estos reactivos en la mezcla de reacción.

Tabla 3.3.2 Condiciones de reacción y resultados obtenidos para la síntesis de derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-alkilcarbamato

Referencia	% Rendimiento	Condiciones
11	22	CH ₂ Cl ₂ seco, atmósfera de N ₂ , Et ₃ N
12	30	CH ₂ Cl ₂ seco, atmósfera de N ₂ , Et ₃ N
13	8	CH ₂ Cl ₂ seco, atmósfera de N ₂ , Et ₃ N
14	29	CH ₂ Cl ₂ seco, atmósfera de N ₂ , Et ₃ N
15	16	CH ₂ Cl ₂ seco, atmósfera de N ₂ , Et ₃ N
16	7	CH ₂ Cl ₂ seco, atmósfera de N ₂ , Et ₃ N

Para los derivados que presentaron en la posición R un agrupamiento nitro, derivados **13** y **16**, se obtuvieron los rendimientos más bajos, esto se debe al carácter atrayente de electrones de dicho agrupamiento, lo que genera una disminución en la nucleofilia del agrupamiento amino que se encarga de realizar el ataque nucleofílico para el desarrollo de la reacción. Respecto al resto de los

sustituyentes, la presencia de bromo o de un agrupamiento metoxi aumenta considerablemente el rendimiento de la reacción. Esto puede deberse a que el bromo presenta un carácter atrayente de electrones menor que el agrupamiento nitro, y a que el agrupamiento metoxi presenta carácter dador de electrones (Tabla 3.3.2).

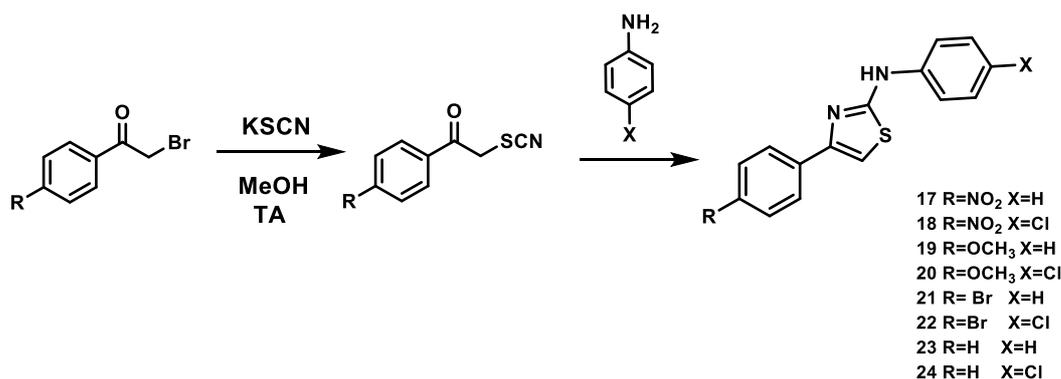
3.4 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE FENILTIAZOLAMINA (SERIE B)

3.4.1 MATERIALES Y MÉTODOS PARTICULARES

Se disolvió el derivado de 2-bromoacetofenona (0.2 mmol) en 10 mL de MeOH (o CH₃CN, tolueno, THF) en presencia de KSCN (0.3 mmol) y se dejó agitando por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, a la mezcla anterior se agregó gota a gota la anilina correspondiente (0.2 mmol) disuelta en MeOH. La mezcla se calentó a reflujo por 8 h bajo agitación constante. Posteriormente se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente obteniéndose un precipitado que se filtró y se lavó con agua. En caso de no haberse obtenido precipitado, se realizó una extracción con AcOEt:Agua (3 x 10 mL), la capa orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. Posteriormente se realizó una purificación por columna, utilizando silicagel y una fase móvil Hex:AcOEt con la proporción necesaria que permita la correcta purificación del producto de interés⁸².

3.4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como alternativa de los derivados arilcarbamatos que no pudieron obtenerse y la necesidad de sustituyentes aromáticos, se diseñaron estos derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazolaromáticos (Esquema 3.4.1). Los derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol se obtuvieron por una ruta de síntesis en dos pasos. En el primer paso se forma un intermediario derivado de tiocianato, este intermediario se consigue a partir de una sustitución nucleofílica del átomo de bromo de la *p*-bromoacetofenona por el agrupamiento tiocianato. Una vez formado el intermediario no es necesaria la purificación del mismo, en la misma mezcla de reacción se adiciona la amina de interés, la cual realiza un ataque nucleofílico sobre el tiocianato promoviendo la ciclación del anillo tiazólico y la formación de la *p*-feniltiazolamina de interés (Esquema 3.4.1)⁸².



Esquema 3.4.1 Ruta de síntesis para la obtención derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol

Los primeros derivados diseñados se obtuvieron con rendimientos moderados (Tabla 3.4.1). Como se observa en la Tabla 3.4.1 únicamente los compuestos con un agrupamiento metoxi en posición cuatro de la 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol no lograron obtenerse. Esto puede deberse a que el grupo metoxi tiene carácter electrón-dador lo que genera una disminución en la electrofilia del átomo de carbono metilénico vecino al átomo de bromo en el derivado 4-metoxi-2-bromoacetofenona.

Tabla 3.4.1 Condiciones de reacción y resultados obtenidos para la síntesis de derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol

Referencia	% Rendimiento	Condiciones
17	55	MeOH, reflujo
18	44	MeOH, reflujo
19	-	MeOH, reflujo
20	-	MeOH, reflujo
21	23	MeOH, reflujo
22	47	MeOH, reflujo
23	34	MeOH, reflujo
24	38	MeOH, reflujo

Como la ruta sintética diseñada con los derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol presentó resultados positivos se optó por diseñar nuevos derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol. Al variar el derivado de amina se obtienen derivados de 2-amino-4-feniltiazol que incorporan distintos sustituyentes en la posición dos del anillo tiazólico. Con la incorporación de estas aminas a los derivados se pretende aumentar la diversidad (Figura 3.4.1) de los posibles inhibidores. Para esto se seleccionaron como reactivos aminas secundarias en heterociclos, aminas secundarias, aminas primarias asociadas a anillos aromáticos y aminas aromáticas (Figura 3.4.1). De esta manera se pretendió explorar qué

efecto tiene el cambio del sustituyente en la inhibición de caspasa-3 y así conocer cuáles son los requerimientos de la enzima para su inhibición.

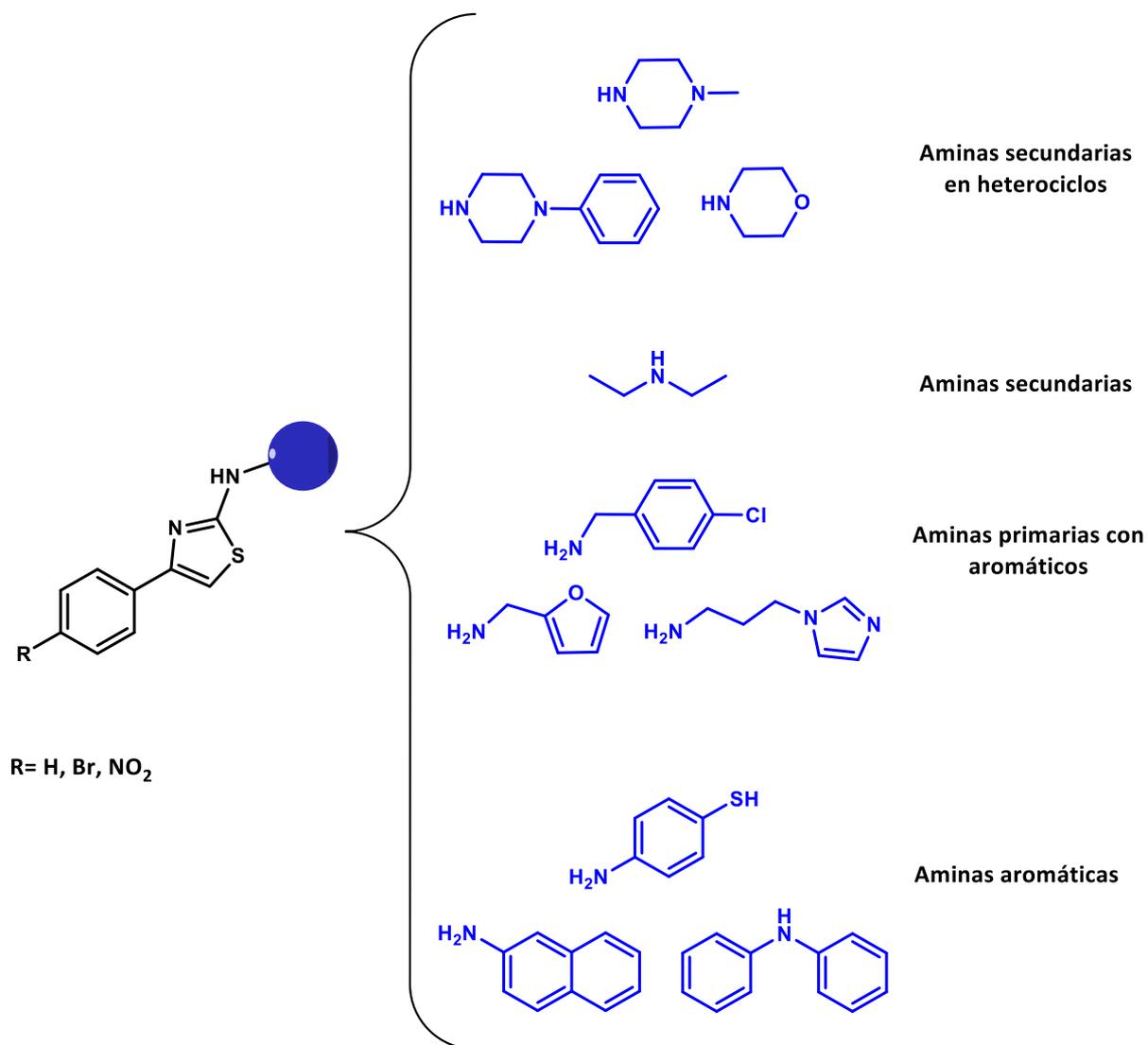


Figura 3.4.1 Nuevos derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol diseñados con diversas aminas como reactivos.

Tabla 3.4.2 Condiciones de reacción y resultados obtenidos para la síntesis de los nuevos derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol

Ref.	% Rendimiento	R	X	Condiciones
25	14	H	fenilpiperazina	CH ₃ CN, reflujo
26	49	Br	fenilpiperazina	CH ₃ CN, reflujo
27	22	NO ₂	fenilpiperazina	CH ₃ CN, reflujo
28*	-	H	metilpiperazina	CH ₃ CN, reflujo
29*	-	Br	metilpiperazina	CH ₃ CN, reflujo
30*	-	NO ₂	metilpiperazina	CH ₃ CN, reflujo
31	28	H	morfolina	CH ₃ CN, reflujo
32	17	Br	morfolina	CH ₃ CN, reflujo
33	29	NO ₂	morfolina	CH ₃ CN, reflujo
34*	-	H	dietilamina	CH ₃ CN, reflujo
35*	-	Br	dietilamina	CH ₃ CN, reflujo
36	8	NO ₂	dietilamina	CH ₃ CN, reflujo
37	24	H	furfurilamina	CH ₃ CN, reflujo
38	26	Br	furfurilamina	CH ₃ CN, reflujo
39	30	NO ₂	furfurilamina	CH ₃ CN, reflujo
40	10	H	4-Cl-bencilamina	CH ₃ CN, reflujo
41	24	Br	4-Cl-bencilamina	CH ₃ CN, reflujo
42	19	NO ₂	4-Cl-bencilamina	CH ₃ CN, reflujo
43*	-	H	2-metil-1H-imidazolpropanamina	CH ₃ CN, reflujo
44*	-	Br	2-metil-1H-imidazolpropanamina	CH ₃ CN, reflujo
45*	-	NO ₂	2-metil-1H-imidazolpropanamina	CH ₃ CN, reflujo
46*	-	H	4-aminotiofenol	CH ₃ CN, reflujo
47*	-	Br	4-aminotiofenol	CH ₃ CN, reflujo
48*	-	NO ₂	4-aminotiofenol	CH ₃ CN, reflujo
49*	-	H	difenilamina	CH ₃ CN, reflujo
50*	-	Br	difenilamina	CH ₃ CN, reflujo
51*	-	NO ₂	difenilamina	CH ₃ CN, reflujo
52*	-	H	2-naftilamina	CH ₃ CN, reflujo
53*	-	Br	2-naftilamina	CH ₃ CN, reflujo
54	10	NO ₂	2-naftilamina	CH ₃ CN, reflujo

Como se observa en la Tabla 3.4.2 se obtuvieron 14 nuevos derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol con rendimientos de bajos a moderados. Para los derivados que presentan un asterisco en la Tabla 3.4.2 se probaron diferentes alternativas para obtenerlos, sin conseguir buenos resultados. Se utilizaron diferentes disolventes de reacción (CH_3CN , MeOH , tolueno, EtOH , etc), obteniéndose los mejores resultados con CH_3CN .

Se puede concluir que la ausencia de reacción para las aminas alifáticas (metilpiperazina, dietilamina y 2-metil-1*H*-imidazol-propanamina) se debe a la alta reactividad de las mismas, que no favorece que se lleve a cabo la reacción deseada, sino que se obtienen productos secundarios siendo el producto de interés obtenido con muy bajo rendimiento. Estos productos secundarios podrían ser consecuencia de reacciones entre la amina y bromoacetona de partida, debido a que no hay un paso de purificación del intermediario; a su vez se podrían dar reacciones de *N*-alquilación de la amina secundaria formada con la bromoacetona. Estas reacciones también podrían ocurrir entre la amina y el intermediario de la reacción, generando los productos secundarios anteriormente mencionados. Esto explica el bajo rendimiento observado para el compuesto **36** debido a que en la reacción se generaban muchos productos secundarios por la descomposición del material de partida, observándose la presencia de múltiples compuestos por CCF. Cabe agregar que los compuestos **34** y **35** pudieron no haberse obtenerse por la naturaleza de su sustituyente en *para* al anillo tiazólico, hidrógeno y bromo, respectivamente. Esto genera que el intermediario sea menos electrofílico que en el caso del **36**, lo que explica la incapacidad de obtener los compuestos de interés. Para obtener aminas alifáticas que se aproximen a las estructuras propuestas se podría partir de una bromoacetofenona y tiourea. De esta manera se obtendría el derivado 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol, este derivado podría reaccionar con una ácidos carboxílicos alifáticos lo que generaría una amida⁸⁴. Por último se realizaría la reducción de la amida a una amina con $\text{POCl}_3/\text{NaBH}_4$ ⁸⁵.

Respecto a las aminas primarias asociadas a sustituyentes aromáticos, se obtuvieron derivados con buenos rendimientos, cuando se utilizó como amina reactiva furfurilamina o 4-cloro-bencilamina (Tabla 3.4.2), pero al utilizar la amina primaria 2-metil-1*H*-imidazol-propanamina no fue posible conseguir el producto de interés. Para esta última reacción se probaron diferentes condiciones sin poder obtener el compuesto de interés, variando los disolventes (CH_3CN , MeOH , tolueno y THF) como también temperatura de la reacción, con y sin calentamiento a reflujo. Iguales estrategias se utilizaron para la metilpiperazina como reactivo de partida sin obtener resultados positivos.

Respecto a las aminas aromáticas, la ausencia de reacción se puede atribuir a la presencia de los sistemas *pi* de los anillos aromáticos que reducen la nucleofilia de la amina, lo que reduce su

capacidad para realizar un ataque nucleofílico sobre el intermediario de la reacción. Como se observa en la Tabla 3.4.2 únicamente se obtuvo el compuesto **54** con muy bajo rendimiento; la posibilidad de obtener el compuesto de interés se puede atribuir al carácter electrón atrayente del grupo nitro como sustituyente en *para*. Para la obtención del resto de los compuestos se utilizaron diferentes condiciones, cambiando el disolvente, la temperatura y el tiempo de reacción, pero debido seguramente a la baja nucleofilia de estas aminas no fue posible conseguir los compuestos de interés.

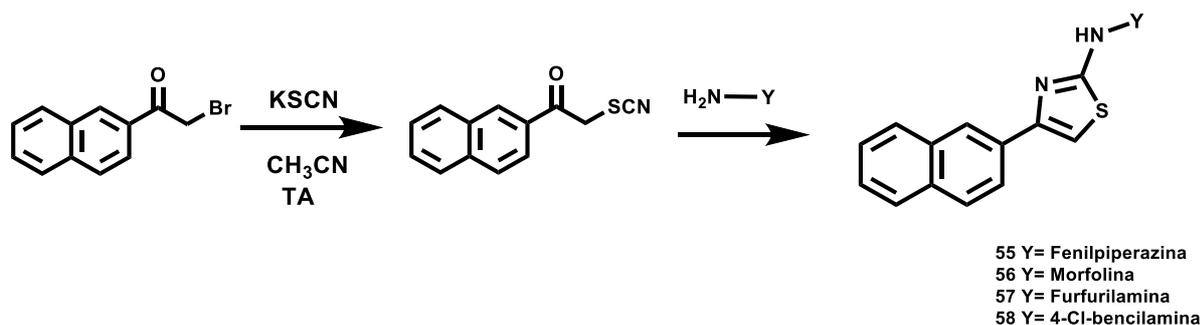
3.5 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE NAFTILTIAZOLAMINA (SERIE C)

3.5.1 MATERIALES Y MÉTODOS PARTICULARES

Se disolvió el derivado de 2-bromoacetonaftona (0.2 mmol) en 10 mL de CH₃CN en presencia de KSCN (0.3 mmol) y se dejó agitando por 30 min a temperatura ambiente. A continuación, a la mezcla anterior se agregó gota a gota la anilina correspondiente (0.2 mmol) disuelta en CH₃CN. La mezcla se calentó a reflujo por 12 h bajo agitación constante. Posteriormente se dejó enfriar hasta llegar a temperatura ambiente y se realizó una extracción con AcOEt:Agua (3 x 10 mL), la capa orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. Posteriormente se realizó una purificación por columna, utilizando sílicagel y una fase móvil Hex:AcOEt con la proporción necesaria para la correcta purificación del producto de interés⁸².

5.5.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los derivados de 2-amino-4-naftil-1,3-tiazol se obtuvieron por una síntesis en dos pasos. En el primer paso se forma un intermediario derivado de tiocianato, de forma análoga a la obtención de los derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol, este intermediario se obtiene a partir de una sustitución nucleofílica del átomo de bromo de la bromoacetonaftona por el agrupamiento tiocianato en forma similar a lo descrito en el punto anterior. Una vez formado el intermediario no es necesaria la purificación del mismo, en la misma mezcla de reacción se adiciona la amina de interés, la cual realiza un ataque nucleofílico sobre el tiocianato promoviendo la ciclación del anillo tiazólico y la formación de la naftiltiazolamina de interés (Esquema 3.5.1).



Esquema 3.5.1 Ruta de síntesis para la obtención de derivados de 2-amino-4-naftil-1,3-tiazol

Teniendo en cuenta la experiencia en la síntesis de los derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol, principalmente la reactividad de las aminas de partida, como también la disminución en la reactividad de las bromoacetonaftona de partida debido al anillo naftilo que deslocaliza la carga en mayor medida, únicamente se seleccionaron las aminas con las que se obtuvieron resultados positivos en la síntesis mencionada anteriormente (Tabla 3.4.1).

Tabla 3.5.1 Condiciones de reacción y resultados obtenidos para la síntesis de los nuevos derivados de 2-amino-4-naftil-1,3-tiazol

Referencia	X	% Rendimiento	Condiciones
55	Fenilpiperazina	3	CH ₃ CN, reflujo
56	Morfolina	12	CH ₃ CN, reflujo
57	Furfurilamina	18	CH ₃ CN, reflujo
58	4-Cl-bencilamina	7	CH ₃ CN, reflujo

En este caso se obtuvieron rendimientos muy bajos (Tabla 3.5.1), con tiempos de reacción que rondan las 12 h de calentamiento, debido a que luego de este tiempo no existe un aumento en el avance de la reacción.

Estos bajos rendimientos se pueden atribuir a la naturaleza de los reactivos de partida, principalmente a la bromoacetonaftona, la cual es menos reactiva que la bromoacetofenona y genera un intermediario menos electrofílico, lo que genera una disminución considerable en el rendimiento de la reacción si comparamos los rendimientos utilizando las mismas aminas, pero con la bromoacetofenona como reactivo de partida (Tabla 3.4.1 y 3.5.1).

3.6 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE FENILTIAZOLÉTER (SERIE D)

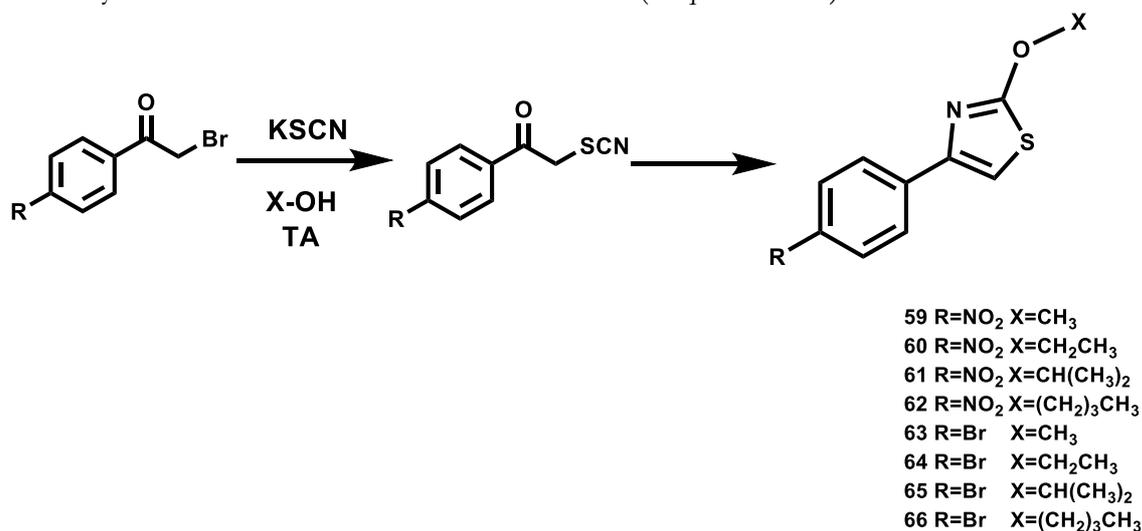
3.6.1 MATERIALES Y MÉTODOS PARTICULARES

Se disolvió el derivado de 2-bromoacetofenona seleccionada (0.5 mmol) en el alcohol correspondiente (0.16 mol) en presencia de KSCN (0.8 mmol). Se dejó agitando por 30 min a

temperatura ambiente hasta observar desaparición de la 2-bromoacetofena en la CCF. Posteriormente se calentó la mezcla de reacción a reflujo hasta observar desaparición del intermediario de reacción en la CCF. La mezcla de reacción se dejó llegar a temperatura ambiente, si se observaba precipitación del producto de interés se realizaba su filtración a vacío, si no había precipitación se procedía a realizar una extracción con AcOEt:Agua (3x10 ml). Antes de la extracción fue necesario destilar el alcohol a presión reducida para evitar emulsiones en la extracción. La capa orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro. Luego se realizó una purificación en columna utilizando sílicagel como fase estacionaria y una mezcla de Hex:AcOEt como fase móvil con las proporciones requeridas para una buena separación del producto de interés.

3.6.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-éter se obtuvieron por una síntesis en dos pasos. En el primer paso se forma un intermediario derivado de tiocianato, de forma análoga a la obtención de derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-amina, este intermediario se obtiene a partir de una sustitución nucleofílica del átomo de bromo de la bromoacetonaftona por el agrupamiento tiocianato. Una vez formado el intermediario no es necesaria la purificación del mismo, la mezcla de reacción se somete a calentamiento a reflujo para que se complete la reacción. Esto se debe a que en este caso el reactivo nucleofílico es un alcohol que además cumple el rol de disolvente de la reacción. El alcohol realiza un ataque nucleofílico sobre el tiocianato promoviendo la ciclación del anillo tiazólico y la formación del feniltiazoléter de interés (Esquema 3.6.1).



Esquema 3.6.1 Ruta de síntesis para la obtención de derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-éter

Tabla 3.6.1 Condiciones de reacción y resultados obtenidos para la síntesis de los nuevos derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-éteres

Referencia	R/X	% Rendimiento	Condiciones
59	NO ₂ /CH ₃	64	MeOH, reflujo
60	NO ₂ / CH ₂ CH ₃	34	EtOH, reflujo
61	NO ₂ / CHCH ₃ CH ₃	22	Isopropanol, reflujo
62	NO ₂ / CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	25	BuOH, reflujo
63	Br/CH ₃	18	MeOH, reflujo
64	Br/ CH ₂ CH ₃	11	EtOH, reflujo
65	Br/ CHCH ₃ CH ₃	7	Isopropanol, reflujo
66	Br/ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	3	BuOH, reflujo

En esta serie de compuestos, el cambio de sustituyente en posición *para* al anillo tiazólico generó cambios en los rendimientos de reacción. Como se evidencia en la Tabla 3.6.1 la presencia de un átomo de bromo en dicha posición genera una reducción importante en el. Esto puede deberse a que la presencia de un átomo de bromo presenta un efecto atrayente de electrones menor que el presentado por el agrupamiento nitro, lo que genera una disminución en la electrofilia del intermediario de la reacción.

Es importante destacar que se había propuesto la síntesis de compuestos que presentaran agrupamientos aromáticos como sustituyentes del tiazol, al igual que lo realizado en la síntesis de los derivados de 2-amino-4-feniltiazol. Se probó esta síntesis teniendo como reactivo al alcohol bencílico, que además de actuar como reactivo era el disolvente de la reacción y se encontraba en un gran exceso. Esta característica de la reacción no permitía seguir el desarrollo de la misma por CCF debido a que lo único que se lograba evidenciar era la presencia del alcohol en exceso. Por esta razón no se procedió con la obtención de estos derivados.

Se ha encontrado en bibliografía que una alternativa a esta metodología se basa en utilizar solventes iónicos que promueven el ataque nucleofílico por el alcohol bencílico⁸⁶. Si esta nueva alternativa a la reacción no diera resultados positivos, podría realizarse la reacción con alcohol bencílico como reactivo pero se incluiría su seguimiento mediante otra metodología, como por ejemplo, el método cromatográfico HPLC; para esto sería necesario determinar los tiempos de retención de los distintos reactivos utilizados para así identificar si se forma un nuevo producto.

4. ACTIVIDAD DE CASPASA-3 Y -7 Y ENSAYO PRELIMINAR DE INHIBICIÓN

4.1 GENERALIDADES

Cuando se busca conocer la capacidad inhibitoria de un nuevo compuesto en un blanco enzimático, es necesario contar con un método que permita medir la velocidad de la reacción catalizada por la enzima y tener ésta caracterizada al menos parcialmente. En esta Tesis se tiene como blanco enzimático principal a la enzima caspasa-3, debido a sus implicancias en la EA, antes mencionadas en la introducción. Por otra parte, como se pretende que la inhibición sea selectiva frente a caspasa-3 y teniendo en cuenta la amplia similitud dentro de la familia caspasa, se toma como blanco secundario a la enzima caspasa-7 por tener mayor similitud y homología con caspasa-3.

En esta sección se describen los procedimientos y resultados de las actividades llevadas a cabo con el fin de realizar los ensayos de actividad enzimática de caspasa-3 y -7. En primer lugar se explica cómo se obtuvieron las enzimas recombinantes caspasa-3 y -7; es importante destacar que esta actividad no forma parte de los objetivos de la presente Tesis y fue llevada a cabo por el grupo de la Dra. Ileana Corbo del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Moléculas Bioactivas del Polo de Desarrollo Universitario de Paysandú, gracias a la colaboración entre nuestros grupos de trabajo, en el marco de dos proyectos CSIC I+D de los cuales la Dra. Alicia Merlino fue responsable. Posteriormente se describe la estimación de la concentración de caspasa y la determinación de parámetros cinéticos (k_{cat} , K_m y V_{max}). A su vez se describen los ensayos de actividad de caspasa necesarios tanto para la caracterización de caspasa como para los ensayos de inhibición de la actividad.

4.2 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CASPASA-3 Y -7

4.2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1.1 OBTENCIÓN DE ENZIMAS RECOMBINANTES

Las caspasas -3 y -7 humanas se obtuvieron de forma recombinante. Para esto se utilizaron los plásmidos pET23b-casp3-His y pET23b-casp7-His, respectivamente, que fueron adquiridos comercialmente del repositorio Addgene (www.addgene.org). Para expresarlos, se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLys mediante el método de shock térmico. Se utilizó esta cepa debido a que tiene mínima expresión basal, dado que las caspasas son tóxicas para *E. coli*. Posteriormente se seleccionó una colonia para la expresión de estas enzimas mediante la inducción con IPTG. La

fracción soluble que contenía las enzimas se obtuvo mediante sonicado y centrifugación, luego se realizó la purificación mediante cromatografía de afinidad con níquel, en un equipo Akta Start (GE). Para la elución de las enzimas se realizó un gradiente de imidazol de 0 a 250 mM. Las fracciones de la purificación se analizaron midiendo absorbancia a 280 nm y realizando electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE. Mediante este procedimiento se obtuvo el zimógeno inactivo; luego de 4 h se obtuvo la enzima activa ya que las subunidades se autoprocenan y ensamblan espontáneamente. Las enzimas recombinantes se alicuotaron en el amortiguador de elución de la cromatografía y se almacenaron en freezer a -80 °C en presencia de imidazol⁸⁷.

4.2.1.2 ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

Para estimar la concentración de enzima en el stock obtenido de la producción recombinante de caspasa-3 y caspasa-7 se realizó un espectro de absorbancia en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, imidazol 200 mM. Aplicando la Ley de Lambert-Beer con el máximo de absorbancia a 280 nm y el valor del coeficiente de extinción molar de cada enzima (obtenido a partir de la secuencia primaria con el programa Expasy)⁸⁸ se obtuvo el valor de la concentración según:

$$Abs = C b \epsilon_{280} \qquad \text{Ecuación 1}$$

Donde C es la concentración, b es el paso óptico (1 cm) y ϵ_{280} el coeficiente de extinción molar de la enzima.

Es importante destacar que para el calcular el valor de ϵ_{280} para ambas enzimas no se tuvo en cuenta la cola de histidina debido a que su contribución a la absorbancia se considera despreciable.

4.2.1.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La velocidad inicial de la reacción catalizada enzimáticamente se determinó utilizando una solución amortiguadora de actividad constituida por pipes 20 mM, pH 7.2, chaps 0.1 %, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 10 % y DTT 10 mM⁸⁷. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos negras para medir fluorescencia, utilizando un volumen final de 200 μ L. Se incubó la enzima por 15 minutos a 37 °C en la solución amortiguadora para su activación (esto asegura la reducción de residuos de Cys esenciales para la actividad catalítica), a continuación también se realizó una incubación de una hora para igualar las condiciones a los ensayos en presencia de inhibidores. Posteriormente se agregó el sustrato de caspasa. El sustrato utilizado fue el péptido artificial fluorogénico N-acetil-L- α -aspartil-L- α -glutamil-L- α -valil-L- α -aspartil-7-amino-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC)⁸⁷, a una concentración final de 6.6 μ M, obtenida a partir de una dilución del

stock en DMSO a 3 mM. Se midió la aparición del producto de hidrólisis fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (AMC) ($\lambda_{\text{excitación}} = 380 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 440 \text{ nm}$) en función del tiempo, a 37 °C. Las determinaciones de fluorescencia se realizaron en un lector de placas Thermo Varioskan Flash ubicado en el Laboratorio de Fisicoquímica Biológica de la Facultad de Ciencias. Por tanto, la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente se determinó registrando la variación de emisión de fluorescencia a 440 nm en función del tiempo.

4.2.1.4 OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA ÓPTIMA DE TRABAJO

Se realizaron ensayos de actividad enzimática a distintas concentraciones de enzima. Se probaron las concentraciones 11, 21, 28, 32, 42 y 53 nM, manteniendo la concentración de sustrato fija en 6.6 μM . Este ensayo se realizó por triplicado para cada concentración de enzima

4.2.1.5 DETERMINACIÓN DE K_M Y V_{MAX}

El valor de los parámetros K_M y V_{max} se calculó evaluando la actividad de la enzima a distintas concentraciones de sustrato Ac-DEVD-AMC: 2.5; 5; 10; 25; 50 y 100 μM . Se realizó el ensayo de actividad de la misma manera que descrito anteriormente. A su vez se realizó una curva de calibración con el producto de la reacción enzimática catalizada por caspasa-3 y -7, la AMC, para calcular el valor de la velocidad de la reacción y así poder obtener los valores de K_M y V_{max} según la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 2). A su vez, a partir de la V_{max} se puede calcular el valor de k_{cat} , pues $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E_T]$.

4.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caspasa-3 y la caspasa-7 recombinante humana se expresaron en *E. coli* siguiendo el procedimiento explicado en materiales y métodos. Para corroborar la presencia de las enzimas luego de la producción recombinante se realizó electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Esto permitió conocer el peso molecular de lo obtenido en las fracciones de la columna de afinidad e identificar aquellas fracciones donde se obtuvieron pesos moleculares similares al correspondiente a las subunidades grandes y pequeñas de estas enzimas. En la Figura 4.2.1 se muestran los geles para las fracciones luego de la columna de afinidad de la producción de caspasa-3 recombinante (Figura 4.2.1 A) y de caspasa-7 recombinante (Figura 4.2.1 B). En el gel correspondiente a caspasa-3 (Figura 4.2.1 A) también se sembró la fracción soluble de proteínas de *E. coli* (**FS**) con la cual se cargó la columna de afinidad.

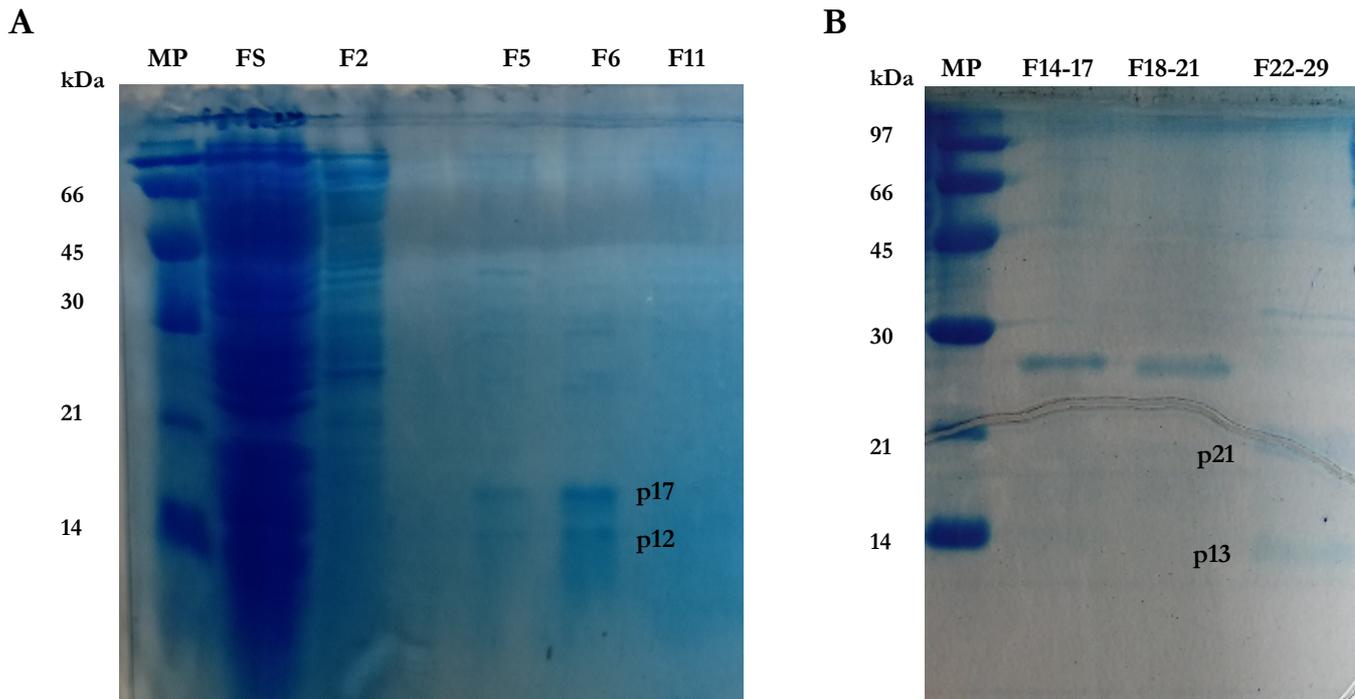


Figura 4.2.1 Geles de electroforesis SDS-PAGE de A) caspasa-3, **p17** corresponde a la cadena pesada y **p12** a la cadena liviana de caspasa-3, y B) caspasa-7, **p21** corresponde a la cadena pesada y **p13** a la cadena liviana de caspasa-7. **MP** (Marcador de peso molecular), **FS** (fracción soluble de proteínas de *E. coli* corresponde a la carga de la columna de afinidad) **FX** (donde X corresponde al número de fracción luego de realizada la columna de afinidad).

Mediante el gel de electroforesis SDS-PAGE se determinó la presencia de proteínas con el peso molecular esperado para las subunidades de caspasa-3 (Figura 4.2.1 A) y de caspasa-7 (Figura 4.2.1 B).

Luego de obtener las enzimas es necesario conocer la concentración de éstas para así saber la concentración a utilizar en el ensayo de actividad enzimática. En este caso se realizó un estimado de la concentración a partir de la absorbancia a 280 nm. Para esto se realizó un espectro de absorción UV-Vis de los preparados de caspasa. (Figura 4.2.2).

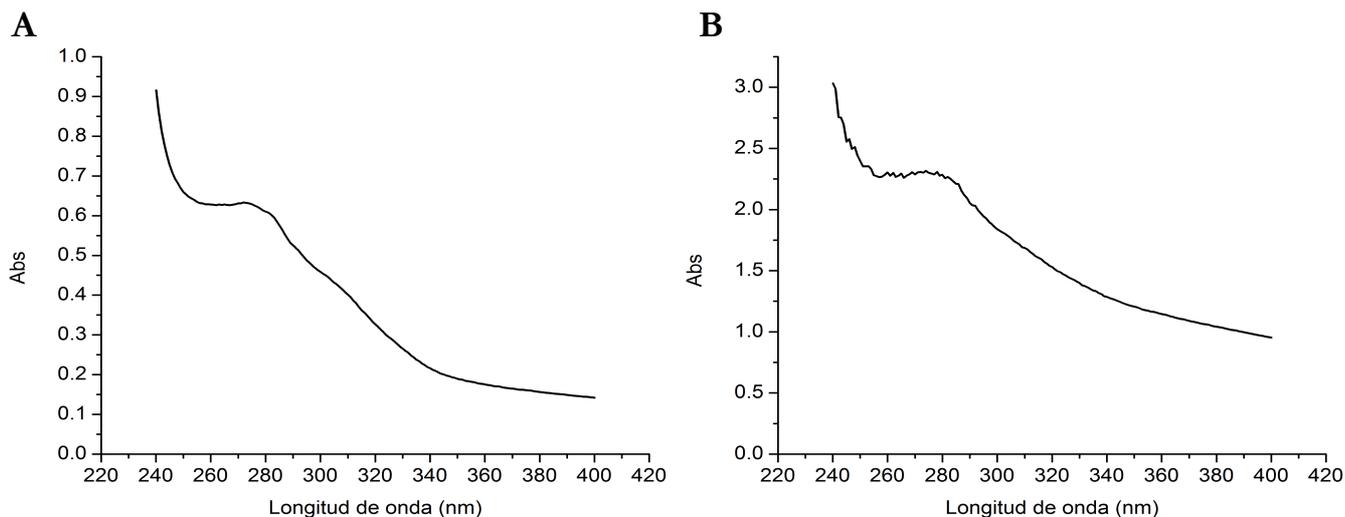


Figura 4.2.2 Espectros UV-Vis de A) caspasa-3, y B) caspasa-7. Los espectros se obtuvieron en el amortiguador de elución de la columna (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM y 200 mM imidazol) sin realizar diluciones de las enzimas.

La concentración del preparado de caspasa-3 ensayado fue de 12 μM ($\epsilon_{280} = 51800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mientras que caspasa-7 presentó una concentración de 47 μM ($\epsilon_{280} = 45840 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Estos valores son estimaciones, pues ambos preparados presentaron una contribución a la absorbancia a todas las longitudes de onda, que sugiere la presencia de agregados enzimáticos. No obstante, a fines de estimar la concentración, se asume que ambas caspasas se encuentran 100 % puras y activas. Es importante destacar que, debido al tipo de inhibidores en estudio, los cuales serían inhibidores competitivos clásicos, no es necesario conocer la concentración exacta de enzima, a fines de determinar el tipo de inhibidor e inhibición. Si fuese necesario calcular la concentración exacta de la enzima podría determinarse realizando su titulación con un inhibidor covalente de alta afinidad.

Corresponde mencionar también que, si bien en el caso de la caspasa-7 la absorbancia a 280 nm presentaba un valor mayor que 2, el equipo Cary 50 utilizado tiene muy buena óptica y permite en general medir absorbancias altas. Teniendo en cuenta además que el espectro tiene una forma similar al de la caspasa-3 y que se podían introducir variaciones en el estado de agregación en caso de realizarse diluciones, se optó por utilizar este espectro para estimar la concentración.

Adicionalmente, se evaluó cómo varía la velocidad inicial de la reacción catalizada por caspasa-3 al aumentar la concentración de enzima, para así determinar la concentración óptima a utilizar en el ensayo de inhibición enzimática. Se utilizó una concentración fija de sustrato específico, Ac-DEVD-AMC, igual 6.6 μM que, en principio, se encontraría por debajo de su K_m el cual sería 10

μM según la literatura⁸⁴. La elección de una concentración de sustrato menor que K_m se justifica por la utilización posterior del ensayo de actividad en la determinación de la actividad inhibitoria. De tener los inhibidores carácter competitivo, su efecto se detectaría mejor en condiciones de concentración de sustrato menor a K_m . Se evaluó la velocidad de la reacción a las siguientes concentraciones, 11, 21, 28, 32, 42 y 53 nM.

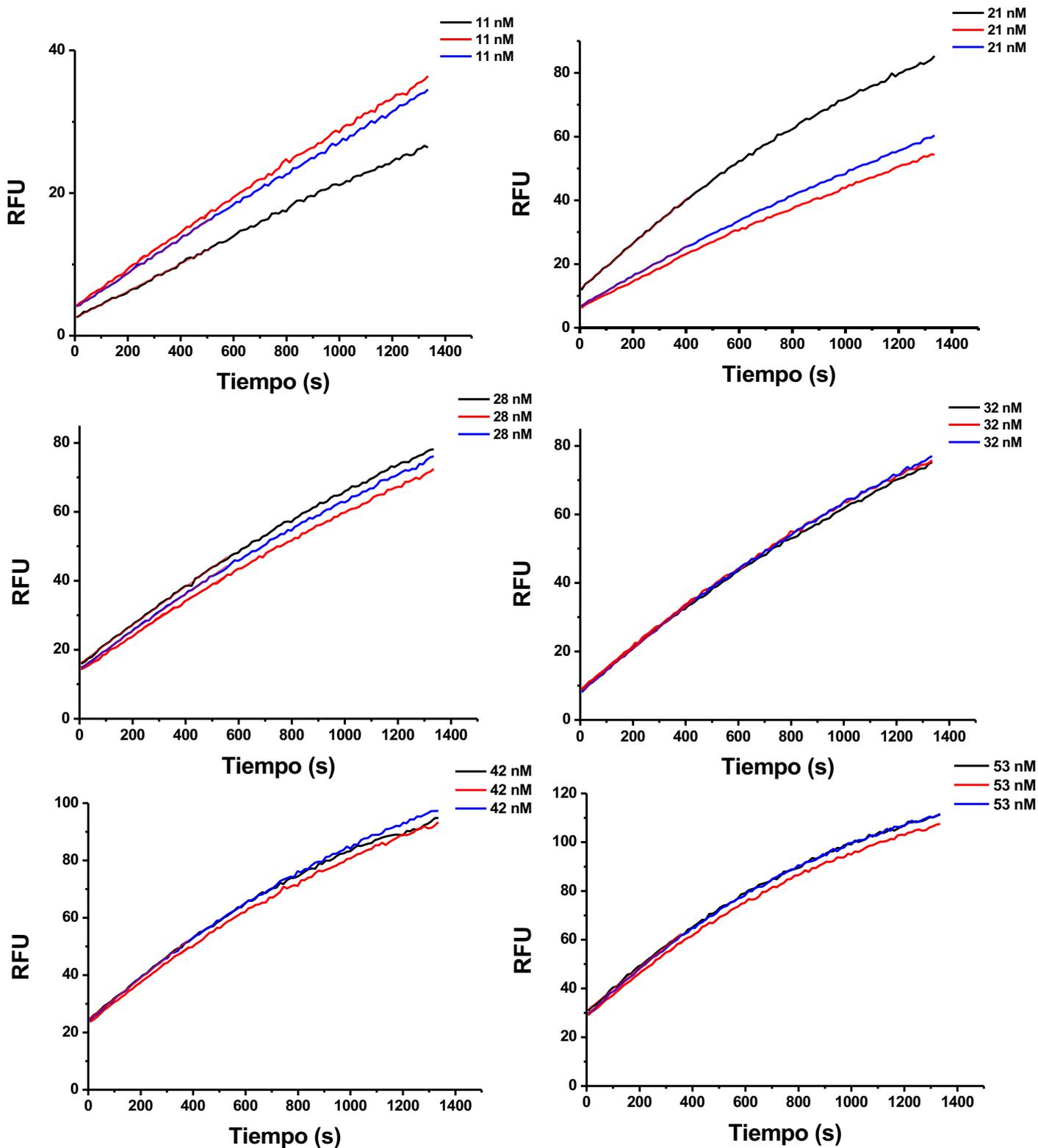


Figura 4.2.3 Cursos temporales de la actividad de caspasa-3 a distintas concentraciones de enzima (11, 21, 28, 32, 42 y 53 nM) y concentración fija (6.6 μ M) de sustrato Ac-DEVD-AMC. (RFU, del inglés Relative Fluorescence Units).

Como se muestra en la Figura 4.2.3 los cursos temporales con concentraciones de caspasa-3 mayores a 28 nM comienzan a curvarse a partir de 400 s, y el sistema deja de estar en condiciones de velocidad inicial. Debido a estos resultados se seleccionó una concentración de enzima igual a 28 nM para realizar los ensayos de inhibición de la actividad enzimática.

A partir de los valores de velocidad inicial obtenidos de los cursos temporales mostrados en la Figura 4.2.3, se realizó un gráfico de velocidad inicial en función de la concentración de enzima (Figura 4.2.4). Como es de esperar a partir de la ecuación de Michaelis y Menten, la velocidad inicial aumentó linealmente con la concentración de enzima. Además, se puede concluir que, en ausencia de enzima, la velocidad era prácticamente cero, lo cual pone en evidencia la ausencia de hidrólisis espontánea del sustrato.

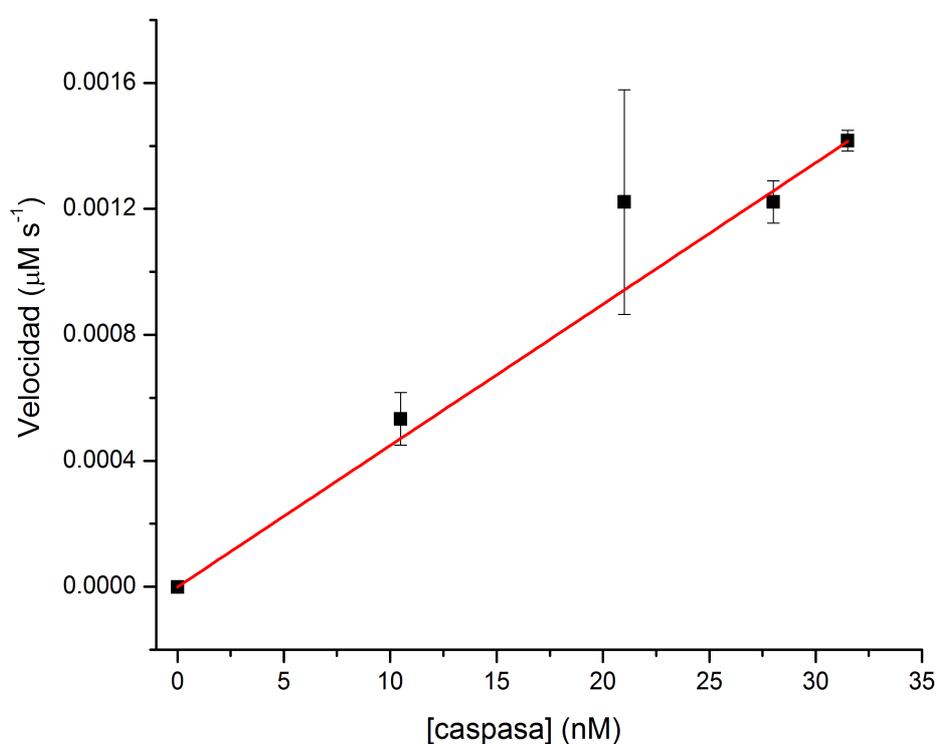


Figura 4.2.4 Gráfico de velocidad inicial en función de la concentración de caspasa-3. Los puntos corresponden al promedio de los triplicados realizados con su correspondiente desviación estándar.

Determinación de K_m y k_{cat}

La constante de Michaelis-Menten (K_m) está definida como la concentración de sustrato donde la velocidad de la enzima corresponde a la mitad de la velocidad máxima⁸⁹. Siempre es necesario conocer el valor de K_m cuando se comienza a trabajar con una nueva enzima. En este trabajo la importancia de calcular su valor radica en que se van a realizar ensayos de inhibición de la actividad enzimática por parte de inhibidores potencialmente competitivos. Si se trabaja a concentraciones

de sustrato superiores a la K_m no va a ser posible detectar si los compuestos son capaces de inhibir la actividad enzimática. Para determinar el valor de K_m es necesario realizar experimentos en los que se mide la velocidad en presencia de concentraciones crecientes de sustrato. Este tipo de experimentos permite también calcular la V_{max} , la cual se relaciona con la k_{cat} o número de recambio pues $V_{max} = k_{cat} [E]_T$.

Se realizó la determinación de K_m tanto para caspasa-3 como para caspasa-7. Para esto se determinó la velocidad catalizada enzimáticamente con distintas concentraciones del sustrato específico Ac-DEVD-AMC (2.5; 5.0; 10; 25; 50 y 100 μM), a una concentración fija de enzima de 28 nM. Para poder relacionar el valor de intensidad de fluorescencia con la concentración de producto formado y así determinar el valor de la velocidad, se realizó una curva de calibración con soluciones de AMC de concentración conocida. (Figura 4.2.6).

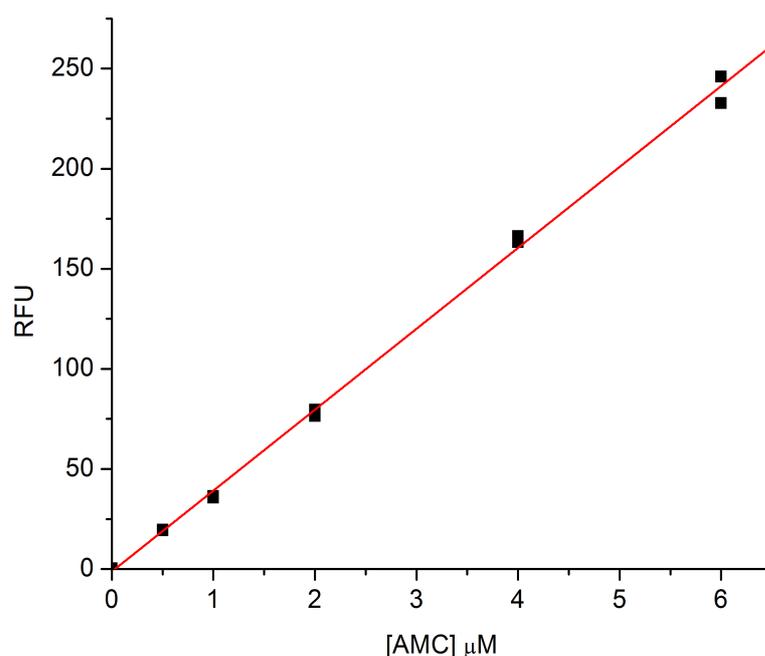


Figura 4.2.6 Curva de calibración con AMC. Se obtiene una ecuación de la recta igual a $\text{RFU} = 40.4 [\text{AMC}] - 1.28$. Se realizó en el mismo amortiguador que el utilizado en los ensayos de actividad. (**RFU**: del inglés Relative Fluorescence Units; **AMC**: 7-amino-4-metilcumarina).

A partir de la evaluación de la cinética a distintas concentraciones de sustrato y la curva de calibración de AMC, producto de la reacción, es posible determinar la velocidad de la enzima a cada concentración de sustrato (Figura 4.2.6).

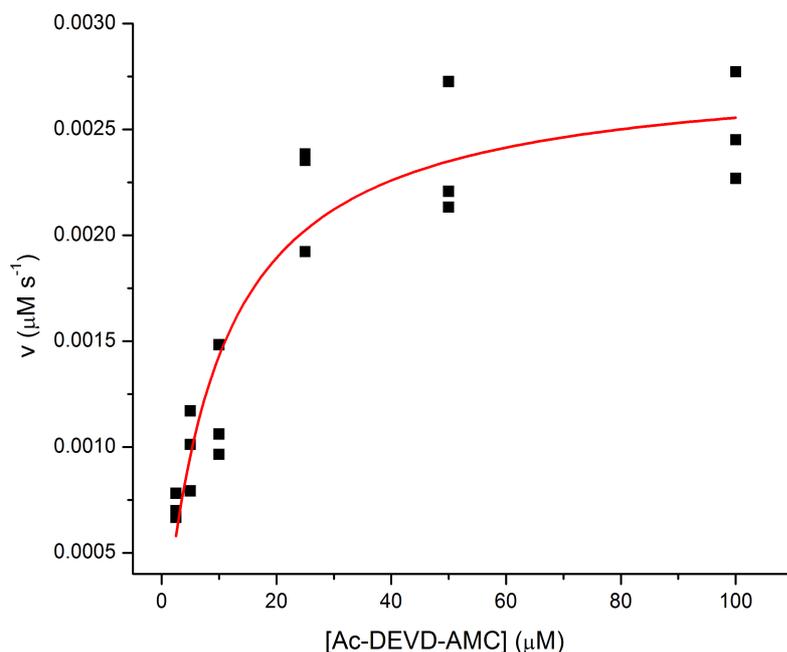


Figura 4.2.6 Gráfico de velocidad de producción de AMC en función de la concentración de sustrato de caspasa-3.

En la Figura 4.2.6 se muestra que la cinética de la enzima se ajusta a la cinética de Michaelis-Menten según la ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde K_m es la constante de Michaelis-Menten, V_{max} la velocidad máxima de la enzima y $[S]$ la concentración del sustrato. Del ajuste a esta ecuación con el programa Origin 8.5 se obtuvo un valor de K_m de $10 \pm 2 \mu\text{M}$ y de V_{max} de $0.0028 \pm 0.0002 \mu\text{M s}^{-1}$. Considerando que $V_{max} = k_{cat} [E]_T$ y que la concentración de enzima era 28 nM , se calculó un valor de k_{cat} igual a $0.100 \pm 0.007 \text{ s}^{-1}$.

Para confirmar los valores de K_m y V_{max} y verificar la ausencia de desviaciones a la cinética michaelianas, se realizó la linealización de Hanes-Woolf (Figura 4.2.7). A partir de la ecuación de la recta ($[Ac-DEVD-AMC]/v = 1/V_{max} [Ac-DEVD-AMC] + K_m/V_{max}$), es posible obtener el valor de los parámetros. Se obtuvo un valor de K_m igual a $6 \pm 4 \mu\text{M}$, una V_{max} de $0.0026 \pm 0.0009 \mu\text{M s}^{-1}$ y un valor para k_{cat} igual a $0.09 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$. Estos resultados son comparables a los obtenidos por el ajuste directo a la ecuación de Michaelis y Menten. Además, del hecho que el

gráfico sea lineal, se descarta la presencia de cooperatividad u otro tipo de desviaciones al comportamiento michaeliano.

Los valores de K_m y V_{max} obtenidos son comparables a los valores de literatura debido a que el valor reportado para K_m es de $10 \mu\text{M}$ mientras que para k_{cat} los valores varían, encontrándose valores de 0.75 a 9.1 s^{-1} en bibliografía^{90,91,92}. Una razón de las diferencias en k_{cat} puede radicar en la estimación de la concentración de enzima, que en nuestro caso se basó en una medida de absorbancia a 280 nm , mientras que en los casos reportados no se especificó el método de medida.

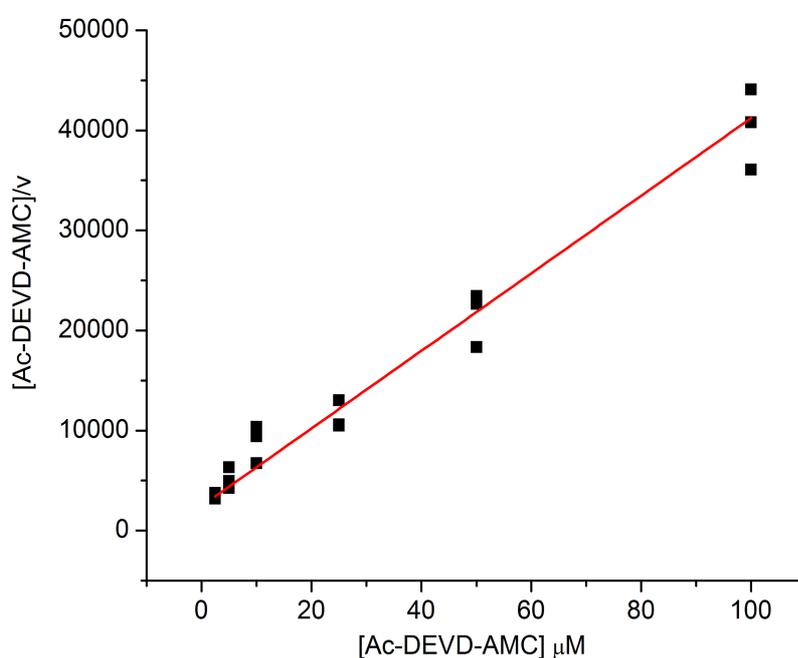


Figura 4.2.7 Gráfico de Hanes-Woolf para calcular el valor de K_m . Se obtuvo una ecuación de la recta igual a $[\text{Ac-DEVD-AMC}]/v = 388 [\text{Ac-DEVD-AMC}] + 2443$

Se realizó el mismo análisis para el cálculo de los parámetros cinéticos de la enzima caspasa-7, utilizando los mismos valores de concentración de sustrato y la misma solución amortiguadora (Figura 4.2.8).

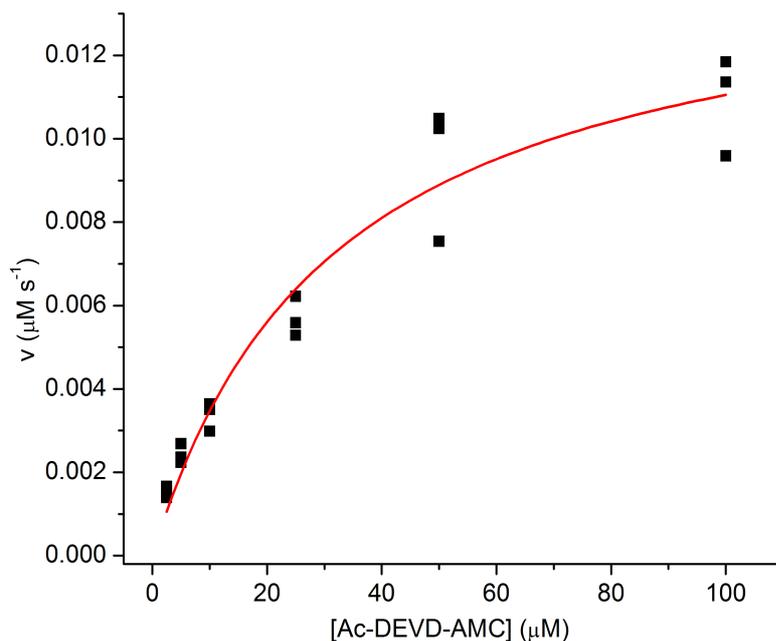


Figura 4.2.8 Gráfico de velocidad de producción de AMC en función de la concentración de sustrato de caspasa-7.

A partir del ajuste a la mejor hipérbola se obtienen los valores de K_m y V_{max} para caspasa-7. Los valores para K_m y para V_{max} a partir del ajuste fueron $32 \pm 6 \mu\text{M}$ y $0.015 \pm 0.001 \mu\text{M s}^{-1}$, respectivamente. En este caso también se utilizó una concentración de enzima igual a 28 nM, por tanto, el valor de k_{cat} fue igual a $0.530 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$.

También se realizó el gráfico de Hanes–Woolf (Figura 4.2.9) para el cálculo de K_m , $31 \pm 9 \mu\text{M}$, y V_{max} , $0.014 \pm 0.002 \mu\text{M s}^{-1}$. A su vez el valor de k_{cat} fue igual a $0.50 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$.

Los valores obtenidos para K_m y k_{cat} con ambos ajustes pueden ser comparados con los valores reportados que presentan valores de $K_m = 15 \mu\text{M}$ y $k_{cat} = 5.5 \text{ s}^{-1}$ ⁹³.

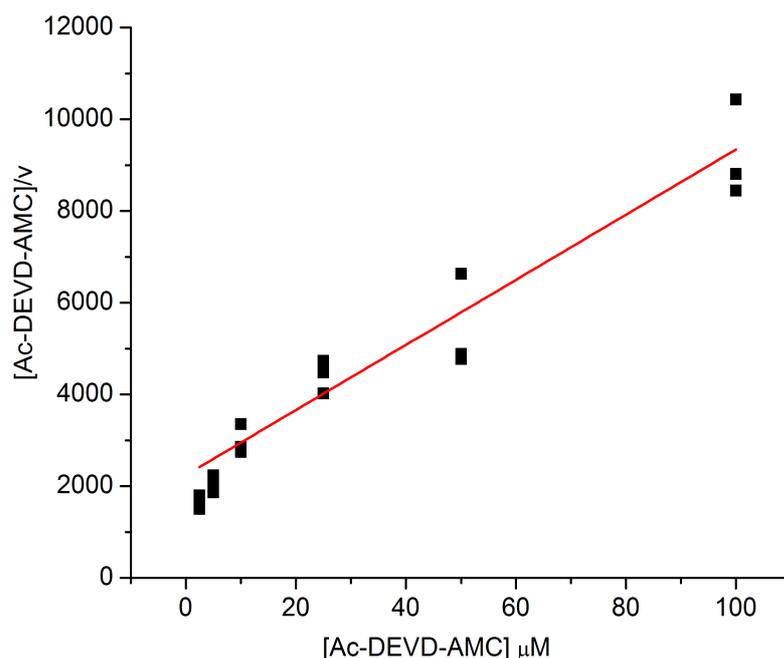


Figura 4.2.9 Gráfico de Hanes-Woolf para calcular el valor de Km. Se obtuvo una ecuación de la recta igual a $([Ac-DEVD-AMC])/v = 71 [Ac-DEVD-AMC] + 2238$

4.3 ENSAYO PRELIMINAR DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA

4.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos preliminares de inhibición a una concentración de derivado de 100 μM se realizaron en microplacas de 96 pocillos negras para medir fluorescencia. Se incubó la enzima (28 nM) en la solución amortiguadora para medir actividad (pipes 20 mM pH 7.2, chaps 0.1 %, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 10 % y DTT 10 mM) por 15 minutos a 37 °C, para activar la enzima. Como se explicó anteriormente esta etapa es necesaria para la reducción de los residuos de Cys que aseguran la actividad de la enzima. Posteriormente se agregaron los derivados y se dejó incubando a 37 °C por 1 h. Luego de la incubación se agregó el sustrato de caspasa-3 y -7 fluorogénico Ac-DEVD-AMC y se realizaron las mediciones de fluorescencia como descrito en la sección previa. A partir de los cursos temporales se determinaron las pendientes iniciales y se obtuvieron los porcentajes de inhibición de acuerdo con la ecuación 3, donde $pINH$ es la pendiente del gráfico RFU vs tiempo del ensayo en presencia de inhibidor y $pCASP$ es la pendiente en ausencia de inhibidor.

$$\%inh = 100 - \frac{pINH}{pCASP} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

El error se estimó como:

$$error = \frac{std\ pINH}{pCASP} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde std pINH es la desviación estándar del pINH

La cantidad final de DMSO en el ensayo, proveniente de las soluciones de los derivados y del sustrato de caspasa-3, era del 1 % y era siempre así en todas las determinaciones.

En este ensayo se incluyeron dos controles, uno donde sólo se adicionó la enzima, DMSO y sustrato, y se omitieron los posibles inhibidores, y otro control positivo de actividad inhibitoria donde se incluyeron además de la enzima, DMSO y sustrato, el inhibidor covalente selectivo de caspasa-3 y -7 N-acetil-L- α -aspartil-L- α -glutamil-L- α -valil-L- α -aspartil-7-aldehído (Ac-DEVD-Cho).

4.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como primera aproximación a la posibilidad de inhibición de los compuestos propuestos se estimó el potencial inhibitorio de éstos a una concentración fija de 100 μ M.

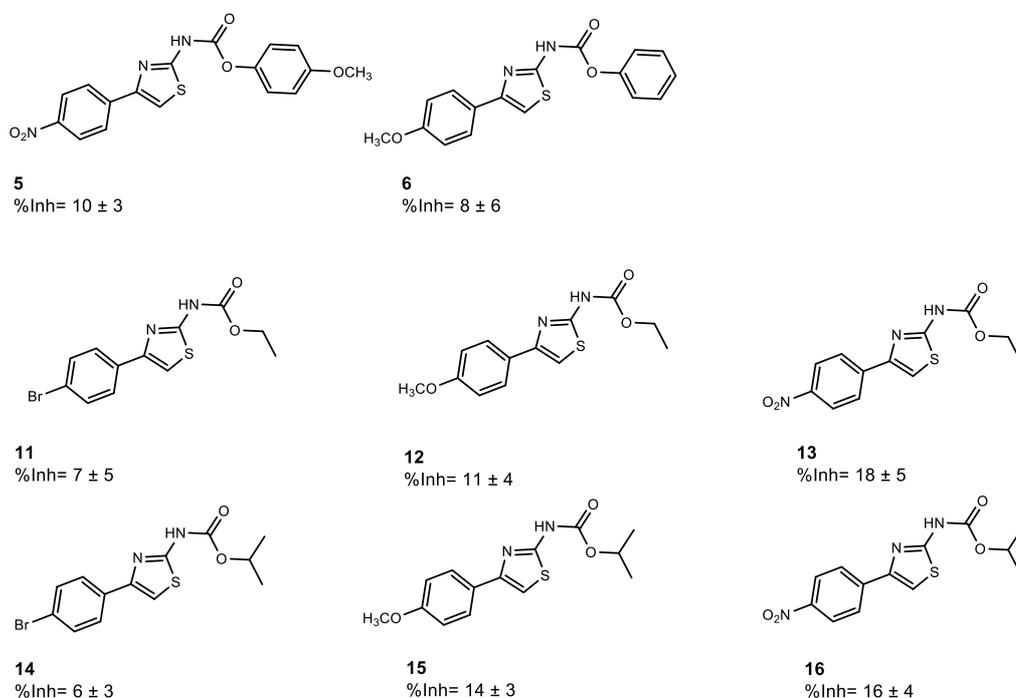


Figura 4.3.1 Valores preliminares de inhibición de la actividad de caspasa-3 de los derivados 4-fenil-1,3-tiazol-2-carbamatos obtenidos. Los porcentajes de inhibición se obtuvieron del ensayo por triplicado y se calcularon según se indica en materiales y métodos.

Al igual que al evaluar la actividad de caspasa-3 a distintas concentraciones de enzima y sustrato, en el ensayo fue necesaria una etapa de activación de la enzima en la solución amortiguadora de actividad por 15 minutos a 37 °C. Posteriormente se agregaron los derivados a evaluar y se incubaron con la enzima por 1 h a 37 °C. Una vez transcurrido el periodo de incubación se agregó el sustrato Ac-DEVD-AMC y se midió el curso temporal de la emisión de fluorescencia a 440 nm.

Como se observa en la Figura 4.3.1, ninguno de los derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-carbamato obtenidos fueron capaces de inhibir de forma considerable la actividad de caspasa-3 en los ensayos preliminares.

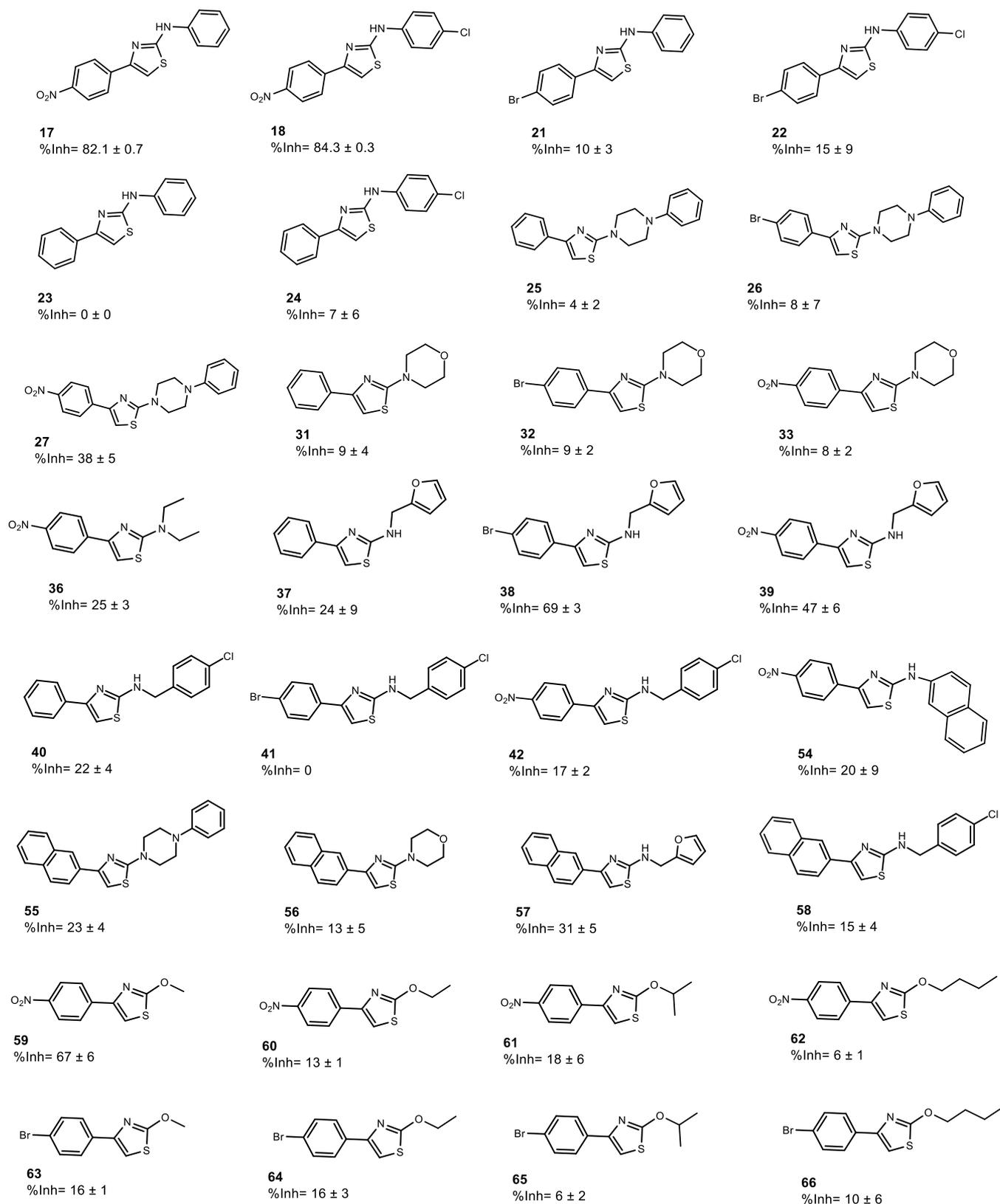


Figura 4.3.2 Valores preliminares de inhibición de la actividad de caspasa-3 de los compuestos obtenidos. Los porcentajes de inhibición se obtuvieron del ensayo por triplicado y se calcularon según se indica en materiales y métodos.

Respecto a los derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol y 4-fenil-1,3-tiazol-2-éter, se obtuvieron cuatro compuestos promisorios como posibles inhibidores de la actividad de caspasa-3 (Figura 4.3.2). Los compuestos **17**, **18**, **38** y **59** presentaron porcentajes de inhibición a concentraciones de 100 μ M superiores al 50 %. En base a estos resultados se siguió con dichos compuestos en los análisis preclínicos planteados.

La evaluación de la inhibición de caspasa por parte de estos compuestos se vuelve a abordar en el Capítulo 8, donde en el contexto del estudio de los posibles mecanismos de inhibición de los compuestos seleccionados, se vuelve a examinar la actividad inhibitoria. También se analiza la posible interferencia en la fluorescencia de los compuestos que presentaron mejores perfiles inhibitorios en el presente capítulo, así como la posible variabilidad en los resultados debido a problemas de solubilidad.

5. EVALUACIÓN PRECLÍNICA

En la búsqueda de nuevas moléculas como posibles fármacos, no sólo es importante que la molécula sea activa en el blanco terapéutico seleccionado, sino que también es de crucial importancia que presente buena biodisponibilidad en el organismo, lo que implica que llegue al sitio de acción, donde se encuentra su blanco terapéutico, en su forma activa, para poder cumplir su rol. Asimismo la mutagénesis y genotoxicidad de las nuevas moléculas es un factor determinante para el desarrollo de nuevos fármacos, debido a que una molécula puede ser activa y tener una buena biodisponibilidad pero si presenta una toxicidad elevada, no será eficaz como fármaco y no se seguirá trabajando en su desarrollo⁹⁴.

Con el afán de reducir el uso de animales en las evaluaciones preclínicas se han desarrollado diversas técnicas *in vitro* que permiten obtener datos relevantes antes de realizar ensayos *in vivo*. Con las técnicas *in vitro* es posible descartar compuestos que podrían ser tóxicos o no efectivos en el momento de evaluarlos en un organismo vivo. Existen una diversidad de ensayos *in vitro* que permiten determinar si existe metabolización de las moléculas por enzimas hepáticas, si los compuestos son mutagénicos, o si son capaces de traspasar barreras, como la barrera hematoencefálica (BHE) y la piel, entre otros.

En base a lo anterior, en la presente Tesis se realizó una evaluación preclínica de los compuestos seleccionados con valores de porcentaje de inhibición preliminares cercanos al 40 % (**17**, **18**, **27**, **38**, **39** y **59**) en caspasa-3. También se evaluó el comportamiento del compuesto **37** que presentó un porcentaje de inhibición preliminar superior a 20 % para comparar los resultados con los de sus análogos **38** y **39**. Con esta evaluación se espera establecer si los compuestos cumplen con ciertos requisitos para continuar con una eventual evaluación *in vivo*. Se pretende determinar si los compuestos generan metabolitos *in vitro*, si son potencialmente capaces de cruzar la BHE y así llegar al sitio de interacción con su blanco terapéutico, y por último conocer si los compuestos son mutagénicos utilizando cepas de *Salmonella typhimurim* modificada genéticamente. Una vez concluidos estos ensayos, se conocería un poco más de la biodisponibilidad y toxicidad de los compuestos seleccionados, lo que permitiría determinar si son candidatos para posteriores ensayos *in vivo*.

5.1 EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD EN LÍNEA CELULAR HT22

5.1.1 GENERALIDADES

Para determinar la viabilidad de los compuestos diseñados como posibles fármacos es necesario determinar la seguridad de estos para ser utilizados en un ser vivo. En esta Tesis de Doctorado en primera instancia se estudió la citotoxicidad de estos en una línea celular, específicamente la línea celular de hipocampo de ratón (HT22), seleccionada debido a la locación del blanco terapéutico seleccionado.

Para determinar la citotoxicidad de un compuesto pueden realizarse diversos ensayos donde se determine la supervivencia o proliferación de células mamíferas. Entre estos métodos se encuentran: conteo de células que incluyen o excluyen a un pigmento; medidas de la liberación de proteína marcada con ^{51}Cr luego de la lisis celular; y medidas de la incorporación de nucleótidos radiactivos durante la proliferación celular. El análisis de este tipo de ensayos requiere de conteo de células o medidas que requieren de mucho tiempo de análisis ⁹⁵.

Debido a las dificultades de los métodos antes mencionados, en esta Tesis se realizó un ensayo colorimétrico utilizando la sal de tetrazolio bromuro de 3-(4,5-dimetiltizol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Mediante este ensayo es posible detectar únicamente células viables. Se lleva a cabo en una microplaca de 96 pocillos, lo que permite una fácil lectura de los resultados utilizando un lector espectrofotométrico de placas para escaneo de múltiples muestras, sin la necesidad de contar las células. Está definido como un método versátil y cuantitativo ⁹⁵. El principio de este ensayo se basa en que la mayoría de las células viables presentan una actividad metabólica constante y por tanto un incremento o una disminución en el número de células viables se encuentra relacionado linealmente con la actividad reductasa celular. Ésta se mide mediante la reducción de MTT a cristales de formazán de color violeta (Figura 5.1.1), los cuales posteriormente son solubilizados mediante solventes orgánicos como MeOH, isopropanol o DMSO, para una medida homogénea a 570 nm ⁹⁶.

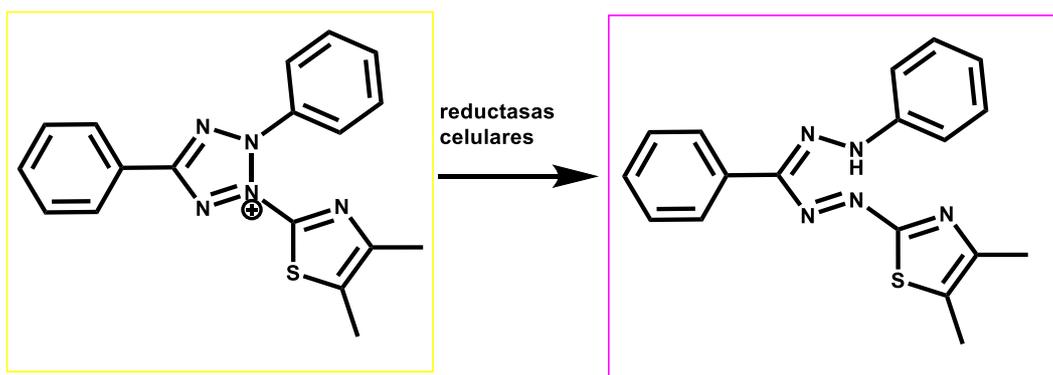


Figura 5.1.1. Reacción catalizada por las reductasas celulares donde se pasa del MTT de color amarillo a los cristales de formazán de color violeta.

Es importante destacar que el uso de esta metodología debe encontrarse puesto a punto para la línea celular en la cual se pretende evaluar la citotoxicidad de los compuestos. En este sentido, existe vasta experiencia en el uso de esta metodología en la línea celular HT22^{97,98}.

Con este ensayo es posible determinar la citotoxicidad en la línea celular HT22 para los compuestos evaluados y así determinar si es posible continuar con la evaluación preclínica de los derivados.

5.1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Este ensayo fue realizado en el Laboratorio de Epigenética e Inestabilidad Genómica del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable bajo la supervisión de la Dra. Paola Hernández.

Se sembraron células de la línea celular de hipocampo de ratón (HT22) en microplacas de 96 pocillos (5.000 células/pocillo) en un volumen final de 100 μ L de medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Las células se incubaron por 24 h en una atmósfera húmeda de 5 % CO₂/95 % aire, a 37 °C. Luego de este período las células estaban con un 80 % de confluencia aproximadamente y se expusieron a los compuestos a evaluar (25–400 μ M). Los compuestos se prepararon en DMSO y se disolvieron en medio de cultivo para lograr en placa una concentración de DMSO menor o igual al 1 %. Antes de agregar a la microplaca las diluciones correspondientes de los compuestos, se quitó el medio de cultivo, se adicionó el compuesto en un volumen final de 200 μ L y se incubó por 48 h. Pasado ese tiempo, las células se lavaron con amortiguador fosfato salino (PBS) estéril y se incubaron en iguales condiciones por 4 h en presencia de MTT a 0.5 mg/mL. Posteriormente se retiró el medio de cultivo con MTT, se solubilizaron los cristales de formazán obtenidos con una solución de DMSO:isopropanol (1:1) y se midió la absorbancia a 570 nm.

En este ensayo se incluyó un blanco que sólo presentaba medio de cultivo, así como un control de viabilidad celular que presentaba medio de cultivo, células y DMSO. No se incluyó un blanco que sólo presentara compuesto debido a que los lavados incluidos en el procedimiento promoverían la eliminación de los compuestos. Tampoco se incluyó un control positivo de citotoxicidad debido a que en este ensayo se buscaba calcular el % de viabilidad, para lo cual, si bien sería deseable, no es necesario contar con este tipo de control.

Los experimentos se realizaron por triplicado para cada concentración evaluada. Se hicieron al menos dos experimentos independientes.

Para realizar esta determinación se evalúa la viabilidad celular a distintas concentraciones de compuesto respecto al control de viabilidad celular. También se tiene en cuenta para este cálculo el blanco del ensayo que sólo presentaba medio de cultivo. La misma se determina como porcentaje de viabilidad (% viabilidad) que se calcula como:

$$\% \textit{Viabilidad} = \frac{Abs_{570} \textit{ muestra} - Abs_{570} \textit{ blanco}}{Abs_{570} \textit{ control} - Abs_{570} \textit{ blanco}} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Una vez que se obtienen los valores de % viabilidad para las distintas concentraciones de compuesto, es posible determinar el valor de IC₅₀ para el mismo. El valor de IC₅₀ fue calculado por el programa *GraphPad Prism* como la concentración requerida para bajar la curva al punto medio entre el tope y la base de la sigmoide. Se utilizó una ecuación sigmoidea para ajustar los datos de % viabilidad en función del Log (concentración)^a. Este valor de IC₅₀ se conoce como relativo debido a que no corresponde con el 50 % en el eje de las Y.

^a % Viabilidad = fondo + (tope – fondo) / (1 + 10 ((Log(concentración) – Log IC₅₀))

5.1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este ensayo fue realizado para aquellos compuestos que en primera instancia generaron inhibición de la actividad de caspasa-3 a concentraciones de 100 μM de compuesto, tomándose como punto de corte inhibiciones mayores al 20 %. Se seleccionaron los compuestos: **17, 18, 27, 37, 38, 39, 55, 57, 59, 62** (Figura 5.1.2).

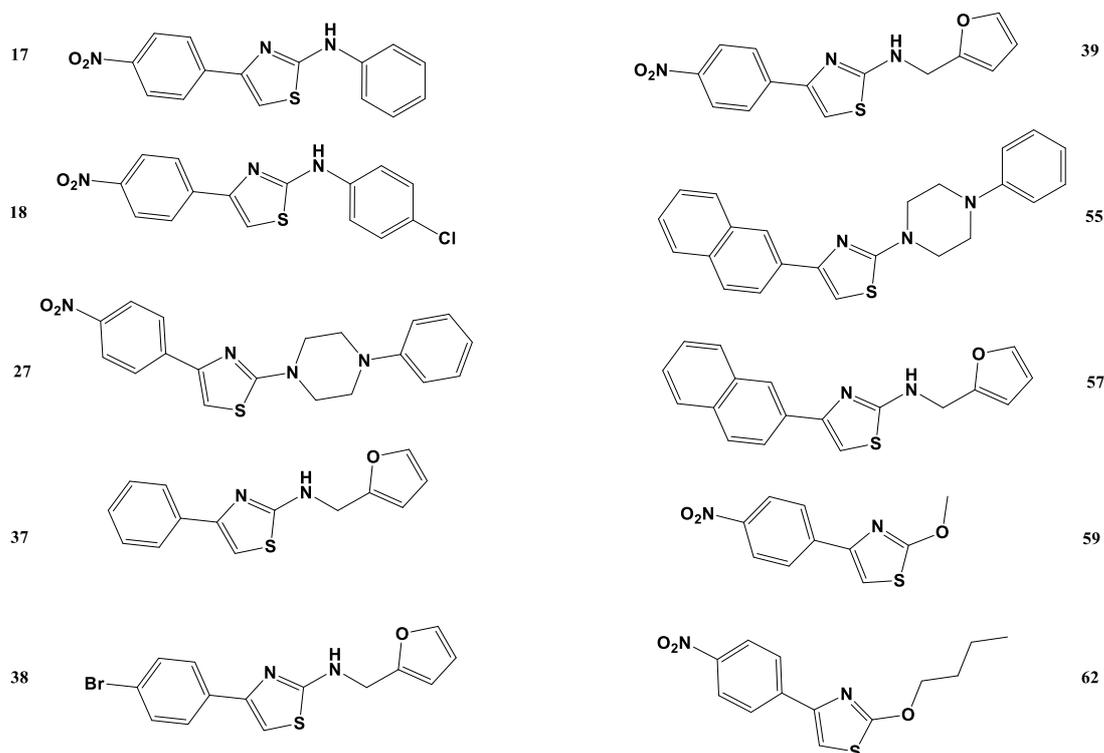
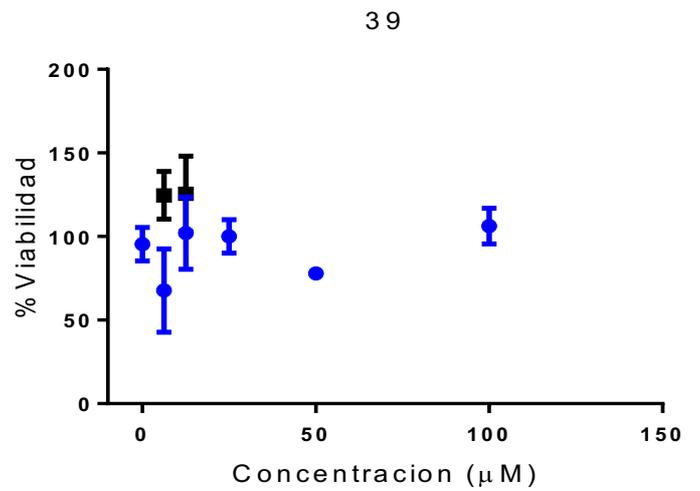
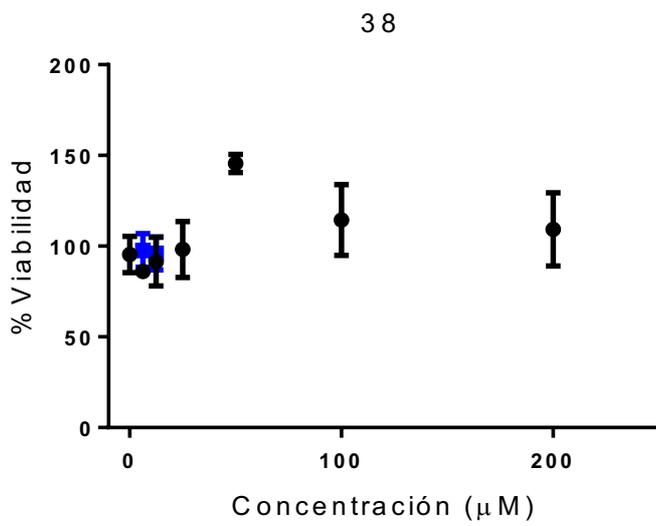
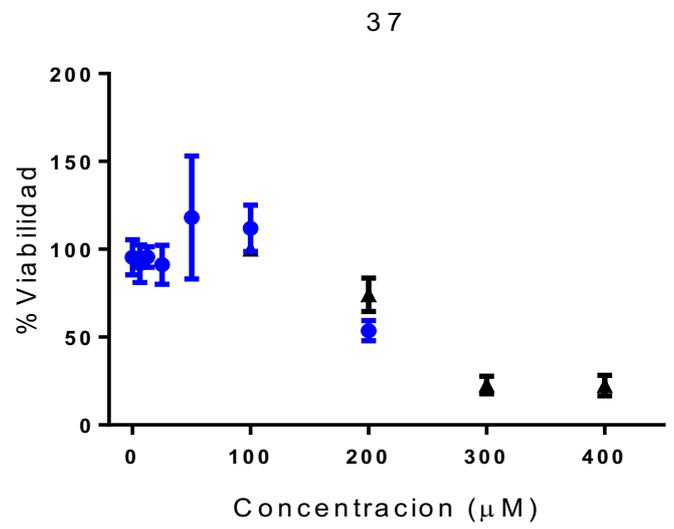
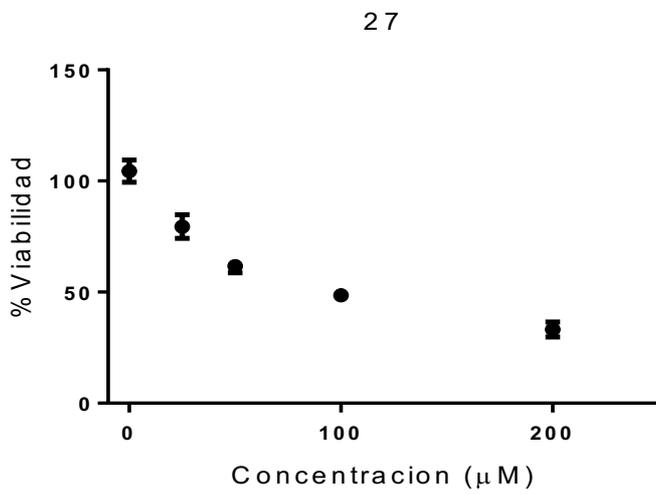
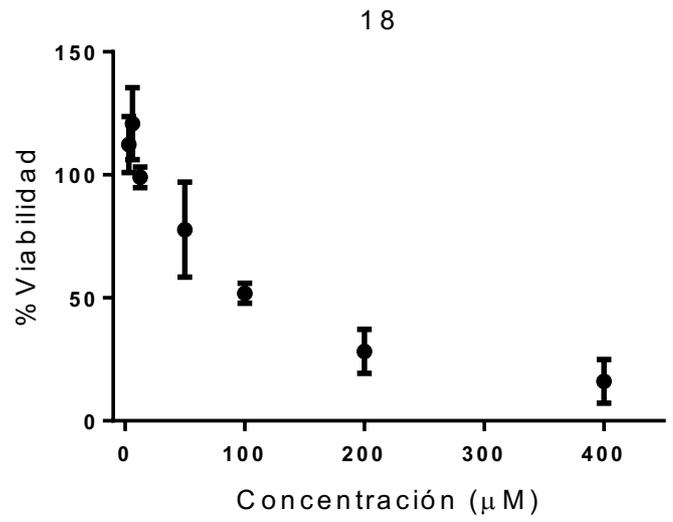
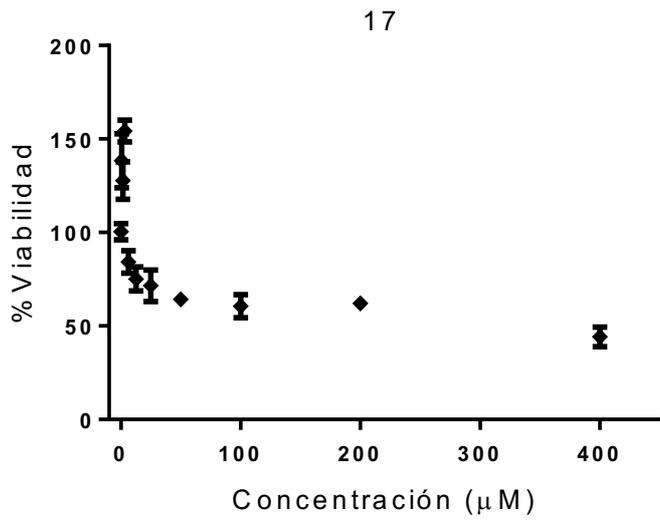


Figura 5.1.2 Estructura de los compuestos evaluados en la línea celular HT22

En la Figura 5.1.3 se muestran los valores de porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración de los compuestos. Las concentraciones evaluadas variaron según el comportamiento de los compuestos ya sea por la formación de precipitados a altas concentraciones o por su citotoxicidad.



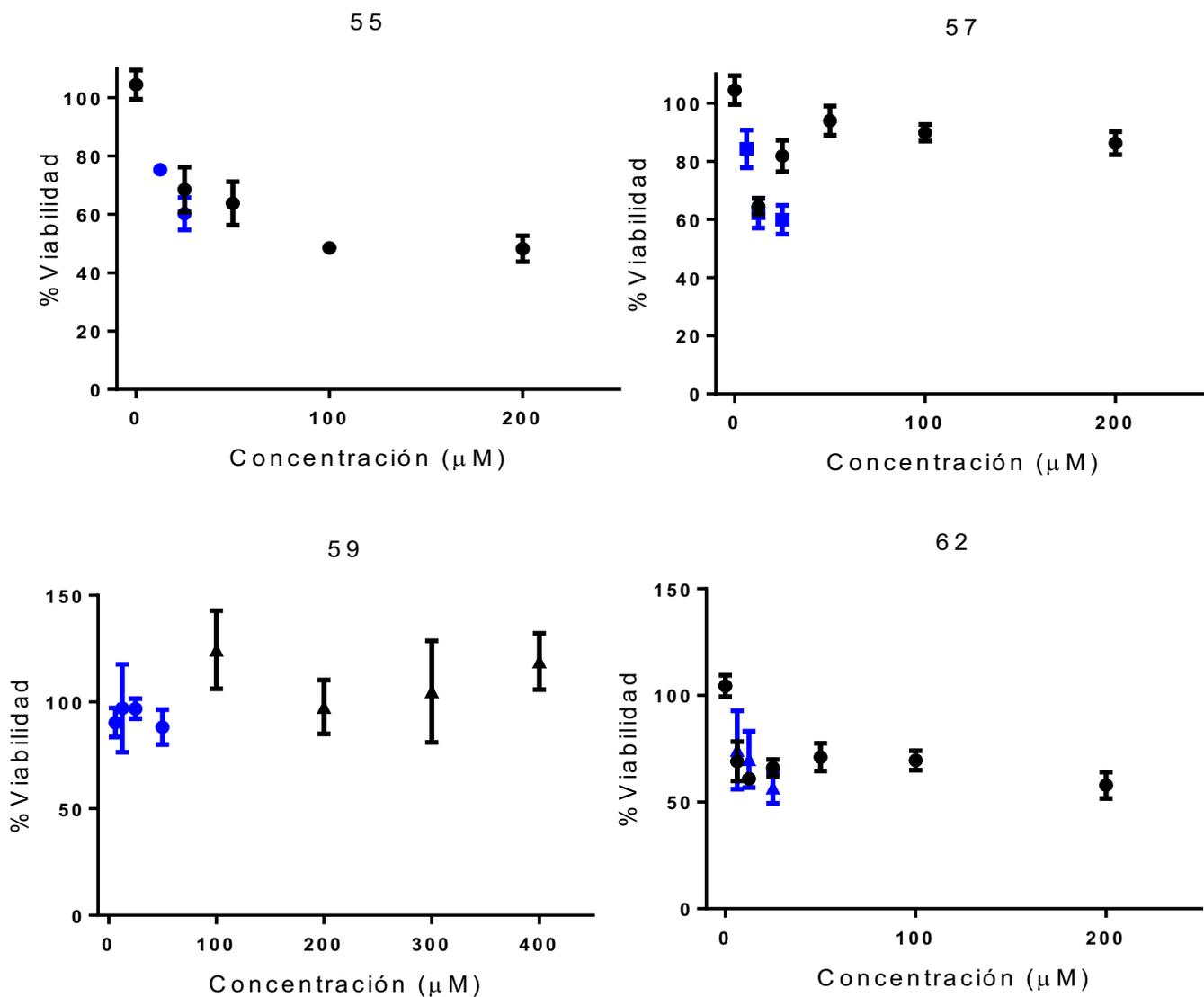


Figura 5.1.3. Porcentaje de viabilidad en función de la concentración de compuesto en la línea celular HT22. Los valores corresponden al promedio del % viabilidad y las barras a la desviación estándar de los triplicados. Los puntos con distintos colores corresponden a experimentos independientes. Los % viabilidad obtenidos superiores al 100 % se deben a la variabilidad en la cantidad de células depositadas en los pocillos.

Únicamente para los compuestos **17**, **18** y **27** fue posible determinar el valor de IC_{50} a partir del ajuste de los datos de % viabilidad vs. Log concentración, siendo 6, 91 y 53 μM , respectivamente. Para el resto de los compuestos, a pesar de utilizar un amplio rango de concentraciones de compuesto, no fue posible determinar el valor de IC_{50} debido a que no mostraron disminuir la viabilidad celular al aumentar su concentración en el rango estudiado. No obstante, se ensayó si estos compuestos resultaban citotóxicos para la línea HT22 a una concentración de 100 μM . Para los compuestos **37**, **38**, **39**, y **59** se observó que no generaron una disminución en la viabilidad

celular a 100 μM de compuesto, mientras que los compuestos **55**, **57** y **62** sí generaron una reducción a 100 μM del compuesto de 50, 90 y 70 %, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, de los compuestos que presentaron mayor porcentaje de inhibición de la actividad de caspasa-3 en los ensayos preliminares, **17**, **18**, **38** y **59**, el compuesto **17** sería el más citotóxico para esta línea celular, mientras que el compuesto **18** también presentaría citotoxicidad a 100 μM . Para el resto de los compuestos seleccionados, estos resultados indicarían que la concentración utilizada en los ensayos de inhibición preliminares a 100 μM corresponderían a una dosis subtóxica para la línea celular ensayada.

5.2 METABOLIZACIÓN

5.2.1 GENERALIDADES

Una vez que los fármacos ingresan al organismo, pueden ser metabolizados convirtiéndolos en nuevas moléculas, las cuales pueden presentar características diferentes a las observadas en sus compuestos de partida. Entre estas características se encuentra la actividad frente al blanco terapéutico del fármaco y la toxicidad de su metabolito, lo que determina parte de su farmacocinética. Por esto es de importancia conocer el perfil metabólico de los compuestos seleccionados antes de realizar ensayos *in vivo* con organismos vivos.

El metabolismo de fármacos es uno de los problemas más importantes que enfrenta la farmacocinética, teniendo una gran influencia en las biotransformaciones sufridas por los fármacos. Estos pueden ser transformados a metabolitos solubles para lograr una buena eliminación o pueden generar metabolitos tóxicos⁹⁹. Generalmente el metabolismo de fármacos se basa en reacciones de fase I, donde moléculas no polares son convertidas en compuestos polares, y reacciones de fase II, de conjugación, donde ciertos agrupamientos son incorporados en la molécula, como ácido glucurónico, sulfato, glicina, glutatión, entre otros. Estas biotransformaciones promueven la eliminación de las moléculas del organismo y ocurren en varios órganos, siendo el hígado el órgano más relevante⁹⁴.

Existen variados modelos *in vitro* con los cuales es posible determinar el perfil metabólico de los compuestos antes de realizar los ensayos *in vivo*. Entre éstos se encuentra el uso de cortes de órganos, cultivos celulares 3D, cultivos celulares, líneas celulares y el uso de fracciones subcelulares⁹⁹. Se ha observado que el uso de métodos de evaluación *in vitro* que incluyen sistemas experimentales derivados de hígado representa una aproximación efectiva para estimar el destino metabólico de los fármacos *in vivo*. En las últimas décadas se han desarrollado diversos modelos *in vitro* que simulan las reacciones que se llevan a cabo en el hígado⁹⁴.

Entre los diversos modelos existentes,⁹⁴ en la presente Tesis se utilizó el método basado en las posibles transformaciones metabólicas que se llevan a cabo en fracciones subcelulares de hígado. Por tanto, al someter a compuestos orgánicos a estas fracciones, se podrían obtener nuevas entidades si se llevan a cabo transformaciones metabólicas de éstos, o recuperarlos intactos si no fueran metabolizados por la fracción. En este caso se utilizó la fracción subcelular S9, con la cual se espera determinar si los compuestos evaluados son metabolizados por las enzimas del hígado. Esta fracción se obtiene a partir de una centrifugación a 9000 g de un homogenizado de hígado, correspondiéndose con el sobrenadante obtenido. La fracción subcelular de hígado S9 comprende tanto la fracción citosólica como la microsomal de la célula. Contiene gran parte de las enzimas encargadas del metabolismo de fármacos, debido a que incorpora enzimas de fase I (mayoritarias en el retículo endoplásmico) y de fase II (mayoritarias en el citosol) permitiendo lograr un perfil metabólico de fármacos bastante completo. Además, es fácil de llevar a cabo y no presenta un alto costo. Requiere la adición de cofactores para el correcto funcionamiento de las enzimas, como la inclusión de NADPH, y presenta una actividad enzimática baja^{94,100,101}.

7.2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.2.1 OBTENCIÓN DE FRACCIÓN S9

A partir de un hígado fresco de rata (Sprague Dowley, 250 g de peso aproximadamente), se obtuvo la fracción S9. El hígado fue donado por el bioterio de la Facultad de Medicina, UdelaR. Para esto se utilizó un homogenizador de vidrio-teflón que permite disgregar en forma uniforme el tejido en presencia de buffer fosfato. El homogenizado se centrifugó por 20 minutos a 10000 g a 4 °C. El sobrenadante se guardó en alícuotas a -80 °C. Se verificó la cantidad de proteínas en la fracción obtenida utilizando el método de Bradford¹⁰².

Aunque no se realizó en el presente trabajo, es importante mencionar que es deseable necesario evaluar la calidad de las fracciones subcelulares obtenidas. Para, para esto, es posible determinar la actividad enzimática de algunas de las enzimas presentes en la fracción. Por ejemplo, se puede determinar la actividad de la glutatión-S-transferasa, para lo cual es necesario contar con glutatión reducido y el sustrato canónico, 1-cloro-2,4-dinitrobenceno. En el ensayo se mide la transferencia de glutatión al 1-cl-2,4-dinitrobenceno formándose un compuesto lejo que absorbe a 340 nm¹⁰³.

7.2.2.2 ENSAYO DE METABOLIZACIÓN

El ensayo se realizó en un volumen final de 1 mL, utilizando amortiguador fosfato de potasio (0.1 M, pH 7.4) que contenía EDTA (1.5 mM), MgCl₂ (130 mM), glucosa-6-fosfato (350 mM), NADPH (40 μM), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (50 U/mL) y el compuesto a evaluar a una concentración de 40 μM. En el blanco se agregó DMSO en lugar del derivado, para evaluar si compuestos presentes en el extracto hepático podían ser detectados junto con los metabolitos provenientes del derivado. Por último, se agregó la fracción S9, a una concentración final de 1 mg/mL. La reacción se incubó a 37 °C por 30 minutos y se detuvo agregando MeOH.

Posteriormente, se realizaron extracciones de las mezclas con AcOEt con el fin obtener el compuesto de interés y sus posibles metabolitos. Se realizaron tres extracciones con AcOEt. Para evitar la formación de emulsiones se centrifugó la fase orgánica por 3 minutos, de esta manera se separan bien las dos fases y se evita la acumulación de agua en la fase orgánica, debido a que no es posible el uso de agentes desecantes por los pequeños volúmenes con los que se trabaja. La fase orgánica obtenida se destiló a vacío hasta sequedad.

A continuación, se resuspendió la fase orgánica en AcOEt y se realizó una CCF, comparando un patrón de cada compuesto con el extracto orgánico de la metabolización y el blanco para cada ensayo. Se utilizó una fase móvil hexano:AcOEt 8:2. La detección de los derivados y los posible metabolitos se realizó mediante la observación de la CCF al UV y revelado con anisaldehído.

Este ensayo permite en forma preliminar determinar si los compuestos evaluados sufren transformaciones metabólicas *in vitro* debido a las enzimas presentes en la fracción S9.

5.2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la fracción obtenida a partir de hígado se le determinó la concentración de proteínas. Se utilizó el método de Bradford¹⁰⁴ usando la proteína seroalbúmina bovina como estándar para hacer la curva de calibración (Figura 5.2.1).

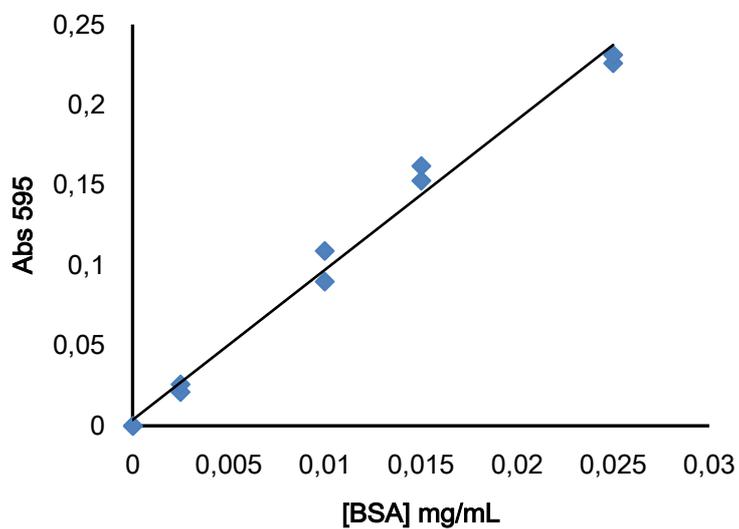


Figura 5.2.1 Gráfico correspondiente a la curva de calibración con BSA utilizando el método de Bradford $Abs_{595} = 9.343 [BSA] + 0.003$ ($R^2=0.988$).

Sentido de corrida

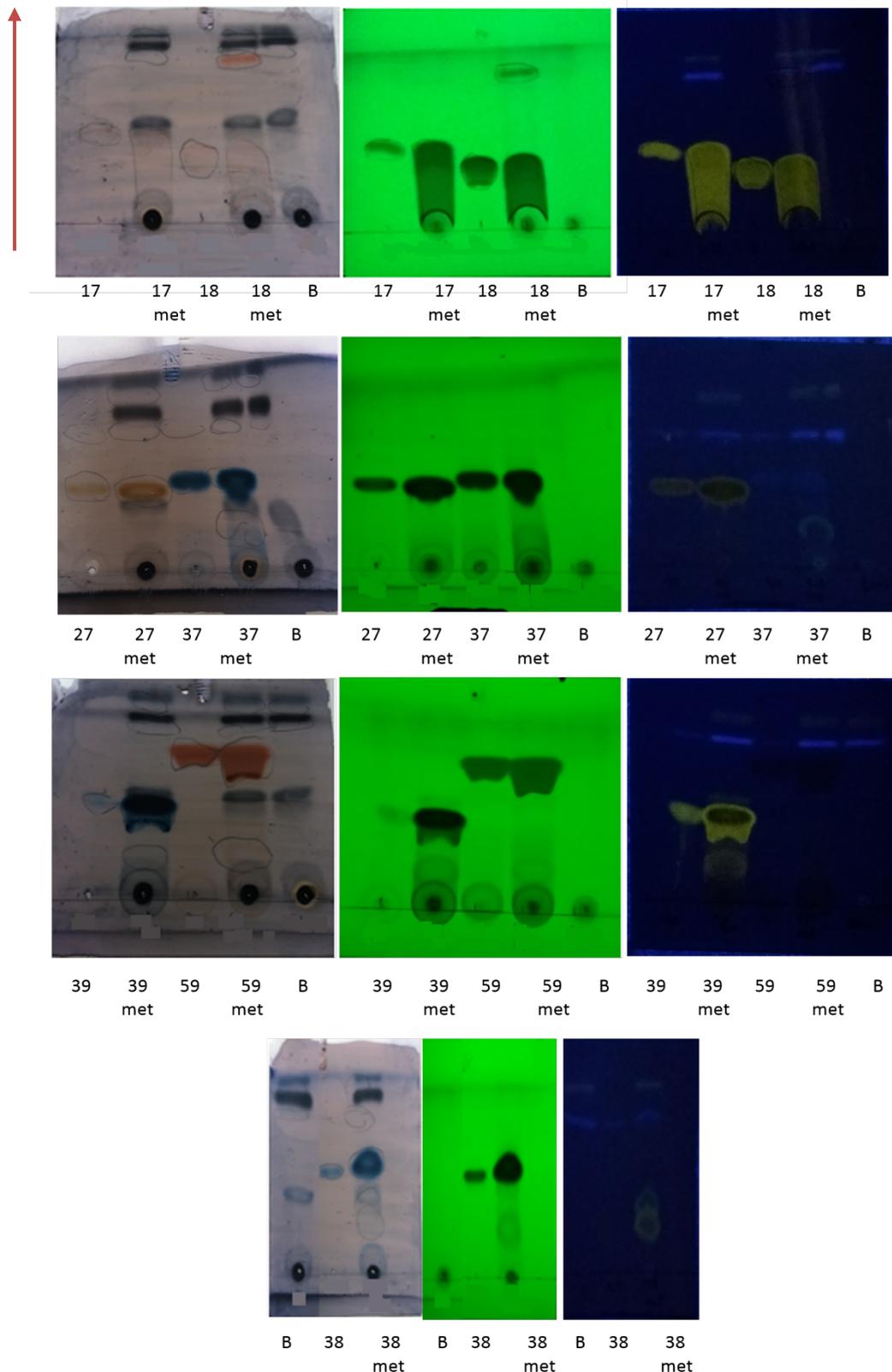


Figura 5.2.2. Imágenes de las CCF realizadas luego de la metabolización. A la izquierda revelado con anisaldehído, al centro UV 254 nm y a la derecha UV 356 nm. En la base de cada CCF se muestra a qué compuesto corresponde cada carril y si el mismo es el patrón o producto de metabolización (met), con B se indica el blanco del ensayo.

Se analizó la posible metabolización de los compuestos con valores de porcentaje de inhibición preliminares cercanos al 40 % (**17, 18, 27, 38, 39** y **59**) frente a caspasa-3 (Figura 4.3.2).

En la Figura 5.2.2 se muestran los resultados del ensayo para cada compuesto, con los diferentes tipos de revelado. Los carriles correspondientes al blanco en todos los casos presentaron manchas, que se evidenciaron en el revelado con anisaldehído y UV a 356 nm y que no se correspondieron con metabolitos del compuesto a evaluar.

Los compuestos **18, 27, 37, 38, 39** y **59** (Figura 5.2.2) parecieron generar nuevos derivados, ya que se observan nuevas manchas en las CCF que no se corresponden con el patrón ni con las manchas correspondientes al blanco. El compuesto **17** en principio no parecería generar nuevos metabolitos, pero como se obtuvo una mancha grande en la CCF revelada con UV, no fue posible asegurar que en dicha zona de la CCF no hubiera más de una entidad.

Aunque no se realizó el aislamiento e identificación de los posibles metabolitos generados por los compuestos **18, 27, 37, 38, 39** y **59** se puede concluir que para todos los compuestos excluyendo al **18** los metabolitos generados son más polares que los compuestos de partida debido a que migran menos en la CCF (Figura 5.2.2).

En el caso de los compuestos **37, 38** y **39** los nuevos metabolitos podrían deberse a la presencia del sustituyente furilo que es ampliamente metabolizado en los hepatocitos¹⁰⁵. En el caso del compuesto **59** los nuevos metabolitos podrían generarse por la presencia del agrupamiento éter que reacciona con enzimas de la familia de las citocromo P450 en el hígado¹⁰⁶.

Por tanto, de seguir hacia ensayos *in vivo* con alguno de estos compuestos, sería necesario realizar el aislamiento e identificación de los metabolitos, como también evaluar su citotoxicidad, mutagénesis y actividad frente al blanco biológico.

5.3 APROXIMACIÓN A LA PERMEABILIDAD A TRAVÉS DE LA MEMBRANA HEMATOENCEFÁLICA (PAMPA)

5.3.1 GENERALIDADES

Otra característica deseable en el diseño de fármacos consiste en que éstos puedan llegar a su blanco terapéutico en su forma activa. En nuestro caso, los compuestos deberían llegar al cerebro. Por tanto, los compuestos tendrían que ser capaces de cruzar la BHE. Para aproximarnos al estudio de esta cuestión, se plantea realizar el ensayo *in vitro* en paralelo de permeabilidad artificial (PAMPA)¹⁰⁷, a partir del cual es posible simular el pasaje de compuestos a través de una membrana que en base a su composición lipídica, se asemejaría a la BHE. Es importante tener en cuenta que este ensayo no es un indicador absoluto de la permeabilidad al sistema nervioso central, la cual se encuentra determinada por procesos biológicos complejos. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante este ensayo, pueden ser utilizados para optimizar la permeabilidad pasiva y guiar el diseño de fármacos en etapas iniciales de este proceso^{108,109}. A partir de este ensayo es posible determinar la difusión pasiva de compuestos a través de una membrana artificial desde un compartimento dador, que contiene el compuesto de interés, a uno receptor, en el cual no está presente el compuesto al iniciar el ensayo. Para esto se utilizan dos microplacas de 96 pocillos que forman un sándwich (Figura 7.3.1). La microplaca aceptora se posiciona en la parte superior del sándwich y su fondo presenta un microfiltro hidrofóbico sobre el cual se deposita el lípido o combinación de éstos disueltos en un solvente orgánico (n-dodecano, hexadecano o 1,9 decadieno). Tanto el compartimento dador como el receptor se llenan con la solución amortiguadora a utilizar, el compartimento dador también contiene el compuesto de interés.

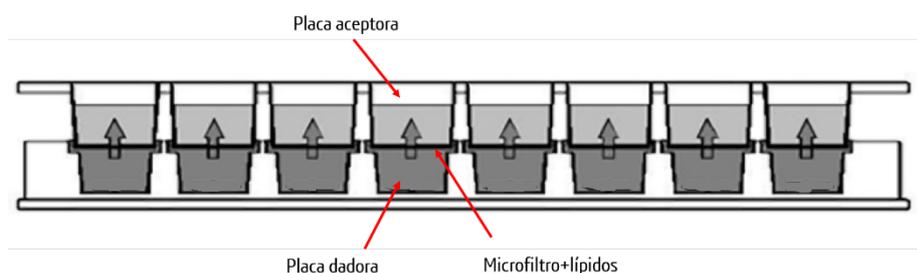


Figura 5.3.1 Es quema del sándwich formado en el ensayo PAMPA con las microplacas dadora y aceptora. Las flechas grises muestran el flujo del compuesto de la placa dadora a la aceptora¹¹⁰.

Adicionalmente, para determinar el pasaje a través de la membrana artificial es necesario calcular la permeabilidad aparente (P_{app}). Para esto se requiere adicionar en el ensayo pocillos control a una concentración de equilibrio del compuesto a evaluar, esto representa la concentración máxima de compuesto en el pocillo receptor sino hubiera barrera entre los pocillos receptor y dador.

Utilizando la relación obtenida de bibliografía con las concentraciones de los pocillos problema y los pocillos control es posible obtener la Papp de los compuestos¹⁰⁸.

El sándwich formado con ambas placas se deja agitando orbitalmente por toda la noche. Luego de la incubación se realizan espectros UV-visible de los pocillos aceptores, dadores y en equilibrio con lo que se puede determinar si hubo difusión pasiva de los compuestos. Con estos resultados es posible determinar si los compuestos son capaces de cruzar la membrana en cuestión según el valor de su Papp^{107,108,109,110}.

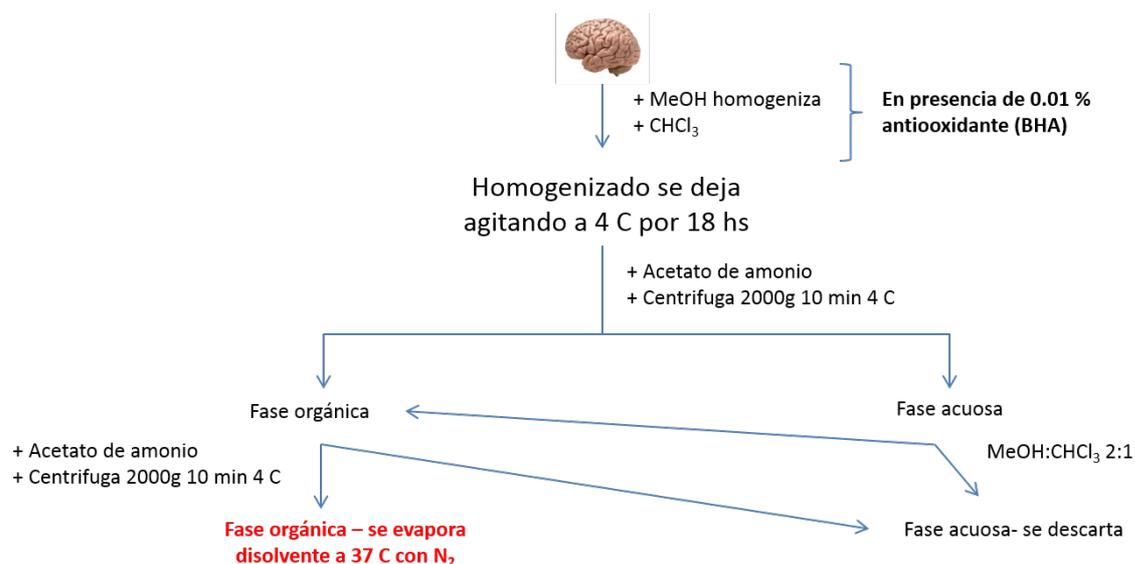
En el caso de esta Tesis, como se mencionó anteriormente, se simuló el pasaje de los compuestos seleccionados a través de una membrana artificial que simula la BHE. Para realizar este tipo de membrana artificial se utilizan lípidos polares de cerebro porcino (PBLs) compuestos por fosfatidilcolina 49 %, fosfatidilinositol 6%, fosfatidiletanolamina 28.1 %, fosfatidilserina 9 %, esfingomielina 5.9 % y cerebrosidos 30.9 %. Los PBL son disueltos en el solvente orgánico n-dodecano con una concentración de 2 % m/v^{108,109}. Estos lípidos se prepararon a partir de cerebro porcino^{108,109}.

5.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.2.1 OBTENCIÓN DE PBLs A PARTIR DE CEREBRO PORCINO

Se llevó a cabo la extracción de fosfolípidos (Esquema 5.3.1) a partir de cerebro porcino (donado por el bioterio de Facultad de Medicina), los cuales son necesarios para simular la BHE¹⁰⁸. A partir de 1.8 g de tejido cerebral se realizó un homogenizado usando un homogenizador de vidrio-teflón en presencia de 6 mL de una mezcla de 2:1 MeOH:CHCl₃ y 0.01 % del antioxidante BHA. El homogenizado se dejó incubando por 18 h a 4 °C con agitación orbital. Posteriormente se realizó una extracción con la adición de 1.5 mL de acetato de amonio 0.15 M y se realizó una centrifugación a 2000g por 10 minutos a 4 °C para favorecer la separación de las fases. A la fase acuosa se le adicionó 6 mL de una mezcla 2:1 MeOH:CHCl₃ luego se centrifugó y la fase orgánica resultante se unió con la fase orgánica del paso anterior y se volvió a adicionar 1.5 mL de acetato

de amonio 0.15 M y a centrifugar. Por último a la fase orgánica obtenida en el último paso se le evaporó el disolvente a 37 C con N₂.



Esquema 5.3.1 Pasos para la obtención de PBLs a partir de cerebro porcino.

Se determinó la concentración de fosfato inorgánico en las muestras obtenida por el método del fosfomolibdico. Se realizó una curva de calibración con KH₂PO₄. En primer lugar, la muestra se calentó a 180 °C por 60 min en presencia de 60 % de ácido perclórico, donde se pasa todo el fosfato orgánico a inorgánico (ortofosfato). Luego se agregó 3.3 mL de agua, 0.5 mL de molibdato de amonio 25 mg/mL y 0.5 mL de ácido ascórbico 100 mg/mL, mezclando luego de cada adición. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 100 °C por 10 min. De esta manera a partir del ortofosfato obtenido en presencia del molibdato de amónico se obtiene al ácido fosfomolibdico que posteriormente es reducido a un complejo de color azul por el ácido ascórbico en la solución. Se dejó llegar a temperatura ambiente y se midió el desarrollo de color a 800 nm. Es importante destacar que únicamente el fosfato ortofosfato es capaz de desarrollar color¹¹¹. Se siguió dicho procedimiento tanto para las muestras como para la curva de calibración y los controles. A partir de la determinación del fosfato inorgánico en la muestras fue posible determinar la cantidad de fosfolípidos según la relación mostrada en la Ecuación 6¹⁰⁸.

$$\mu\text{g fosfolípidos} = \frac{\mu\text{g fosforo} \times 780}{30.97} \quad \text{Ecuación 6}$$

5.3.2.2 ENSAYO PAMPA

Los controles de permeabilidad positivos y negativos (verapamilo y teofilina, respectivamente) se evaluaron a una concentración igual a 500 μM, mientras que los compuestos problema se evaluaron

a una concentración igual a 100 μM , por problemas de solubilidad en el medio de trabajo. La proporción de DMSO no superó el 5%¹⁰⁸.

En primer lugar, se adicionaron 2 μL de una solución de lípidos de cerebro de cerebro porcino (0.2 % m/v en n-dodecano), en la placa aceptora del sándwich la cual se encuentra provista de un microfiltro donde los lípidos se ordenan y simulan la barrera (microplacas MAIPNTR10, Merck)

En el ensayo se diferencian dos tipos de pocillos, los pocillos problema y los pocillos en equilibrio con una concentración del compuesto a evaluar constante en el ensayo. Con éstos es posible determinar el flujo de los compuestos de la placa dadora a la aceptora y así determinar la Papp según bibliografía (Ecuación 6)¹⁰⁸. En la placa dadora los pocillos se llenan con 300 μL de solución amortiguadora fosfato pH 7.4 con 5 % de DMSO y el compuesto a evaluar. En la placa dadora los pocillos problema de los controles de permeabilidad se encuentran a una concentración igual a 500 μM y los pocillos de equilibrio a una concentración igual a 333 μM . Los pocillos problema para los compuestos a evaluar se encuentran a una concentración igual a 100 μM y los pocillos en equilibrio se encuentran a una concentración igual a 66 μM . En la placa aceptora los pocillos problema se llenan únicamente con 150 μL de solución amortiguadora con 5 % de DMSO y los pocillos en equilibrio con 150 μL con 5 % de DMSO y los compuestos a evaluar (100 μM) y controles (500 μM) a igual concentración que en la placa dadora.

Luego de llenar todos los pocillos se ensambla el sándwich, se tapa de la luz con papel de aluminio y se deja agitando orbitalmente por 18 h. Posteriormente se pasa el contenido de la placa aceptora a otra microplaca apta para medidas en el UV-vis y se realizan los espectros en cada pocillo¹⁰⁸. Con la absorbancia obtenida es posible determinar el valor Papp según la Ecuación 6

$$P_{app} = -2.303 \times \frac{V_{dn} V_{ac}}{V_{dn} + V_{ac}} \times \frac{1}{S t} \times \log\left(1 - \frac{\%flux}{100}\right) \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde V_{dn} es el volumen del pocillo donador (300 μL), V_{ac} el volumen del pocillo aceptor (150 μL), S el área superficial del microfiltro que separa el sándwich (0.26 cm^2), t es el tiempo de incubación (18 h), %flux es el porcentaje de flujo calculado como el cociente entre la absorbancia máxima del pocillo aceptor y la absorbancia máxima en el pocillo a la concentración de equilibrio. Las unidades de Papp son cm s^{-1} .

5.3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.3.1 OBTENCIÓN DE PBLs A PARTIR DE CEREBRO PORCINO

Debido al alto de costo de PBLs y que no se encuentran disponibles en nuestro país, fue necesaria la obtención en el laboratorio de PBLs a partir de un cerebro porcino. Para su realización en primer lugar se realizó un homogenizado del tejido cerebral. Es importante destacar la adición de un antioxidante, en este caso se utilizó butilhidroxianisol (BHA), para evitar la oxidación de los lípidos. Luego se realizó una serie de extracciones para así obtener los lípidos de interés (Esquema 5.3.1)¹⁰⁸.

Una vez obtenidos los PBLs es necesario cuantificar los fosfolípidos obtenidos. Para esto se determinó la cantidad de fosfato inorgánico que presentaba el extracto^{108,112}. Se realizó una curva de calibración con KH_2PO_4 (Figura 5.3.1).

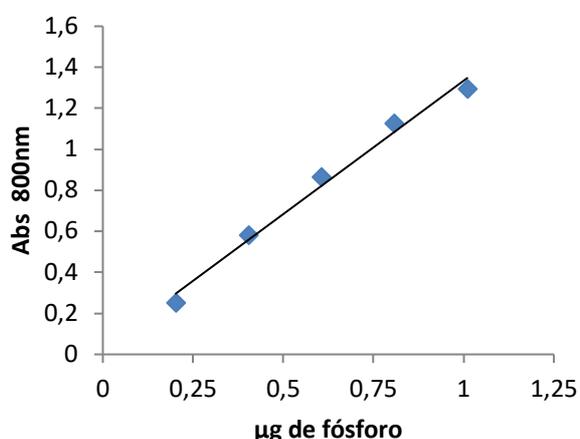


Figura 5.3.1 Curva de calibración con KH_2PO_4

Se obtuvo que el extracto presentaba 31.6 µg de fosfolípidos por mg de cerebro húmedo, lo cual se encuentra dentro del orden de magnitud esperado según bibliografía donde se esperaban valores entre 18.6 ± 4.61 µg de fosfolípidos por mg de cerebro húmedo¹⁰⁸.

5.3.3.2 ENSAYO PAMPA

Para la puesta a punto del ensayo se agregaron dos controles uno positivo para el pasaje de la BHE (**BHE**⁺) y otro negativo del pasaje (**BHE**⁻). Como **BHE**⁺ se utiliza verapamilo el cual presenta una Papp igual a $16 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$. Como **BHE**⁻ se utilizó teofilina que presenta una Papp igual a $1.2 \times 10^{-7} \text{ cm}^{-1}$ según bibliografía¹¹³. Se obtuvieron valores de Papp para verapamilo y teofilina de $15 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ y $5.6 \times 10^{-7} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente, por tanto fue posible reproducir los valores de bibliografía y se confirmó la puesta a punto del ensayo.

Sin embargo, no fue posible determinar la Papp para los compuestos seleccionados (**17**, **18**, **38** y **59**). Cuando se realizaron los espectros de absorbancia de los pocillos problema y aquellos a la concentración de equilibrio no fue posible reproducir los espectros originales de los compuestos (a una concentración igual a la concentración de equilibrio en las mismas condiciones del ensayo, PBS pH 7.4, DMSO 5 %) (Figura 5.3.2). Se seleccionaron estos compuestos porque presentaron los mejores perfiles de inhibición de caspasa-3 (% de inhibición a 100 μ M mayor al 50 %). Estos resultados se atribuyen a la baja solubilidad de los compuestos en la solución amortiguadora. Ésta se pone en evidencia por la presencia de absorbancia a todas las longitudes de onda (Figura 5.3.2), que indica dispersión de la luz. La baja solubilidad en la solución amortiguadora quedó evidenciada en la adhesión de los compuestos a las paredes de las placas, así como en su interacción con el microfiltro y con los lípidos de membrana que se encuentran depositados en éste.

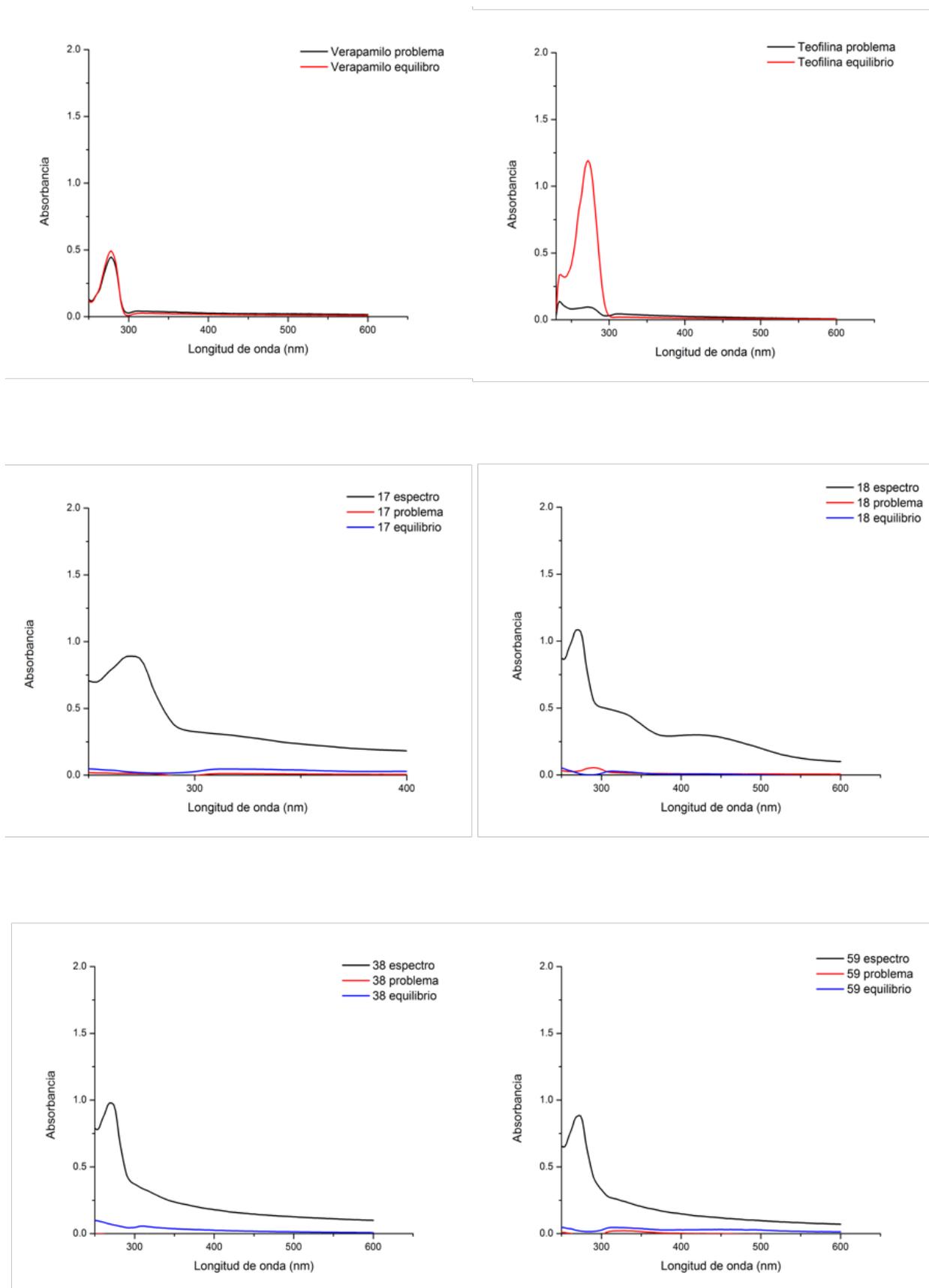


Figura 5.3.2 Espectros UV-Vis de compuestos y controles en el ensayo PAMPA. En negro se muestra el espectro del compuesto en PBS del pocillo control a la concentración de equilibrio, en rojo el compuesto en el pocillo problema y en azul el compuesto en el pocillo a la concentración de equilibrio.

En bibliografía se encontró que es un problema habitual en este tipo de ensayos, en los que se utilizan compuestos con baja solubilidad en medios acuosos y tiempos de incubación largos (16 h), que los compuestos presenten afinidad por la membrana artificial o por la placa del ensayo¹¹⁰¹¹⁴. Para poder evaluar la permeabilidad de compuestos con baja solubilidad se han puesto a punto ensayos PAMPA con la adición de solubilizadores. En esta Tesis se probó la adición de un 0.2 % del detergente Tween-80, debido a que mejora la solubilidad de los compuestos en soluciones acuosas, no presenta complicaciones en los resultados del ensayo y no genera grandes interferencias en los espectros UV-vis con los que se calcula el pasaje a través de la membrana¹¹⁴.

Al realizar el ensayo en presencia de un 0.2 % de Tween-80, fue posible determinar los espectros UV-Vis de los compuestos tanto en los pocillos problema como en aquellos a la concentración de equilibrio, por tanto la adición de este detergente mejoró la solubilidad de los mismos y permitió evaluar la permeabilidad de los compuestos (Figura 5.3.3).

Tabla 5.3.1 Valores de Papp obtenidos en el ensayo PAMPA con la adición Tween-80

Compuesto	Papp ($\times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$)
Verapamilo	12.6
Teofilina	4.6
17	10.7
18	13.6
38	12.7
59	30.7

Respecto al valor obtenido para el control negativo del ensayo, teofilina, éste presentó un valor superior respecto al obtenido al realizar la puesta a punto del ensayo ($5.6 \times 10^{-7} \text{ cm}^{-1}$). Esta diferencia no se debe a la adición de Tween-80 debido a que se incluyeron en el ensayo pocillos de teofilina sin Tween-80 y el valor obtenido fue $3.9 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$, similar al obtenido en presencia de Tween-80. Esta diferencia puede deberse a que los lípidos con los cuales se realizó la membrana artificial en este ensayo provenían de una extracción del primer homogenizado obtenido. Para esto, se habían guardado fracciones de este homogenizado para realizar nuevas extracciones de lípidos. Por lo tanto, los fosfolípidos no provenían de un cerebro fresco, que es lo indicado para este ensayo. El control positivo, verapamilo, sí presentó un valor similar al reportado¹¹⁵ y no varió respecto al ensayo anterior.

El valor obtenido para el control negativo, teofilina, no permite clasificarlo como un compuesto que no traspasa la BHE, por lo cual no fue posible emitir conclusiones acerca de los compuestos evaluados. Sí es posible afirmar que, en las condiciones del ensayo, los compuestos presentaron valores de Papp similares al control positivo, con lo cual se podría suponer que los compuestos podrían traspasar la BHE (Tabla 7.3.1). Para mejorar los resultados hubiera sido conveniente haber conseguido un nuevo cerebro de cerdo y realizar la extracción de lípidos nuevamente para que éstos estuvieran frescos y asegurar las condiciones del ensayo, como indicaba la referencia de partida donde se utilizaban lípidos de cerebro de cerdo frescos¹⁰⁸.

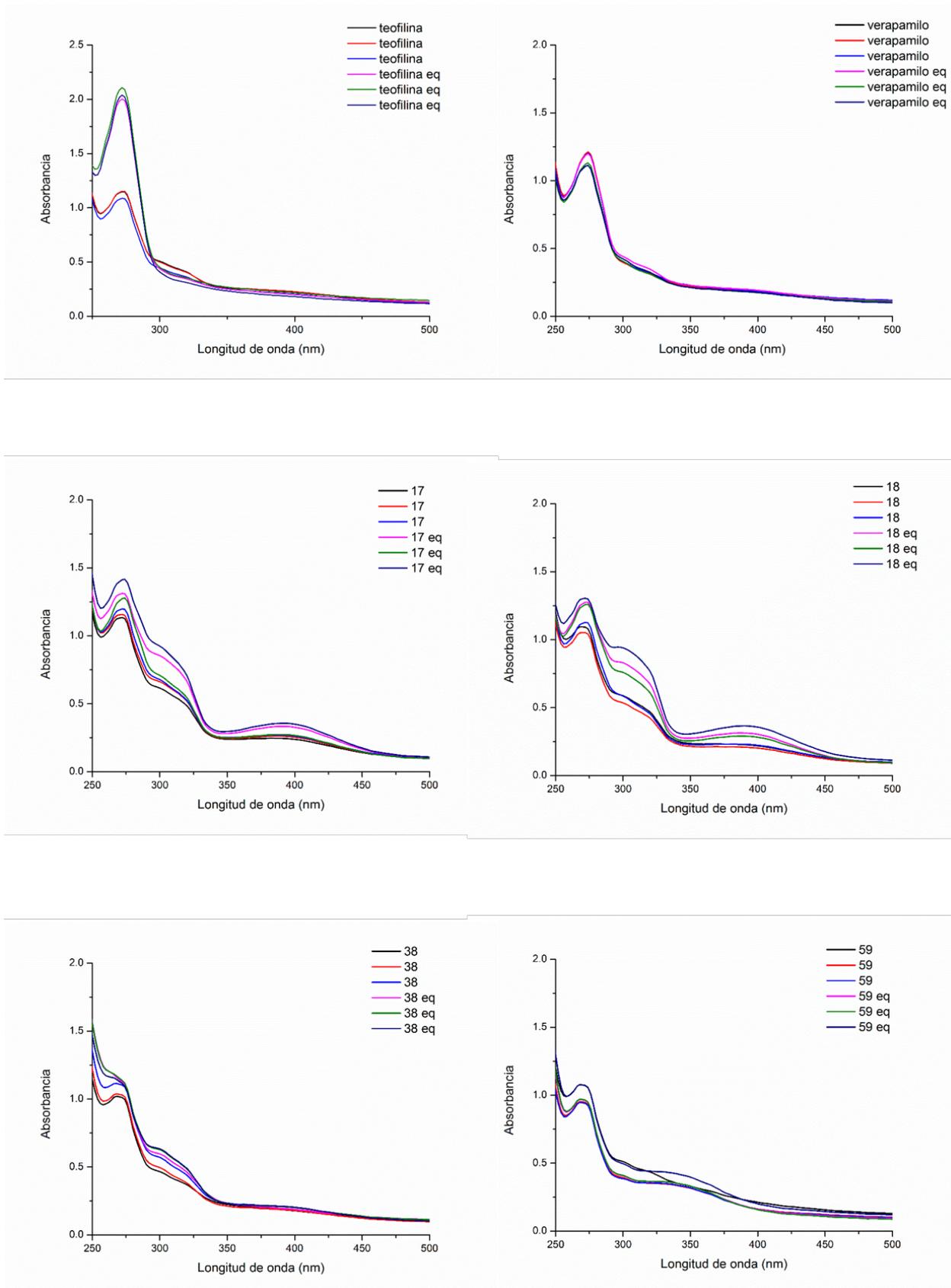


Figura 5.3.3 Espectros de absorción compuestos y controles en los pocillos problema por triplicado (negro, rojo y azul) y los pocillos en equilibrio por triplicado (magenta, verde y violeta) luego del ensayo PAMPA con la adición de Tween-80.

5.4 EVALUACIÓN DE MUTAGÉNESIS (TEST DE AMES)

5.4.1 GENERALIDADES

En los estudios preclínicos, es muy importante conocer los efectos adversos que los potenciales fármacos pueden provocar en el organismo de los pacientes. El efecto que los fármacos realizan para detener la enfermedad no debería provocar efectos adversos sobre el organismo. Los posibles efectos adversos son muy variados, entre éstos se encuentran mutagenicidad, genotoxicidad y teratogenicidad. La capacidad mutagénica representa una de las características más relevantes para el pasaje de potenciales fármacos de la evaluación preclínica hacia la clínica.

Uno de los métodos más eficientes y usados para determinar si un compuesto es mutagénico es el Test de Ames. Se trata de un ensayo *in vitro* especialmente diseñado para la detección de daño genético ligado a la mutación de genes inducida por fármacos potenciales. Las mutaciones que generan los compuestos pueden ser de tipo puntual, involucrando uno o dos pares de bases, o bien generar inserciones o deleciones de fragmentos de mayor tamaño^{115,116,117}.

En este test se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium* que son auxótrofas para el aminoácido histidina (His), debido a que presentan una mutación en su genoma que no les permite sintetizarla *de novo*, por tanto no son capaces de crecer y formar colonias en su ausencia. Los compuestos mutagénicos son capaces de generar mutaciones en estos sitios y provocar reversiones en el fenotipo de la cepa, permitiéndoles crecer en medios que carecen de His¹¹⁵.

Este test es usado mundialmente como un método de cribado inicial para determinar el potencial mutagénico de nuevos compuestos. Presenta un alto valor predictivo respecto a la carcinogenicidad en roedores¹¹⁵.

5.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los materiales que fueron utilizado en estos ensayos fueron esterilizados por autoclave a 121 °C o por filtración con filtro de 0.22 µm.

Las placas para los ensayos de toxicidad y mutagénesis se prepararon con medio mínimo compuesto por sales (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$), bacto agar, glucosa 14 mM y $MgSO_4$ 0.4 mM.

Las cepas de *Salmonella typhimurium* auxótrofas para His utilizadas en los ensayos de toxicidad y mutagénesis están disponibles en el Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados del Instituto de Higiene, donde se realizaron los ensayos.

5.4.2.1 ENSAYO DE TOXICIDAD

La toxicidad de los compuestos frente a las cepas seleccionadas de *Salmonella typhimurium* auxótrofas para His se evaluaron a partir de un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento en un medio líquido Oxoid N°2. El cultivo se incubó por 14-16 h a 37 °C, sin agitación. Luego de este período se incubaron 100 µL del cultivo en fase exponencial en presencia de 500 µL de solución amortiguadora fosfato pH 7.3 y 50 µL del compuesto a evaluar a una concentración máxima igual a 5 mg de compuesto en 50 µL de DMSO y a cuatro diluciones seriadas al décimo, por 1 h a 37 °C. Por último, se mezcló lo incubado anteriormente con 2 mL de agar blando, en presencia de histidina y biotina (100 y 0.5 mM, respectivamente), se agitó con vórtex y se incorporó por volcado en una placa de cultivo de 9 cm de diámetro, con medio mínimo. Las placas con las bacterias y los compuestos se incubaron por 24 h a 37 °C. En este ensayo se agregaron altas concentraciones de His y biotina porque se buscaba evaluar la toxicidad de los compuestos frente a las distintas cepas, por tanto las bacterias deben poder crecer sin restricciones, para lo cual deben estar provistas de todos los nutrientes para crecer.

Debido a la solubilidad de los compuestos ensayados en DMSO se evaluaron a una concentración máxima de 1 mg en 50 µL de DMSO (por placa) y se realizaron cuatro diluciones seriadas al décimo a partir de ésta en DMSO.

En este ensayo es necesario incluir una placa de fenotipo que indique que la cepa es la indicada. Para esto se prepararon placas con medio Oxoid N°2 y agar a las que se incorporan las bacterias por volcado. Una vez que se solidifica el agar se adiciona ampicilina, tetraciclina y cristal violeta en una región de la placa, para confirmar el fenotipo. En la Tabla 5.4.1 se muestran las sensibilidades de las cepas testeadas (TA98, TA100, TA1535, TA97a).

Tabla 5.4.1 Sensibilidades de las cepas ensayadas.

Cepa	Ampicilina	Tetraciclina	Cristal violeta
TA98	Resistente	Sensible	Sensible
TA100	Resistente	Sensible	Sensible
TA1535	Resistente	Sensible	Sensible
TA97a	Resistente	Sensible	Sensible

5.4.2.1 ENSAYO DE MUTAGÉNESIS

El ensayo de mutagénesis se realizó de igual forma que el ensayo de toxicidad, pero la concentración de His utilizada es considerablemente menor (0.5 mM), de esta forma se asegura el crecimiento de las bacterias revertientes de su fenotipo, debido a que la cantidad de His es mínima.

En este caso la incubación en placa fue por 48 h a 37 °C, pues requieren de más tiempo para lograr revertir su fenotipo.

En este ensayo también se incluyeron controles negativos, con la incorporación de DMSO, y controles positivos de mutagenicidad los cuales dependen de la cepa evaluada. Para TA98 se utilizó el compuesto 2-aminofluoreno a una concentración igual a 10 µg/placa. Para las cepas TA100 y TA1535 se utilizó azida sódica a una concentración de 2 µg/placa. Para la cepa TA97a se empleó 9-aminoacridina a una concentración de 50 µg/placa^{118,119}.

El número de revertientes se contó manualmente y se expresó como el promedio ± error estándar. Los ensayos se realizaron por duplicado para cada concentración de compuesto, considerando que se requieren grandes cantidades de compuesto para realizar los ensayos de toxicidad y mutagénesis. La muestra se considera mutagénica cuando el número de revertientes supera el doble de las revertientes espontáneas en el control negativo.

5.4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según la guía OECD (del inglés Organisation for Economic Co-operation and Development)¹²⁰ para determinar que un compuesto no es mutagénico es necesario obtener resultados de no mutagenicidad en 5 cepas de *S. typhimurium* diferentes (TA97, TA97a, TA98, TA100, TA1535,

TA1537, TA1538, TA102, TA104) las cuales presentan diferentes tipos de mutaciones en su genoma que las vuelven deficientes en His. Se ha observado que utilizando las cepas TA98 y TA100 es posible identificar el 90 % de mutágenos en un conjunto de compuestos de los cuales 35 % son mutagénicos. Si se obtienen resultados negativos en estas dos cepas se continúa con otras¹¹⁵.

En el ensayo es necesaria la inclusión de un control positivo y otro negativo. En el control positivo se agrega un compuesto altamente mutagénico para la cepa en estudio. En el control negativo no se adiciona ningún compuesto, únicamente el porcentaje de disolvente usado como vehículo para los compuestos evaluados. Por tanto, en el control positivo se va a contar con una alta tasa de reversiones que se verá reflejado en la cantidad de colonias. En los controles negativos se espera una baja tasa de reversiones, asociadas a reversiones espontáneas, por lo que se esperan placas con pocas colonias¹¹⁵. A partir del control negativo es posible determinar si el compuesto evaluado es o no mutagénico. Para que un compuesto sea categorizado como mutagénico es necesario que el número de colonias duplique la cantidad obtenida en el control negativo¹²¹.

Como paso previo al ensayo de mutagénesis se realiza un ensayo de toxicidad de los compuestos a evaluar frente a la cepa *S. typhimurium* seleccionada para el ensayo, de esta manera se descarta la posibilidad de obtener falsos negativos que pudieran presentar baja cantidad de colonias no por baja reversión del fenotipo sino a causa de la toxicidad.

La concentración máxima establecida a evaluar de los compuestos en estos ensayos es de 5 mg en 50 μ L de DMSO por placa. Esta concentración máxima dependerá de la solubilidad de los compuestos a evaluar en DMSO. También se evalúan cuatro diluciones al décimo a partir de dicha concentración.

En nuestro caso se evaluaron los compuestos **17**, **18**, **38** y **59** por presentar un porcentaje de inhibición preliminar de la actividad de caspasa-3 superior al 50 %. Para éstos se determinó que la concentración máxima a evaluar por placa era igual a 1 mg en 50 μ L de DMSO, debido a que a concentraciones mayores se formaba precipitado en DMSO.

En este ensayo se analiza la presencia de precipitado, crecimiento bacteriano, césped (crecimiento confluyente en toda la placa), césped parcial (no hay crecimiento confluyente uniforme en toda la placa) y microcolonias en las placas. La selección de la concentración a utilizar en el ensayo de mutagénesis dependerá de la ausencia de precipitado, microcolonias y césped parcial en placa.

Tabla 5.4.2 Resultados del ensayo de toxicidad en la cepa TA98 para los compuestos **17**, **18**, **38** y **59**.

	[Compuesto]	Precipitado	Crecimiento	Césped	Césped parcial	Microcolonias
17	1 mg/placa	✓	✓	✓	x	x
	1/10	x	✓	✓	x	x
	1/100	x	✓	✓	x	x
	1/1000	x	✓	✓	x	x
	1/10000	x	✓	✓	x	x
18	1 mg/placa	✓	✓	✓	x	x
	1/10	x	✓	✓	x	x
	1/100	x	✓	✓	x	x
	1/1000	x	✓	✓	x	x
	1/10000	x	✓	✓	x	x
38	1 mg/placa	✓	x	x	x	x
	1/10	✓	✓	✓	x	✓
	1/100	x	✓	✓	x	x
	1/1000	x	✓	✓	x	x
	1/10000	x	✓	✓	x	x
59	1 mg/placa	x	✓	✓	x	x
	1/10	x	✓	✓	x	x
	1/100	x	✓	✓	x	x
	1/1000	x	✓	✓	x	x
	1/10000	x	✓	✓	x	x

Se busca que en la concentración a seleccionar los compuestos no precipiten, haya crecimiento bacteriano y éste sea en forma de un césped total en placa.

Para los compuestos **17** y **18** se obtuvo que a una concentración de 1 mg/placa precipitaron. No obstante, hay crecimiento bacteriano y formación de césped (Tabla 5.4.2). Por tanto, para estos derivados se seleccionó una concentración inicial para el ensayo de mutagénesis igual a 0.5 mg/placa, que corresponde a una dilución al medio de la última dilución en el ensayo de toxicidad donde se observa precipitado.

El derivado **38** generó precipitado en placa a una concentración de 0.1 mg/placa y formación de microcolonias (Tabla 5.4.2). Por tanto, el ensayo de mutagénesis se inició con una concentración igual a 0.05 mg/placa.

Para el compuesto **59** no se observó precipitado en ninguna de las concentraciones evaluadas en el ensayo de toxicidad. A su vez, se observó crecimiento bacteriano como formación de césped (Tabla 5.4.2). Por tanto, para el compuesto **59** el ensayo de mutagénesis se inició con una concentración igual a 0.1 mg/placa.

La concentración inicial para el ensayo de mutagénesis es igual a la máxima concentración donde los compuestos son considerados no tóxicos en el ensayo de toxicidad pues presentan, crecimiento bacteriano. Además, no se observa precipitado del compuesto. Se evaluaron 5 diluciones al tercio.

Se evaluó la capacidad mutagénica de los compuestos **17**, **18**, **38** y **59**. Como está recomendado se comenzó la evaluación con la cepa TA98.

En la Tabla 5.4.3 se detallan los resultados obtenidos en el ensayo de mutagénesis en la cepa TA98. Para los compuestos **17**, **18** y **59** se observó que la cantidad de revertientes supera ampliamente el doble de revertientes espontáneas en el control negativo, requerido para que sean considerados como agentes mutagénicos. Mientras que el compuesto **38** fue el único no mutagénico por no superar el límite establecido para ser considerado como un agente mutagénico.

Tabla 5.4.3 Resultados para el ensayo de mutagénesis de los compuestos **17**, **18**, **38** y **59** en la cepa TA98. Los valores representan promedios de dos placas con su respectivo error estándar.

Concentración (mg/placa)	17	18	38	59
	Nº de colonias	Nº de colonias	Nº de colonias	Nº de colonias
0.5	91±12	39.5±3		
0.17	112±2	35±11		
0.06	80±9	32±11		
0.02	67±3	36±7		
0.006	55±8	64±25		
0.05			0.5±0.5	
0.02			1.5±1.5	
0.008			0.5±0.5	
0.004			1±1	
0.001			0±0	
0.1				79±10
0.03				73±15
0.01				58±13
0.004				35.5±0.5
0.001				29±5
C+	250±20	250±20	193±32	193±32
C-	20±6	20±6	10±4	10±4

En base a los resultados obtenidos en la cepa TA98 se siguió con el análisis de la mutagenicidad para el compuesto **38** en las cepas TA100, TA1535 y TA97a.

Por tanto, se realizó previamente el ensayo de toxicidad en dichas cepas con este derivado (Tabla 5.4.4). En las tres cepas se observó precipitado hasta la concentración 0.1 mg/placa, y se obtuvo crecimiento bacteriano en todas las concentraciones.

Tabla 5.4.4 Resultados del ensayo de toxicidad para el derivado 38 en las cepas TA100, TA1535 y TA97a.

	[Compuesto]	Precipitado	Crecimiento	Césped	Césped parcial	Microcolonias
TA100	1 mg/placa	✓	✓	✓	x	✓
	1/10	✓	✓	✓	x	x
	1/100	x	✓	✓	x	x
	1/1000	x	✓	✓	x	x
	1/10000	x	✓	✓	x	x
TA1535	1 mg/placa	✓	✓	✓	x	x
	1/10	✓	✓	✓	x	✓
	1/100	x	✓	✓	x	x
	1/1000	x	✓	✓	x	x
	1/10000	x	✓	✓	x	x
TA97a	1 mg/placa	✓	✓	✓	x	✓
	1/10	✓	✓	✓	x	x
	1/100	x	✓	✓	x	x
	1/1000	x	✓	✓	x	x
	1/10000	x	✓	✓	x	x

A partir de los resultados en el ensayo de toxicidad se decidió para las tres cepas utilizar como concentración de partida 0.01 mg/placa en el ensayo de mutagénesis, debido a que corresponde a la dilución al medio de la última concentración en el ensayo de toxicidad donde se observa precipitado.

Como se muestra en la Tabla 5.4.5 el compuesto **38** no resultó mutagénico en las cepas evaluadas debido a que las revertientes obtenidas no superaron el doble de revertientes del control negativo.

Tabla 5.4.5 Resultados para el ensayo de mutagénesis del compuesto **38** en las cepas TA100, TA1535, TA97a. Los valores representan promedios de dos placas con su respectivo error estándar.

	TA100	TA1535	TA97a
Concentración ($\mu\text{g/placa}$)	N° de colonias	N° de colonias	N° de colonias
0.05	119 \pm 31	75 \pm 8	230 \pm 19
0.02	103 \pm 17	85 \pm 26	239 \pm 6
0.008	86 \pm 10	112 \pm 8	219 \pm 19
0.004	88 \pm 1	210 \pm 7	216 \pm 10
0.001	80 \pm 11	195 \pm 8	205 \pm 15
C+	405 \pm 55	505 \pm 55	461 \pm 51
C-	158 \pm 42	235 \pm 21	309 \pm 10

6. EVALUACIÓN *IN SILICO*

6.1 GENERALIDADES

El uso de herramientas computacionales en el diseño de fármacos han ayudado a predecir y comprender el sitio y modo de interacción de moléculas con potencial actividad con blancos terapéuticos, permitiendo guiar la introducción de modificaciones en dichas moléculas y de esta manera optimizar en forma más eficiente el proceso de búsqueda y proposición de los nuevos candidatos a fármacos¹²².

Dentro de las herramientas computacionales que se han empleado en esta Tesis, se encuentran el modelado de la estructura geométrica para los compuestos analizados con métodos cuánticos basados en la Teoría de los Funcionales de la Densidad (*Density Functional Theory*, DFT) en solución descripta con un método continuo (*Polarizable Continuum Model*, PCM) como paso previo a su anclaje o *docking* ligando-proteína y las simulaciones de dinámica molecular clásica (DM). Los cálculos de *docking* son ampliamente utilizados en Química Medicinal para predecir la formación de complejos entre una macromolécula aceptora en la interacción no covalente y un ligando, correspondiendo el primero a un blanco terapéutico (proteínas, ADN) y el segundo al compuesto a evaluar como posible candidato a fármaco¹²³. Mediante este análisis es posible proponer en primera instancia rápida de acercamiento al problema cuál sería el sitio de interacción más probable y qué conformación del compuesto formaría el (o los) complejo(s) más estable(s). En forma más detallada y confiable, la dinámica molecular permite describir tanto la evolución dinámica de la estructura del ligando como la de la macromolécula aceptora, y de esta manera validar (o sustituir la descripción de la interacción por una nueva, más representativa de su realidad) el sitio de interacción identificado por el *docking*. Mediante las simulaciones de dinámica molecular es posible estudiar cómo se comportan las interacciones entre el compuesto y el blanco terapéutico a lo largo del tiempo¹²⁴.

A través del análisis *in silico*, en la presente Tesis de Doctorado, se pretendió predecir y comprender el modo de interacción de los compuestos que presentaron inhibición preliminar de la actividad de caspasa-3 en ensayos experimentales, realizando una comparación con los resultados obtenidos para otros inhibidores reportados de caspasa-3 y -7^{77,78}. Este análisis permitirá analizar cuales son los determinantes más relevantes a nivel de la interacción directa con la proteína para la inhibición de caspasas -3 y -7 y así realizar un nuevo re-diseño de moléculas que puedan ser consideradas mejores candidatos como potenciales inhibidores de estas caspasas.

6.2 MÉTODOS TEÓRICOS PARA ESTUDIAR LAS INTERACCIONES LIGANDO-ENZIMA

6.2.1 DOCKING LIGANDO-PROTEÍNA

El objetivo de los cálculos de *docking* molecular es brindar una predicción inicial veloz de la estructura del complejo ligando-receptor. Los cálculos de *docking* se realizan en dos pasos. En primer lugar, se realiza un muestreo de la interacción de las distintas conformaciones del ligando en la superficie de la macromolécula aceptora seleccionada. Luego estas conformaciones son clasificadas según una función de *score*. Idealmente los algoritmos de muestreo son capaces de reproducir el modo de unión experimental para un complejo dado, pero en los hechos la confiabilidad de la capacidad predictiva del método es limitada. Además, las funciones de *score* permiten clasificar las conformaciones en base a su energía libre de unión e identificar así las más probables entre las generadas^{125 126}.

6.2.1.1 ALGORITMOS DE MUESTREO

Teniendo en cuenta los seis grados de libertad traslacional y rotacional como los correspondientes a las conformaciones de proteína y ligando, existe un gran número de modos de unión posibles entre ambos. Lamentablemente, es muy costoso explorar computacionalmente todas las posibles conformaciones. Existen varios algoritmos de muestreo que permiten muestrear diversas conformaciones de los complejos. Entre éstos se encuentran algoritmos coincidentes, construcciones incrementales, búsqueda simultánea de múltiple copia, LUDI, Monte Carlo, genético y genético lamarckiano¹²⁶. En esta Tesis se utilizó un algoritmo genético lamarckiano para generar las estructuras de los complejos entre caspasa-3 y -7 y los derivados, identificadas como *poses*. Los algoritmos genéticos están inspirados en la teoría de evolución de Darwin. Los grados de libertad del ligando están representados por “genes” llamados cadenas binarias, que forman “cromosomas” que representan la pose del ligando. Estos algoritmos pueden sufrir de mutaciones y *crossover*. La mutación causa cambios aleatorios en los “genes” mientras que el *crossover* intercambia genes entre dos cromosomas. Cuando los operadores genéticos (mutaciones y *crossover*) afectan los genes, el resultado es una nueva estructura del ligando. Las nuevas estructuras se evalúan con la función *score* y las que sobreviven (pasan el umbral de selección) se pueden utilizar para la próxima generación. Adicionalmente en el algoritmo genético lamarckiano las adaptaciones al ambiente de un fenotipo individual son transcritas reversiblemente en su genotipo convirtiéndose en rasgos hereditarios^{123,126}.

6.2.1.2 FUNCIONES *SCORE*

Permiten discriminar entre poses correctas e incorrectas. Estas funciones se basan en estimar (en lugar de calcular) la afinidad de unión entre aceptor y ligando, y adoptan varios supuestos y simplificaciones. Estas funciones se pueden dividir en funciones basadas en campos de fuerza, empíricas y basadas en conocimiento. En este trabajo se utilizaron funciones de *score* con base en campos de fuerza semi-empíricos. El campo de fuerza se basa en un modelo termodinámico que permite la incorporación de energías intramoleculares en la predicción de la energía libre de unión. También incorpora un método de desolvatación basado en la carga. Este método está calibrado con un conjunto de 188 complejos ligando-proteína de estructura y energías de unión conocidas¹²⁵.

6.2.1.3 METODOLOGÍAS DE *DOCKING*

Existen distintas estrategias para realizar *docking* molecular. Se puede tratar al ligando y a la macromolécula aceptora como estructuras rígidas, considerando únicamente los grados de libertad de rotación y traslación. Esta estrategia no es capaz de representar correctamente aquéllos complejos cuya formación implica ajuste mutuo entre sus componentes en la interacción, para lograrlo es necesario tener en cuenta la flexibilidad ambos componentes y obtener configuraciones de mínima energía del complejo, con mayor costo respecto a otra aproximación que considera al ligando como estructura flexible y al aceptor como estructura rígida, opción que en ciertos casos - cuando no hay adaptación de la macromolécula en la interacción- representa un mejor equilibrio entre exactitud y costo. También es posible considerar solo cierta región del receptor como estructura flexible, requiriendo conocer el sitio de interacción del ligando en el receptor¹²⁶.

Otra característica a establecer antes de realizar un cálculo de *docking* molecular es definir la región del aceptor que podría interaccionar con el ligando. Si se conoce aproximadamente la ubicación del sitio de interacción, se puede restringir el análisis a dicha región; en caso contrario, se realiza un *docking* sin restricciones, tomando como posible sitio de interacción toda la superficie de la macromolécula, lo que se conoce como *blind docking*. En este trabajo se realizó el cálculo de *docking* mediante *blind docking* y sólo se tomó como flexible al ligando.

6.2.2 DINÁMICA MOLECULAR

En la Química Medicinal los cálculos las simulaciones de DM permiten mejorar el conocimiento acerca de cómo se llevan a cabo las interacciones no covalentes entre compuestos orgánicos y biomoléculas. Este conocimiento permite comprender los modos de acción de los compuestos, por ejemplo inhibiendo la acción de un blanco terapéutico¹²⁴.

La DM se basa en estudiar las trayectorias de los átomos en un sistema molecular bajo distintas condiciones de simulación. Se considera a los núcleos suficientemente pesados como para ser tratados como partículas clásicas, entonces la dinámica de los núcleos puede estudiarse resolviendo las ecuaciones de movimiento de Newton.

Las simulaciones de DM generan una serie de configuraciones del sistema que permiten estudiar los procesos dinámicos. Cuatro elementos básicos definen el modelo que es simulado por la DM (i) nivel de resolución del modelo; (ii) descripción de las interacciones entre átomos; (iii) generación de las configuraciones; y (iv) definición de las condiciones de unión. La resolución define las partículas elementales del modelo, en la DM clásica corresponden a los átomos, en las simulaciones de base mecánica cuántica (QM) corresponden a núcleos y electrones, se pueden también utilizar conjuntos de átomos (moléculas, grupos funcionales, cadenas laterales de una proteína, etc.) en las aproximaciones llamadas de grano grueso (coarse grain). En la DM clásica la función de energía potencial que describe las interacciones entre los átomos en función de sus posiciones se denomina “campo de fuerza”. Consiste en términos de unión covalente entre átomos (enlaces, ángulos y torsiones) y de interacción no covalente por pares de átomos (van der Waals y electrostáticas). Los parámetros de los campos de fuerza están ajustados para reproducir datos provenientes de cálculos de mayor exactitud o resultados experimentales. Para la mayoría de las biomoléculas como proteínas, ADN, lípidos y azúcares, se utilizan un número pequeños de bloques para construirlos que son parametrizados una única vez. Los campos de fuerza para biomoléculas más tradicionales (AMBER, OPLS, CHARMM y GROMOS)^{127,128,129} son actualizados y mejorados continuamente. En cambio, la diversidad de pequeñas moléculas orgánicas no permite el uso de bloques de construcción y los ligandos deben ser parametrizados individualmente. Los parámetros para los términos de unión covalente son tomados de campos de fuerza generalizados (GAFF, OPLS-AA, CGenFF)^{130,128} mientras que las cargas atómicas son obtenidas a través de cálculos realizados con métodos de modelado basados en la mecánica cuántica por procedimientos estandarizados como RESP¹³¹.

Las simulaciones de DM se realizan a volumen, número de partículas y energía total constantes en la fase de equilibración, pero la temperatura y presión pueden variar. Para mantenerlas constantes en la fase de producción es necesario definir controladores conocidos como termostatos y baróstatos, respectivamente. Entre los termostatos se destacan los de Berendsen, Langevin y Nosé-Hoover. Entre los baróstatos, los de Berendsen, Monte Carlo y Nosé-Hoover^{132,133, 134,135,136}.

Otro aspecto a definir en las simulaciones son las condiciones periódicas de contorno. Debido a que los complejos ligando-biomolécula se encuentran en una solución infinita formada por

moléculas de agua explícitas, esto llevaría a un elevado costo computacional. Para resolver este problema se definen estas condiciones periódicas de contorno donde las moléculas de agua son colocadas en una caja, la cual es replicada en todas las direcciones. Las interacciones electrostáticas de largo alcance dentro de esta caja son truncadas definiendo un *cutoff* para reducir el costo. Al truncar la caja que contiene al solvente se generan artefactos eliminados utilizando el método *Particle-mesh-Ewald* (PME)¹³⁷.

Los resultados de la trayectoria de DM son analizados para extraer información sobre parámetros estructurales (distancias, ángulos, diedros) e interacciones no covalentes entre átomos del ligando y residuos de interés en el receptor. Adicionalmente es necesario medir ciertos parámetros que determinan la estabilidad del complejo en la simulación, como la desviación media cuadrática de las posiciones atómicas (RMSD, del inglés *root mean square deviation*) respecto a una referencia, así como parámetros que indican qué regiones del sistema son menos rígidos, como la fluctuación media cuadrática de las posiciones atómicas (RMSF, del inglés *root mean square fluctuation*)¹³⁸.

6.3 MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

6.3.1 PREPARACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS

Para 44 de los compuestos diseñados derivados de 2-amino-4-feniltiazol, 4-naftiltiazol-2-amina y 4-feniltiazol-2-éter se determinó su estructura por optimización de geometría sin restricciones usando el programa Gaussian09 rev.D.01¹³⁹ al nivel DFT ω B97X-D/6-31+G(d,p) en presencia de solvente (agua) implícito descrito con el modelo IEF-PCM^{140,141} y usando una cavidad de forma adaptada al soluto, construida con radios de Bondi¹⁴². La naturaleza de cada especie como punto estacionario fue verificada mediante el cálculo de Hessiano analítico al mismo nivel de cálculo. Estas estructuras fueron utilizadas como ligandos para los cálculos de *docking* y dinámica molecular.

6.3.2 PREPARACIÓN DE ESTRUCTURAS DE REFERENCIA DE LAS ENZIMAS

Dado que no se cuenta con estructura experimental de la enzima caspasa-3 sin modificaciones (*wild type*), en lugar de la preparación tradicional de estructuras cristalográficas como punto de partida se usaron estructuras representativas de cada enzima extraídas por análisis de *cluster* de 100 ns de trayectoria de DM (ver protocolo detallado en 6.3.4) corridos a partir de las estructuras de difracción de rayos X de las caspasas -3 y -7 humanas, códigos PDB 1RHM¹⁴³(contiene un inhibidor unido de forma covalente que modifica la posición de cadenas laterales de los residuos del sitio catalítico) y 3IBF¹⁴⁴(no contiene ninguna modificación covalente en su estructura), desarrolladas previa eliminación de las moléculas de agua y del inhibidor presente en el caso de la

caspasa-3. Las estructuras representativas resultantes de estas dinámicas moleculares, tanto para caspasa-3 y -7 son las utilizadas como receptores para los cálculos de *docking* y dinámica molecular.

6.3.3 DOCKING LIGANDO-PROTEÍNA EN CASPASAS -3 Y -7

Usando las estructuras de los compuestos orgánicos generadas según se indica en 6.3.1 y de las enzimas según se indica en 8.3.2 se realizó su *docking* mediante el programa Autodock4.2¹²⁵, utilizando un algoritmo genético lamarckiano, para la generación de poses. En este estudio se optó por realizar 50 corridas de *blind docking*. Esto se debe a que no se contaba con información previa respecto al posible sitio de interacción de los compuestos en los receptores. Como se explicó anteriormente esta metodología da la posibilidad que el ligando interactúe en cualquier región del receptor debido a que no se agregan restricciones. Se utilizó una grilla cúbica de 126 puntos por lado, centrada en la proteína, con un espaciado de 0.6 Å.

6.3.4 SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR CLÁSICA DE LAS PROTEÍNAS Y SUS COMPLEJOS

Para estos cálculos se utilizó el programa AMBER16¹⁴⁵. Se realizó la parametrización de los ligandos mediante el módulo *tleap* del mismo programa usando el campo de fuerza GAFF y generando cargas atómicas RESP¹³¹. Para las proteínas se utilizó el campo de fuerza *ff14SB*. Tanto las proteínas en su forma tetramérica $\alpha\beta\beta\alpha$ como los complejos establecidos con los derivados se solvataron en una caja octaédrica truncada de agua explícita TIP3P extendida hasta 11 Å de los extremos de cada proteína y se llevaron a la neutralidad de carga total del sistema con iones Cl⁻ o K⁺ dependiendo de la carga neta del sistema. En primera instancia se minimizó la energía y gradiente de cada sistema usando un protocolo por etapas, en el que primero se minimiza la distribución de solvente y se contraen manteniendo la proteína restringida (500 Kcal/mol) y luego se minimiza todo el sistema libre. El protocolo combina algoritmos *steepest descent* (SD) y de gradiente conjugado (GC), se minimiza con 22.500 pasos globales (5.500 SD y 17.000 GC). Posteriormente cada sistema se calentó por etapas de 0 a 310 K y se equilibró por 200 ps, para después llevar a cabo 100 ns de producción en un ensemble NTP (utilizando termostato de Berendsen y baróstato Monte Carlo para el control de temperatura y presión, respectivamente)¹³⁶
¹³². Las interacciones electrostáticas de largo alcance dentro de la caja de agua fueron truncadas definiendo un *cutoff* de 11 Å, más allá de esta distancia las interacciones fueron determinadas utilizando el método PME. Los enlaces que involucran átomos de H fueron restringidos utilizando el algoritmo SHAKE¹⁴⁶. La integración de las ecuaciones de movimiento se realizó cada 2.0 fs. Para analizar los resultados de la trayectoria se utilizó el módulo *cptraj* del programa AmberTools16¹⁴⁵.

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1 DOCKING LIGANDO-PROTEÍNA EN CASPASAS -3 Y -7

A partir de los cálculos de *docking ligando-proteína* se determinaron posibles sitios de interacción de los potenciales inhibidores en ambas enzimas. Se realizó el análisis para derivados de tres de las series mostradas en la Figuras 3.1.1, incluyendo derivados de 2-amino-4-feniltiazol (serie B, **17-18, 21-24, 25-42, 46-54**), 4-naftiltiazol-2-amina (serie C, **55-58**, y con los sustituyentes 2-naftilamina, 4-aminotiofenol, metilpiperazina, dietilamina) y 4-feniltiazol-2-éter (serie D, **59-62**), los cuales totalizan 44 derivados. No se incluyeron derivados de la serie A debido a que ninguno presentó inhibición de la actividad de caspasa-3 en los ensayos preliminares. Al igual que para los compuestos de referencia derivados de 2-(1,4-benzodioxan)tiazol⁷⁷ para los derivados objeto de estudio en esta Tesis se identificaron dos regiones diferentes como los sitios más probables de unión no covalente a caspasa-3 y -7. Estas regiones se corresponden con la interfaz entre heterodímeros $\alpha\beta$ y con los bolsillos catalíticos de las enzimas establecidos entre las cadenas $\alpha\beta$ de cada heterodímero. Para caspasa-3 se obtuvo que los derivados de 2-amino-4-feniltiazol que presentan aminas alifáticas sin o con heteroátomos en su estructura tienden a tener mayor afinidad por la interfaz entre heterodímeros, mientras que aquellos compuestos que presentan aminas aromáticas o alifáticas con sustituyentes aromáticos tienden a interactuar en zonas cercanas al sitio activo y a los *loops* catalíticos de la enzima (Figura 6.4.1).

Los derivados de 4-naftiltiazol-2-amina presentaron un comportamiento similar a los derivados de 2-amino-4-feniltiazols. Las aminas alifáticas con y sin heteroátomos interactuaron en la interfaz entre heterodímeros mientras que aminas aromáticas o alifáticas con sustituyentes aromáticos interactuaron en regiones cercanas al sitio activo (Figura 6.4.2).

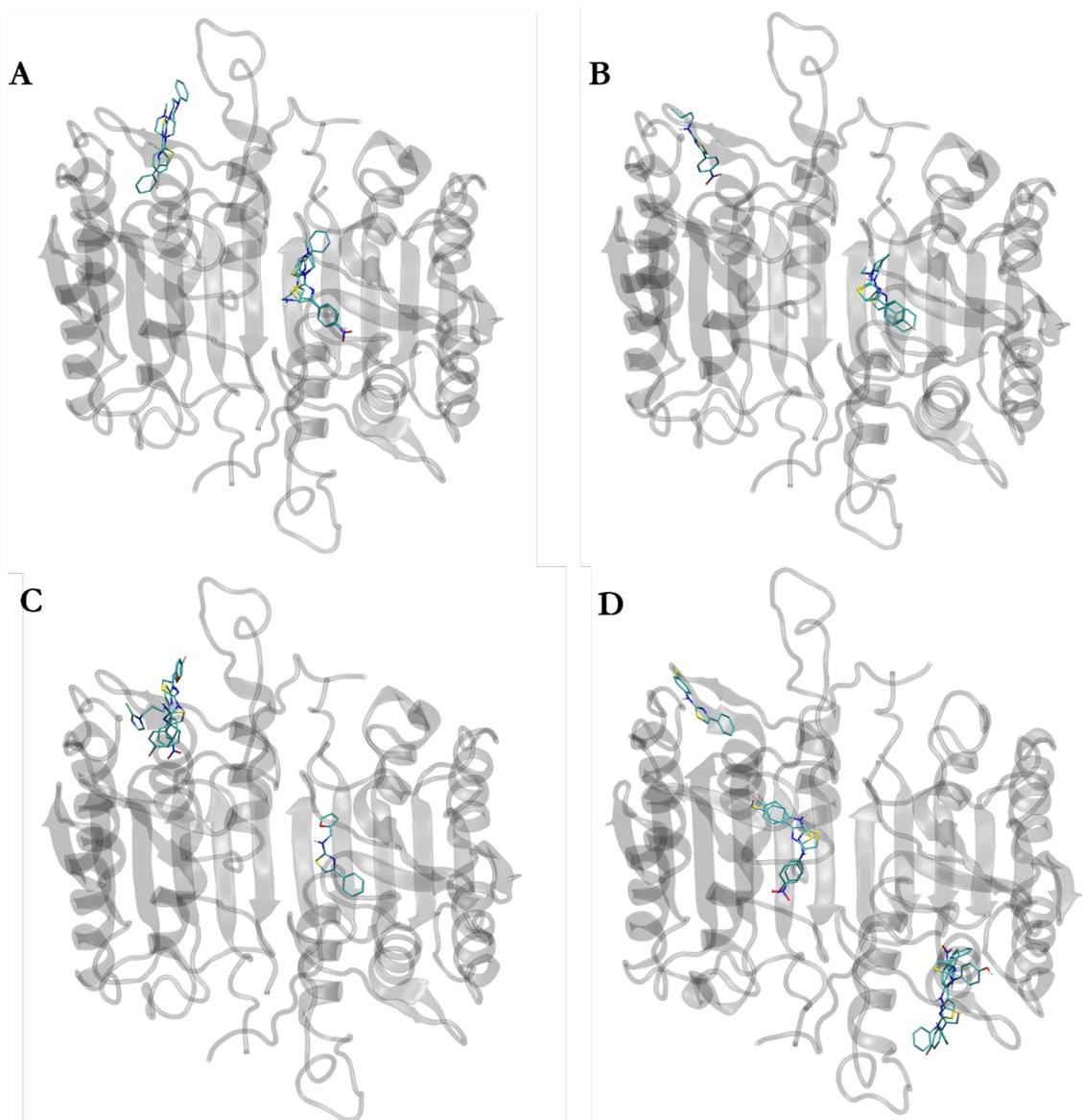


Figura 6.4.1 Sitios de interacción para los derivados de 2-amino-4-feniltiazols. A) Derivados de aminas alifáticas con heteroátomos (25-33), B) derivados de aminas alifáticas (34-36), C) derivados de aminas alifáticas con residuos aromáticos (37-42), D) derivados de aminas aromáticas (17,18, 21-24, 46-54).

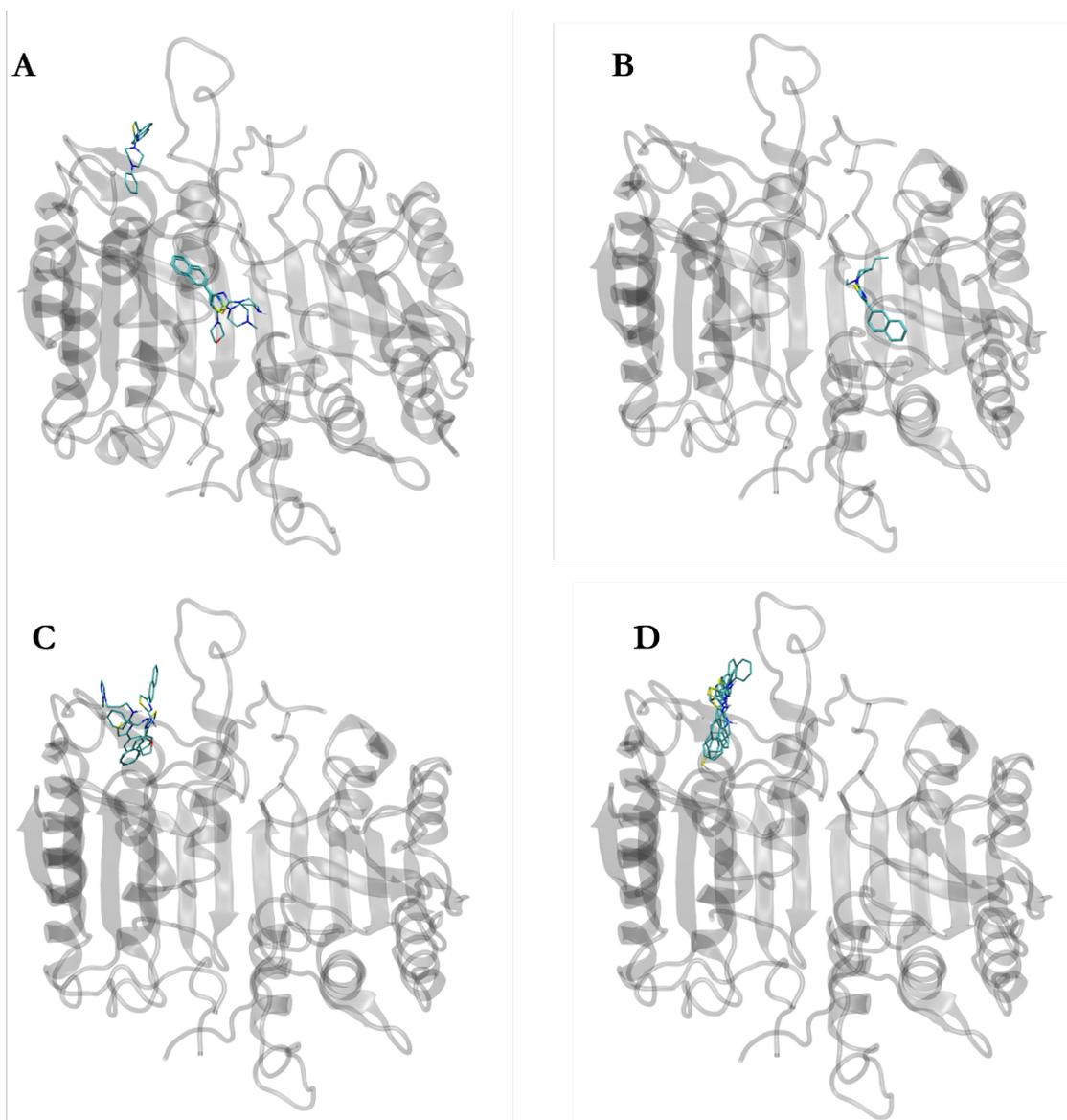


Figura 6.4.2 Sitios de interacción para los derivados de 4-naftiltiazol-2-aminas. A) Derivados de aminas alifáticas con heteroátomos (55-56, derivado con metilpiperazina), B) derivados de aminas alifáticas (derivado de dietilamina), C) derivados de aminas alifáticas con residuos aromáticos (57-58, D) derivados de aminas aromáticas (derivados de 2-naftilamina, 4-aminotiofenol).

Respecto a caspasa-7, los derivados de 2-amino-4-feniltiazol y de 4-naftiltiazol-2-amina interaccionaron en la región de los bolsillos catalíticos. En esta enzima no se observan diferencias en el posicionamiento debido al tipo de sustituyente del derivado en estudio (Figura 6.4.3).

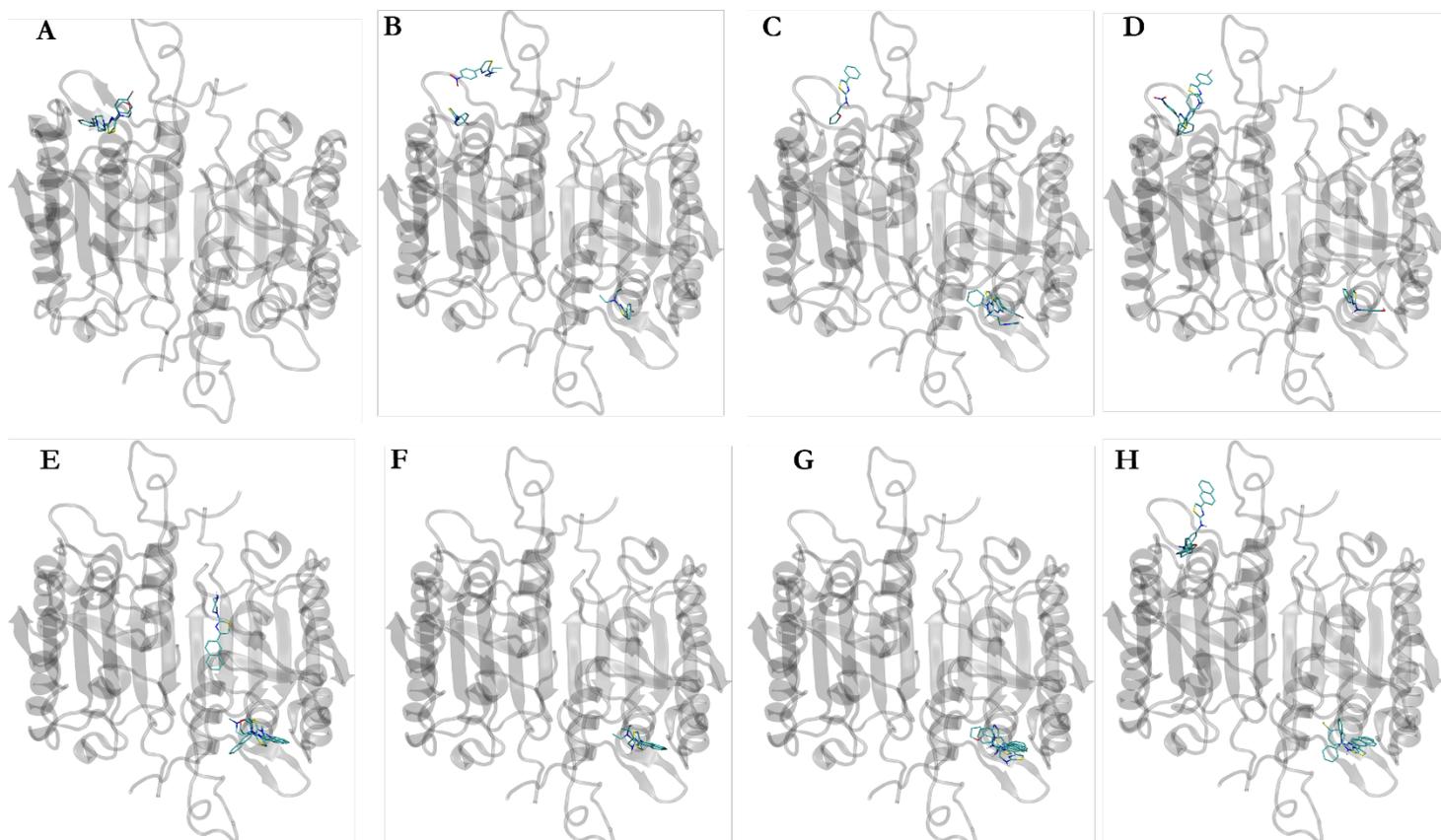


Figura 6.4.3 Sitios de interacción para los derivados de 2-amino-4-feniltiazols (A, B, C, D) y 4-naftiltiazol-2-aminas (E, F, G, H) en caspasa-7. A, E) Derivados de aminas alifáticas con heteroátomos, B, F) derivados de aminas alifáticas, C, G) derivados de aminas alifáticas con residuos aromáticos, D, H) derivados de aminas aromáticas.

Por último, para el estudio de *docking* con ambas enzimas para los derivados de 2-amino-4-feniltiazol se seleccionaron los compuestos **59**, **60**, **61** y **62**. Esto se debe a que en los estudios preliminares de inhibición de la actividad de caspasa-3 sólo se observó tal actividad para el derivado **59**. De acuerdo con los estudios de *docking*, los derivados **59**, **60** y **62** interaccionarían en los bolsillos catalíticos en caspasa-3 y el derivado **61** lo haría en la interfaz entre heterodímeros (Figura 6.4.4A). En caspasa-7 todos los derivados interaccionarían en regiones cercanas a los bolsillos catalíticos (Figura 6.4.4B).

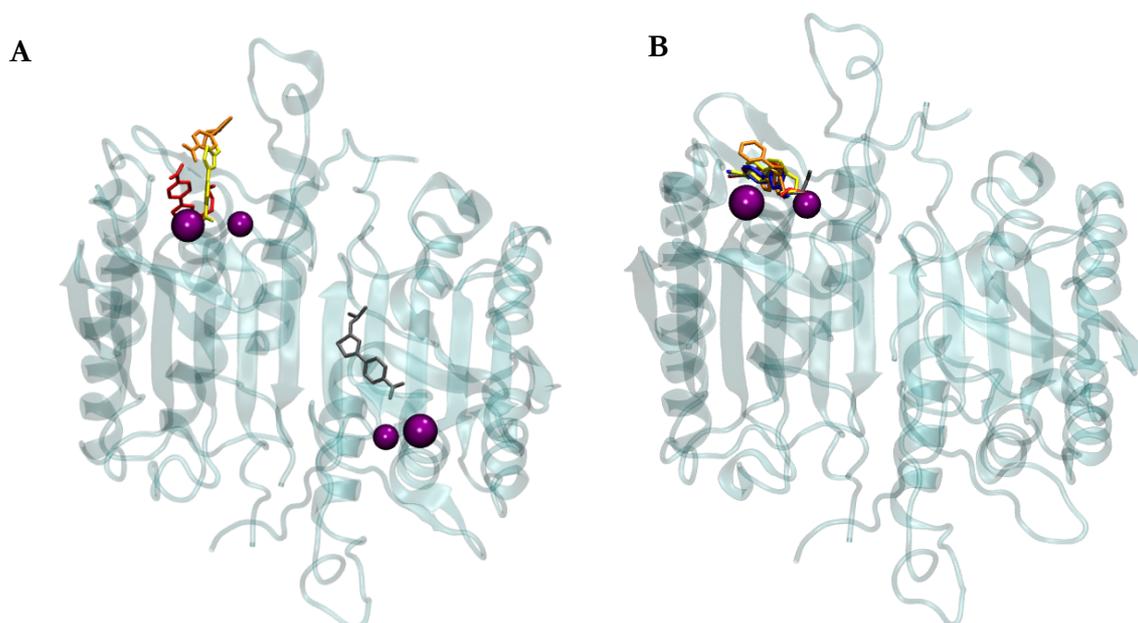


Figura 6.4.4 Sitio de interacción de los derivados de feniltiazoléteres en caspasa-3 (A) y caspasa-7 (B), en púrpura se destaca el posicionamiento de residuos catalíticos (Cys130 e His88). En *sticks* se muestra la estructura de los compuestos, **59** amarillo, **60** anaranjado, **61** gris, **62** rojo.

En cuanto a las posibles diferencias de energías de unión, que en principio permitirían establecer si alguna de las poses es favorecida energéticamente y si se observa la selectividad buscada entre caspasa -3 y -7, desafortunadamente las diferencias en esta magnitud correspondientes a los distintos complejos obtenidos es menor que el error del método (± 2 kcal/mol) por lo que no es posible extraer conclusiones a este respecto.

En suma, a partir de los cálculos de *docking* molecular fue posible estimar cuales serían los posibles sitios de interacción de los derivados analizados en ambas enzimas, destacándose la posible interacción de los compuestos en los bolsillos catalíticos y en la interfaz entre heterodímeros sitios interesantes en lo que respecta a su inhibición.

Es importante destacar que la interacción de los derivados en los bolsillos catalíticos se dio tanto en el heterodímero A como en el B. Esto llevó a realizar los cálculos de dinámica molecular de los derivados seleccionados con un compuesto en cada bolsillo catalítico de estas enzimas.

6.4.2 SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR

Debido a los resultados preliminares obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad enzimática de caspasa-3 y-7 en los que se obtuvo que los compuestos **17**, **18**, **38** y **59** presentaban buenos porcentajes de inhibición, estos cuatro compuestos fueron seleccionados para analizar por DM las características y dinámica a lo largo de 100 ns a 310 K de sus complejos con ambas enzimas, partiendo de las estructuras de sus complejos obtenidas por *docking*. Como los estudios de *docking*

llevaron a concluir que los compuestos podrían interactuar en el bolsillo catalítico de ambos heterodímeros, se optó por alojar un derivado por bolsillo en cada enzima.

Para evaluar la convergencia de la simulación se calculó el RMSD correspondiente a la posición de los carbonos α ($C\alpha$), respecto a las posiciones de una estructura de referencia. En este caso se utilizó como referencia las posiciones de los $C\alpha$ al terminar la etapa de calentamiento del sistema (Figura 6.4.5).

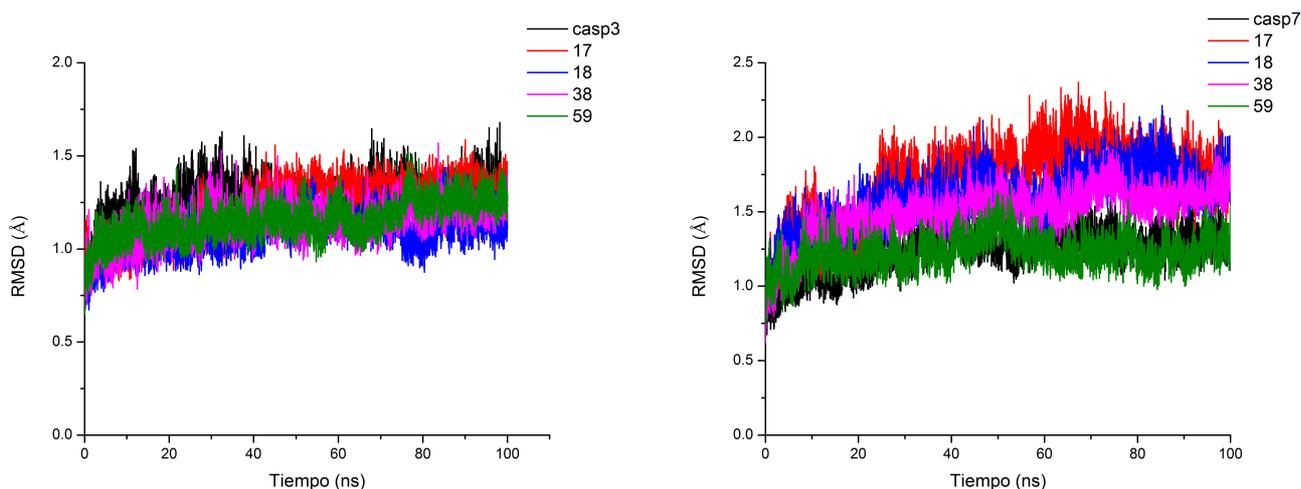


Figura 6.4.5 Evolución temporal del RMSD calculado respecto a las posiciones de los $C\alpha$ de las enzimas a lo largo de 100 ns de producción MD para caspasa-3 (izquierda) y caspasa-7 (derecha) en presencia y ausencia de ligandos (17, 18, 38 y 59).

Para ninguno de los sistemas en estudio se apreciaron diferencias significativas en RMSD (lo serían por encima de 2 Å de variación) a lo largo de los 100 ns simulados (Figura 6.4.5). Por otra parte, todos los sistemas en estudio convergieron luego de los primeros 20 ns de simulación. La presencia de los ligandos no afecta la convergencia de las simulaciones respecto a la apo-enzima.

La región estabilizada de la DM, determinada a partir del cálculo del RMSD, se utilizó para realizar el análisis de los resultados luego de la trayectoria. La estructura representativa de las enzimas en presencia y ausencia de ligando se obtuvo a través del análisis de *cluster* realizado con el módulo *cpptraj* de *AmberTools*¹⁴⁵. Para el análisis se utilizó el algoritmo *averagelinkage*¹⁴⁷. Las conformaciones se agruparon en 5 *clusters* según semejanza en las posiciones de los $C\alpha$, obteniéndose en cada uno una estructura promedio representativa del *cluster*. Para cada DM se seleccionó la estructura representativa del *cluster* con mayor cantidad de conformaciones.

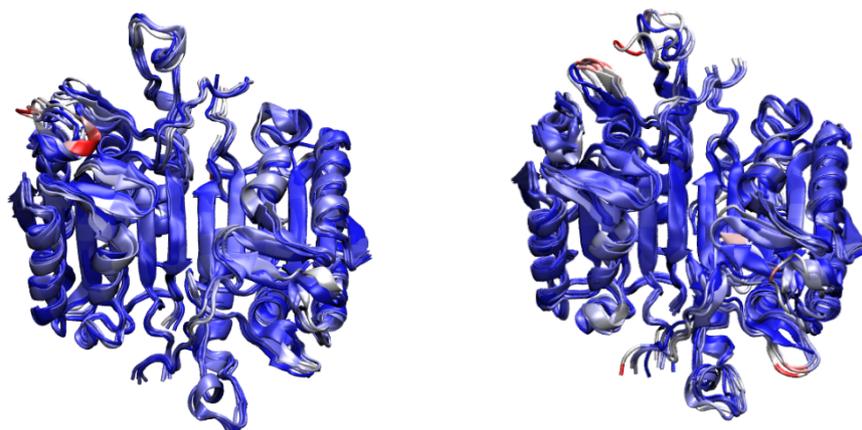


Figura 6.4.6 Superposición de las estructuras representativas obtenidas a partir de los 100 ns de producción de DM de caspasa-3 (izquierda) y caspasa-7 (derecha) en presencia y ausencia de ligandos (17, 18, 38 y 59). Las estructuras obtenidas son coloreadas según su RMSD de las posiciones de los $C\alpha$ respecto una estructura de referencia, la escala de color va del azul al rojo pasando por el blanco, donde azul es igual a la referencia y rojo cuando más se aleja de la referencia. En este caso la estructura representativa de la enzima en ausencia del ligando es la estructura de referencia.

La presencia de los ligandos no generó cambios importantes en la estructura secundaria y terciaria de caspasa-3, debido a que no se observaron variaciones las posiciones de los $C\alpha$ respecto a la estructura representativa de caspasa-3 en ausencia del ligando (Figura 6.4.6, izquierda). Para caspasa-7 se obtuvieron cambios en las posiciones de algunos *loops*, pero en términos globales no se observaron cambios en la estructura secundaria y terciaria de la enzima (Figura 6.4.6, derecha).

La fluctuación media de las posiciones de los $C\alpha$ (RMSF) se calculan respecto a las posiciones de estos átomos en la estructura representativa, para así determinar la presencia de regiones de mayor o menor flexibilidad en la proteína. Con este análisis se puede determinar si la presencia de los ligandos genera cambios en la flexibilidad de las regiones de interés en la enzima (Figura 6.4.7)

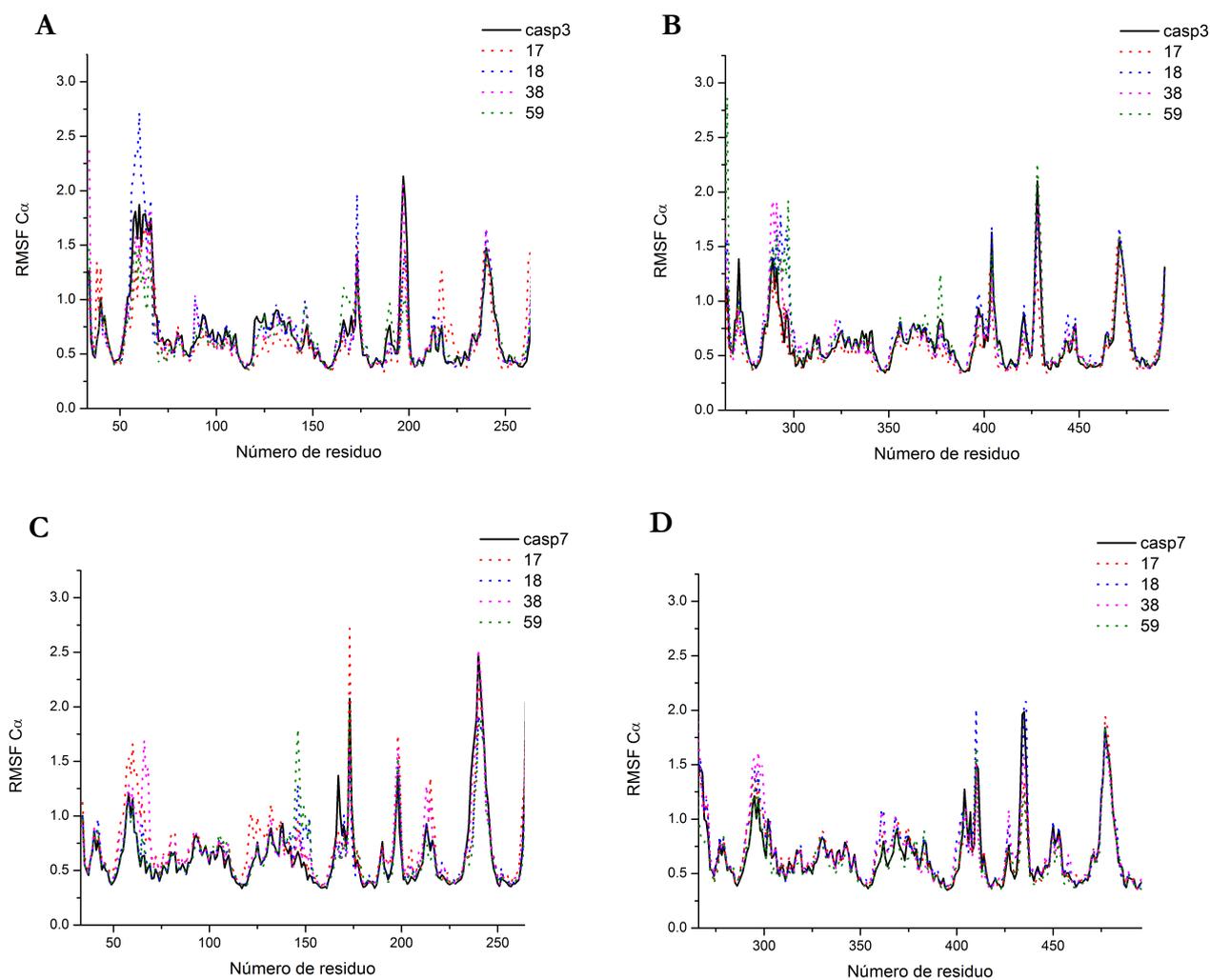


Figura 6.4.7 RMSF de las posiciones de los carbonos α de las simulaciones realizadas en presencia y ausencia de ligando, A) heterodímero A de caspasa-3; B) heterodímero B de caspasa-3; C) heterodímero A de caspasa-7; D) heterodímero B de caspasa-7.

Según los perfiles de RMSF de caspasa-3, los heterodímeros $\alpha\beta$ A y B (Figura 6.4.7 A y B) presentan perfiles de RMSFs similares, que demuestran que la enzima es poco flexible tanto en presencia como en ausencia de ligandos, por lo tanto, éstos no introducen cambios significativos en la flexibilidad del esqueleto proteico. Se analizaron las regiones de la enzima donde cambios en las fluctuaciones por presencia de los ligandos podrían representar cambios en la actividad enzimática. Entre estas regiones se analizaron las fluctuaciones de los residuos catalíticos (Cys163A/B, His121A/B), de residuos del sitio alostérico (Arg164A/B, Tyr197A/B, Pro201A/B) y de residuos de los bolsillos catalíticos S1 (Arg64A/B, Arg207A/B, Gln161A/B), S2 (Phe256A/B, Trp206A/B, Tyr204A/B), S3 (Arg207A/B), S4 (Trp214A/B, Asn208A/B, Trp206A/B) y S5

(Phe250A/B, Phe252A/B). Ninguno de estos residuos presentó cambios en las fluctuaciones por la presencia de los ligandos como se puede apreciar en los perfiles de RMSF (Figura 6.4.7). Los mayores cambios en las fluctuaciones no superaron los 0.5 Å y se dieron en los primeros residuos del heterodímero A y B, que no se corresponden con los residuos de interés.

Respecto a caspasa-7 se observó un comportamiento similar, debido a que la enzima en presencia y ausencia de ligando presentó pocas fluctuaciones. También se observó que los perfiles de RMSF de los heterodímeros A y B son similares (Figura 6.4.7 C y D). A su vez la mayor diferencia en la fluctuación por la presencia del ligando fue de 1 Å y se ubicó alrededor del residuo número 150 del heterodímero A. No obstante, en dicha región no se encuentra ninguno de los residuos de interés.

También se estudió como varía la posición de los residuos catalíticos y alostéricos de ambas enzimas en presencia y ausencia del ligando en las estructuras representativas.

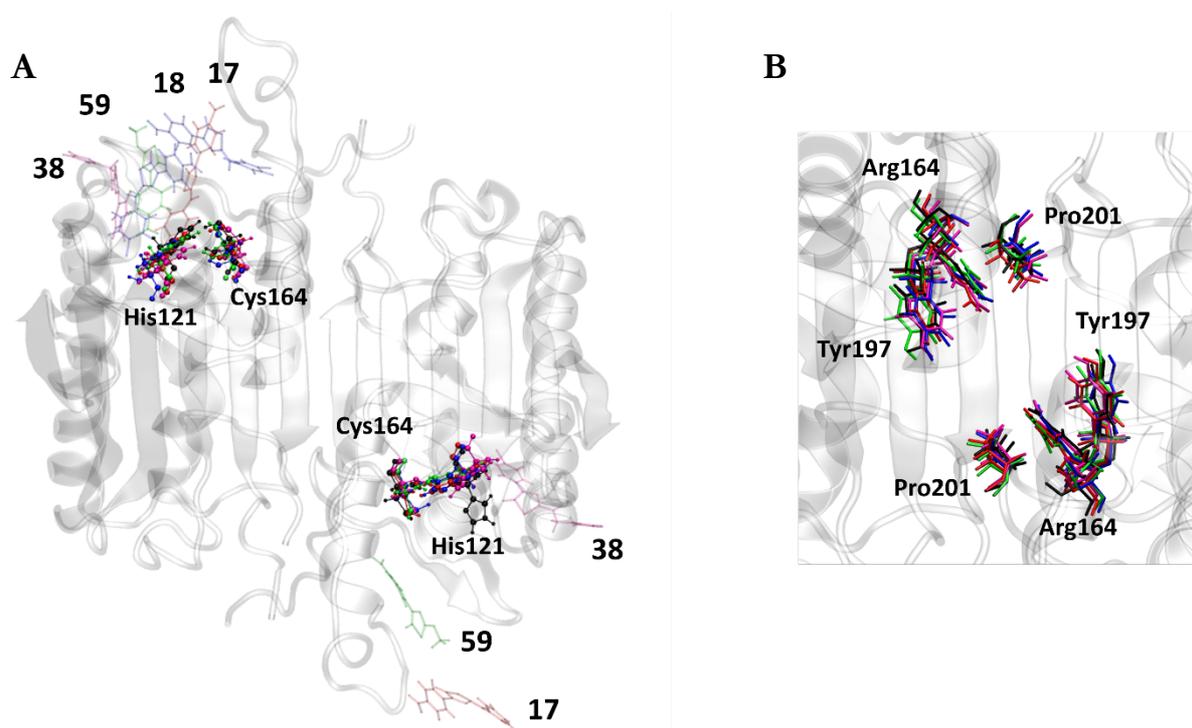


Figura 6.4.8 A) Posicionamiento de los derivados 17 (rojo), 18 (azul), 38 (magenta), 59 (verde) en caspasa-3 (negro) luego de 100 ns de DM; también se destaca la posición de los residuos catalíticos Cys163 e His121, en ambos heterodímeros, A izquierda de la imagen, B derecha de la imagen. B) Posicionamiento de los residuos alostéricos Pro201, Arg164 y Tyr197 en caspasa-3 en presencia de los derivados 17 (rojo), 18 (azul), 38 (magenta), 59 (verde) y en ausencia de ligando (negro) luego de la DM.

Respecto a los sitios de interacción en caspasa-3, se aprecia que en relación a cuanto se manejaba a partir del estudio inicial por docking, los compuestos posicionados en el heterodímero A se desplazan a otra posición sin dejar el sitio (Figura 6.4.8A). En el heterodímero B por el contrario, sólo el compuesto **59** permanece en el sitio y los demás lo abandonan dentro de los 100 ns de DM.

En cuanto a los residuos catalíticos (Figura 6.4.8A), los mismos no cambian el posicionamiento de su cadena lateral en presencia de ligando excepto para el caso del residuo His121 del heterodímero B de caspasa-3, que cambia de posición respecto a la observada en su presencia.

Respecto a los residuos alostéricos (Figura 6.4.8B), se observó que la presencia de los derivados no generó cambios en su posicionamiento. Una pérdida de las interacciones de *stacking* en este *cluster* alostérico está relacionada con la inhibición de la enzima, cuestión que pudimos corroborar en nuestro estudio exploratorio sobre complejos con derivados de 2-(1,4-benzodioxan)tiazol⁷⁸.

Finalmente, respecto a los *loops* catalíticos de ambas enzimas, se concluye que no sufren cambios significativos en sus posiciones a raíz de la presencia de los ligandos (Figura 6.4.9). En particular, no se detectan cambios en las interacciones entre estos *loops* relevantes para la actividad, que no se vería afectada para caspasa-3.

Respecto a la enzima caspasa-7 mostrada en la (Figura 6.4.9), se realizaron análisis estructurales análogos a los presentados para caspasa-3.

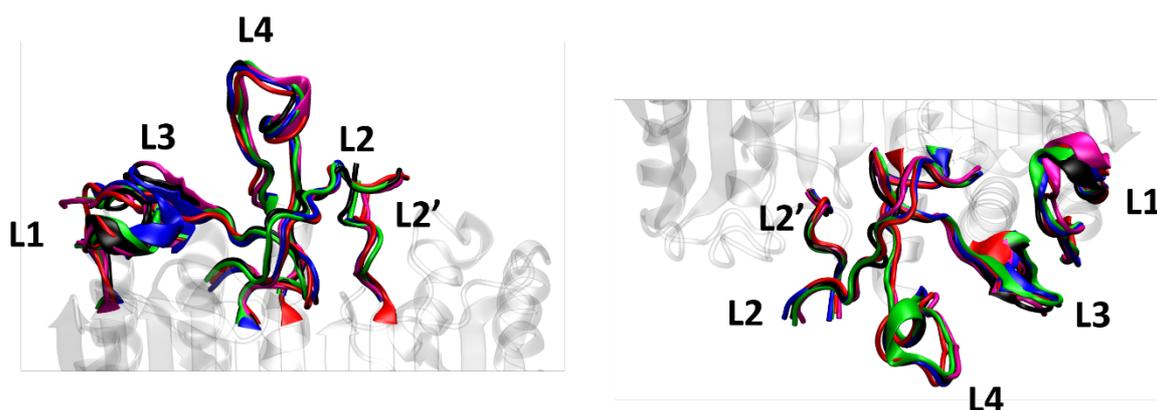


Figura 6.4.9 Posicionamiento de los loops catalíticos en ausencia de ligandos en caspasa-3 (negro) y presencia de los derivados **17** (rojo), **18** (azul), **38** (magenta), **59** (verde) luego de 100 ns de DM.

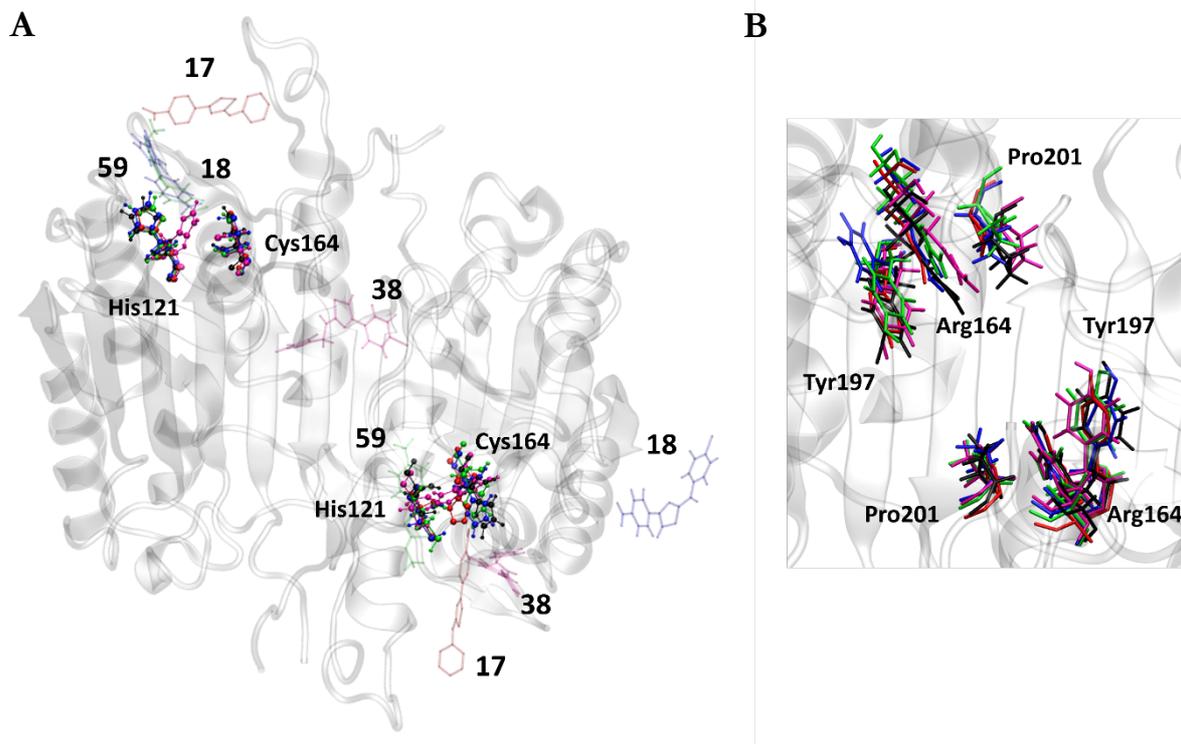


Figura 6.4.10 A) Posicionamiento de los derivados **17** (rojo), **18** (azul), **38** (magenta), **59** (verde) en caspasa-7 (negro) luego de 100 ns de DM; también se destaca la posición de los residuos catalíticos Cys163 e His121, en ambos heterodímeros, A izquierda de la imagen, B derecha de la imagen. B) Posicionamiento de los residuos alostéricos Pro201, Arg164 y Tyr197 en caspasa-3 en presencia **17**, **18**, **38**, **59** y ausencia de ligando (negro) luego de la DM.

Una vez más el posicionamiento de los derivados luego de 100 ns de DM en caspasa-7 varió respecto a su posición en el *docking* molecular (Figura 6.4.10A). En el heterodímero A sólo los derivados **59** y **18** permanecen en el sitio catalítico. El derivado **17** se movió hacia el *loop4* quedando más expuesto al solvente, mientras que el derivado **38** migró hacia la interfaz de la proteína. En el heterodímero B, los derivados **59**, **17** y **38** permanecieron en el sitio catalítico, mientras que el compuesto **18** migró hacia el solvente.

Los residuos catalíticos en ambos heterodímeros no presentaron grandes diferencias en su posición en ausencia y presencia de ligandos, únicamente la presencia del compuesto **38** generó un cambio en la posición de la cadena lateral de la His121 (Figura 6.4.10A). A nivel de la estructura secundaria y terciaria no se observaron diferencias respecto a la enzima en ausencia de ligando como se mostró en la Figura 6.4.6.

Los residuos alostéricos en ambos heterodímeros tampoco presentaron grandes cambios en sus posiciones respecto a la enzima en ausencia de ligando (Figura 6.4.10B). La presencia del

compuesto **18** generó un corrimiento de los residuos en el heterodímero A, pero no se perdió la interacción de *stacking* entre éstos. Al igual que lo observado en caspasa-3, la presencia de los ligandos no generó grandes cambios en el posicionamiento de los de los loops catalíticos que generaran cambios importantes en las interacciones entre éstos.

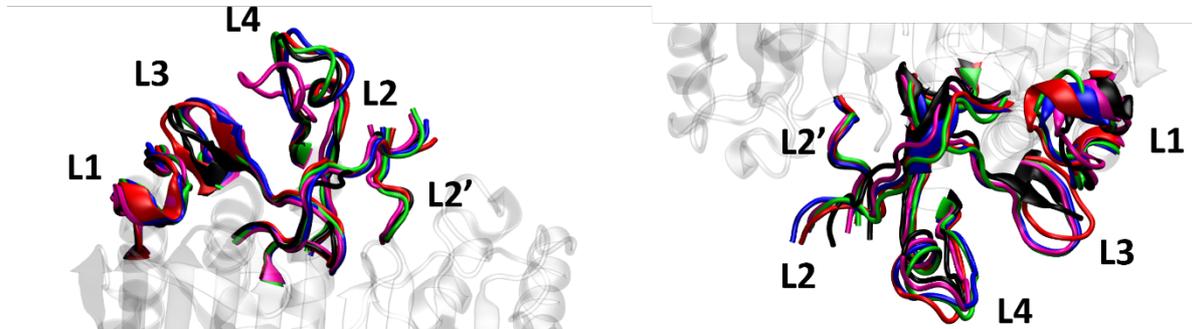


Figura 6.4.11 Posicionamiento de los loops catalíticos en ausencia de ligandos en caspasa-7 (negro) y presencia de los derivados **17** (rojo), **18** (azul), **38** (magenta), **59** (verde) luego de 100 ns de DM.

Al igual que lo observado en caspasa-3, la presencia de los ligandos no generó grandes cambios en el posicionamiento de los de los *loops* catalíticos que generaran cambios importantes en las interacciones entre éstos (Figura 6.4.11).

7. INTERACCIÓN INHIBIDOR-CASPASA POR RMN

7.1 GENERALIDADES

El conocimiento acerca de la interacción entre una biomolécula y un ligando pequeño es clave en la Química Medicinal, para comprender el modo de interacción de estos ligandos con su blanco terapéutico. Para evaluar experimentalmente estas interacciones existen diversas metodologías, entre éstas la espectroscopia de RMN se ha transformado en una técnica muy utilizada para el diseño de fármacos, debido a su capacidad de detectar la unión de pequeños ligandos a sus blancos terapéuticos incluso en el caso de compuestos que presentan baja afinidad. Una ventaja muy significativa de esta técnica es que permite estudiar las interacciones receptor-ligando en condiciones muy similares a las fisiológicas^{148,149}.

Existen dos grandes metodologías de RMN para estudiar esta interacción, aquellos abordajes que se basan en seguir los desplazamientos químicos del receptor y aquellos que se basan en seguir las señales del ligando. Estas últimas se basan en seguir las diferencias de velocidad de rotación y traslación del compuesto en solución cuando está libre o unido al receptor. Los experimentos basados en las señales del ligando tienen como ventaja que se requiere una mínima cantidad de receptor (1-10 μM) y no se requiere que la proteína se encuentre marcada isotópicamente¹⁵⁰.

Entre los experimentos que se pueden realizar se encuentra la diferencia en la transferencia de saturación (DTS). Esta técnica está fundada en el experimento diferencial del efecto truncado nuclear Overhauser (NOE). Se basa en la diferencia entre el espectro del ligando obtenido a frecuencias donde no se saturan las señales de la proteína y el espectro obtenido para el ligando cuando se satura la señal de la proteína. Si existe interacción entre la proteína y el ligando cuando se realiza la diferencia entre ambos espectros se van a observar las señales del ligando. Para lograr lo anterior se realiza un espectro de la solución conteniendo la proteína y el ligando, fuera de la resonancia de la proteína (off-resonance), para esto el centro de las frecuencias de excitación de los pulsos son aplicadas a frecuencias desprovistas de resonancia, aproximadamente 5 ppm. A su vez se realiza un espectro de dicha solución en resonancia (on-resonance) donde la frecuencia central se encuentra en 1 ppm, siendo capaz de saturar los protones metílicos de la proteína. Esta saturación se propaga virtualmente a todos los protones resonantes en la proteína por medio de la difusión de spin, así como a protones del ligando que se encuentren a no más de 5 Å. El espectro on-resonance es luego sustraído del espectro off-resonance y la aparición de señales positivas

refleja la transferencia de magnetización de los protones de la proteína al ligando, demostrando la interacción entre éstos. Por tanto, a partir de estos experimentos es posible determinar qué regiones del ligando interaccionan con la proteína según las señales obtenidas en el espectro diferencia^{151,152}.

Los experimentos de DTS pueden ser utilizados como métodos de búsqueda para la identificación de líderes en el diseño de fármacos, así como también para identificar qué grupos funcionales de los ligandos son importantes para la interacción¹⁵².

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo de DTS se realizó a 25 °C a 500 Hz en un equipo de resonancia magnética nuclear Varian Innova 500.

El ensayo de DTS realizó en una solución amortiguadora PBS pH 7.4, con un 10 % de D₂O, 2 % de DMSO deuterado, 10 % de Tween 20 y a una concentración igual a 1 mM de los derivados. Las soluciones stock de los compuestos se realizaron a 10 mM en DMSO deuterado. Caspasa-3 y -7 se evaluaron a una concentración igual a 0.1 mM.

Los espectros de DTS fueron realizados utilizando 2048 adquisiciones y una saturación selectiva de las señales de la proteína a 1 ppm (20 ppm para el espectro de referencia). La adquisición de los espectros se realizó usando una serie de 60 pulsos Gaussianos espaciados 50 ms, lo que da un tiempo de saturación total de 3.0 s, con un tiempo entre pulsos de 0.1 ms. La diferencia entre los espectros en y fuera de resonancia fue realizada por ciclaje de fase (phase cycling). La supresión de la señal de agua se realizó realizando una presaturación con *presat* para obtener la frecuencia de saturación usada con el método de supresión de la señal *dpfgse*. El tiempo total de cada experimento fue de 40 minutos. Todos los espectros fueron realizados con una ventana espectral de 7022 Hz (12 a - 2.0 ppm)¹⁵³.

7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar estos experimentos se realizó una pasantía en el **Laboratorio Multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear y de Análises e Desenvolvimento de Inibidores Enzimáticos** de la Universidad Federal de Río de Janeiro, la cual fue financiada por el llamado a pasantías en el exterior del PEDECIBA-QUÍMICA. En esta pasantía se planteó realizar los ensayos DTS para los derivados **17**, **18**, **38** y **59** debido a que en estudios preliminares habían sido capaces de inhibir la actividad enzimática de caspasa-3. Se evaluó la presencia de interacción entre estos derivados y caspasa-3 y 7. Para realizarlos es necesario que la relación entre la proteína y el

ligando sea 1:10, y que preferentemente el ligando se encuentre a una concentración de 1 mM mientras que el receptor se encuentre a 0.1 mM.

Los ensayos se realizaron en medio acuoso, en amortiguador PBS (pH 7.4) en presencia de 2 o 5 % de DMSO y 10 % de D₂O. Al evaluar la solubilidad de los compuestos se reveló que ninguno de los compuestos era soluble en dichas condiciones a concentraciones de 1 mM. Es importante destacar que se evaluó utilizar 2 o 5 % de DMSO, no encontrándose diferencias a simple vista en las soluciones. Debido a lo anterior se decidió evaluar la solubilidad de los compuestos a 1, 0.7, 0.5 y 0.2 mM, obteniéndose que los compuestos **17** y **18** sólo eran solubles a una concentración igual a 0.2 mM mientras que **38** y **59** eran solubles a 0.5 mM.

Luego de establecer las condiciones, se realizó el ensayo de DTS. En primera instancia se realizaron espectros de los ligandos en ausencia de receptor. Como los ensayos se realizaron en presencia de agua con sólo un 10 % de agua deuterada, fue necesario realizar una supresión de la señal de agua. Para esto se obtuvo el espectro de protón del compuesto realizando una presaturación (*presat*) a partir de la cual se obtuvo una supresión modesta de la señal del agua y a qué frecuencia es necesario irradiar la muestra para suprimir la señal del agua. Posteriormente se irradió la muestra a la radiofrecuencia obtenida, utilizando el método de supresión *dpfgse*, obteniendo supresión de la señal del agua mejorada.

Al realizar los espectros de supresión del agua (*presat* y *dpfgse*) sólo se pudo observar las señales del derivado **59** a una concentración igual a 0.5 mM, con señales muy bajas, y fue necesario acumular 2048 adquisiciones. Para el compuesto **38** no fue posible observar señal a una concentración de 0.5 mM, aunque no se observaron precipitados en la solución, por lo cual se supuso que el compuesto formaba agregados en suspensión en PBS. Debido a lo anterior se realizó un espectro de **38** a 0.2 mM con 2048 adquisiciones, en este ensayo fue posible observar las señales del compuesto pero con muy poca intensidad. Respecto a los compuestos **17** y **18**, no fue posible observar señales a 0.2 mM debido a que los compuestos comenzaron a precipitar al cabo de una hora, formando precipitados insolubles en PBS¹⁵⁴.

Debido a los resultados obtenidos a través de los espectros de RMN, donde fue posible corroborar la falta de solubilidad de los compuestos en la solución a amortiguadora utilizada, se decidió adicionar el detergente Tween 20 para promover la solubilidad de los compuestos en PBS. Para lo anterior se evaluó mediante una inspección visual si se formaban o no precipitados en solución con distintas concentraciones de Tween 20, se probó 0.2 % y 1 %. Se dejaron duante toda la noche y al otro día fue posible observar la presencia de precipitados. Como en el artículo de referencia¹⁵⁴ utilizaban una concentración de 10 % de Tween se decidió agregar dicha concentración,

obteniéndose una disolución total de los compuestos a 1 mM. Tampoco se observaron precipitados del compuesto con el tiempo. Se eligió Tween como co-solvente porque no presenta señales en la región de los aromáticos (de 6 a 8 ppm), sitio donde se encuentra la mayoría de las señales de los compuestos de interés.

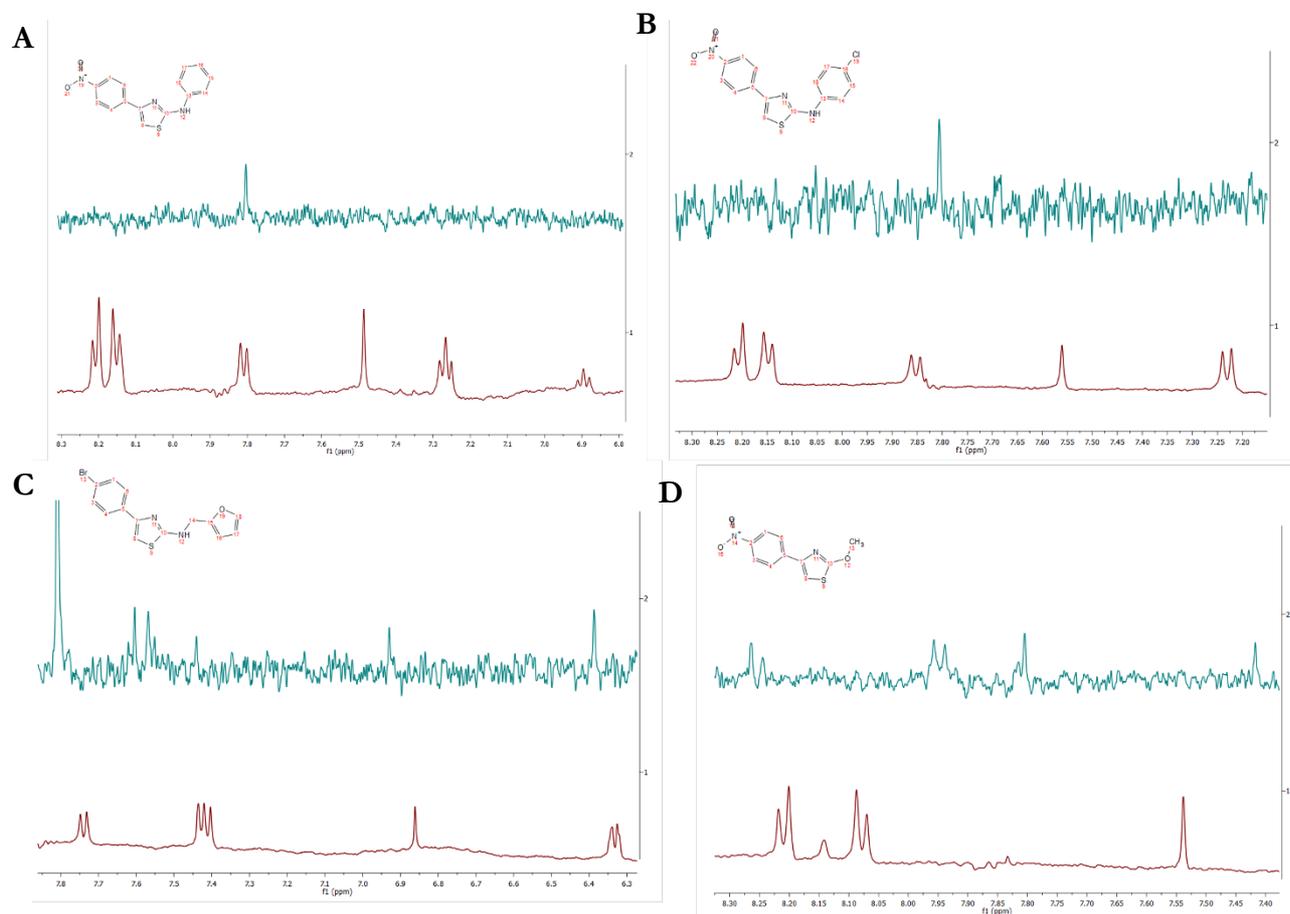


Figura 7.3.1 Espectro ^1H de los derivados a 1 mM A) **17**; B) **18**; C) **38**; D) **59** en PBS (2 % DMSO), en ausencia (verde) y presencia de 10 % Tween20 (rojo).

En las nuevas condiciones del ensayo, fue posible determinar el espectro ^1H de los cuatro compuestos (Figura 7.3.1). Por tanto, es la insolubilidad la responsable de no poder observar las señales de ^1H en los espectros de RMN en PBS con 2 % de DMSO.

Se realizó el ensayo de DTS para el compuesto **59** a 0.5 mM con caspasa-3 en PBS (2 % de DMSO) debido a que se logró observar el espectro en esta solución amortiguadora. Lamentablemente no se observaron señales luego del ensayo, se realizaron 20480 adquisiciones (unas 18 h de ensayo). Por la baja concentración del compuesto y la baja intensidad de las señales observadas, es posible intuir que en el tiempo del ensayo los compuestos formaban agregados solubles. Por tanto, con este resultado no fue posible discernir si la ausencia de señales se debió a que el ligando no se unía

a la proteína o a que la diferencia entre las señales era tan pequeña que no era observable con la resolución del ensayo

Con la incorporación de 10 % de Tween 20 a la solución amortiguadora PBS (2 % DMSO) se realizó el ensayo de DTS entre los compuestos y caspasa-3 y -7. En estos ensayos se siguió el mismo protocolo. En primer lugar se realizó una pre-saturación de la señal del agua (*presat*) y luego una supresión de la señal del agua mejorada (*dpf/se*). Posteriormente se realizó el ensayo de DTS, el mismo se realizó con 2048 adquisiciones de la señal.

Para la interacción entre los compuestos y caspasa-3 no fue posible identificar señales que indicaran interacción entre la enzima y los compuestos. Como se muestra en la Figura 7.3.2, no fue posible encontrar diferencias entre el espectro de la saturación de la señal del agua (Figura 7.3.2, espectro color azul) y el espectro correspondiente a la DTS (Figura 7.3.2, color verde), lo que indica que no existiría interacción entre los compuestos y caspasa-3 en esas condiciones ya que no habría una transferencia entre la enzima y el derivado.

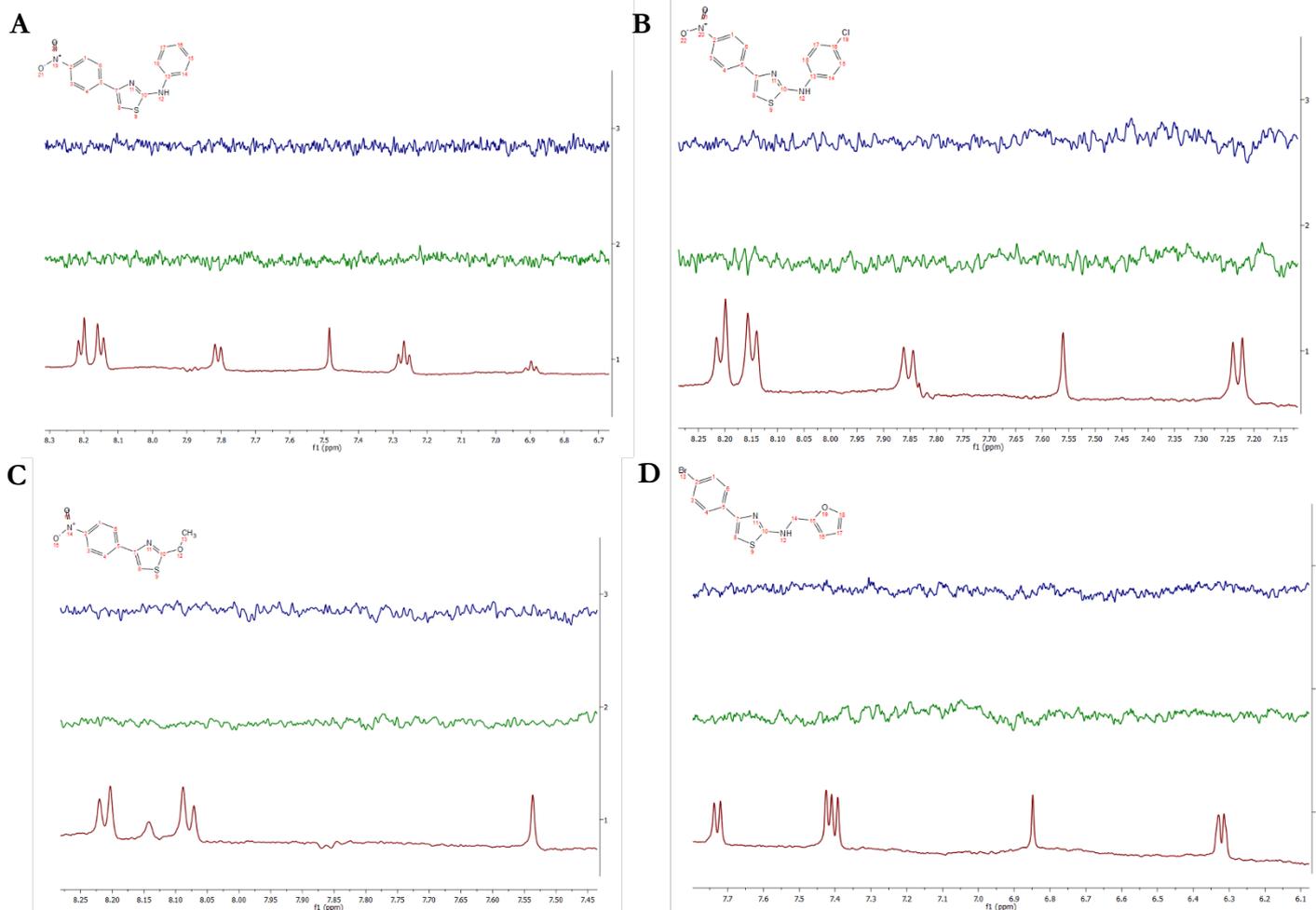


Figura 7.3.2 Espectro ^1H del ensayo DTS de los derivados (1 mM) en presencia de caspasa-3 (0.1 mM) A) 17; B) 18; C) 38; D) 59 en PBS (2 % DMSO) y Tween20 al 10 %. En azul se muestra el espectro luego de la saturación de la señal del agua, en verde el espectro de la DTS y en rojo el espectro de los compuestos.

Para la enzima caspasa-7 y los compuestos en estudio tampoco se pudo observar señales que indicaran interacción entre los mismos (Figura 7.3.3).

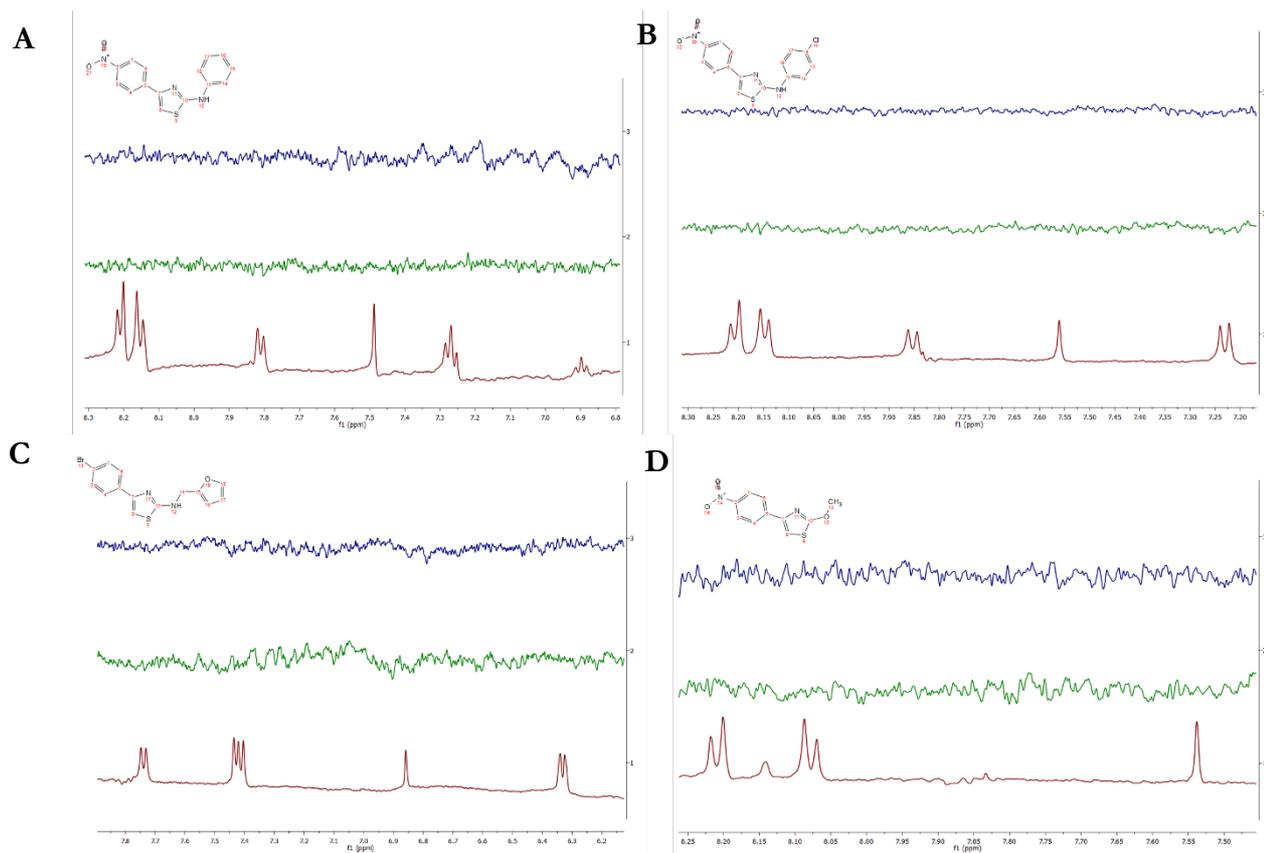


Figura 7.3.3 Espectro ^1H del ensayo DTS de los derivados (1 mM) en presencia de caspasa-7 (0.1 mM) A) **17**; B) **18**; C) **38**; D) **59** en PBS (2 % DMSO) y Tween20 al 10 %. En azul se muestra el espectro luego de la saturación de la señal del agua, en verde el espectro de la DTS y en rojo el espectro de los compuestos.

En suma, no fue posible identificar mediante los análisis realizados interacción entre los compuestos y las enzimas caspasa-3 y -7. Cabe destacar que no se conoce qué efecto tiene el 10 % de Tween 20 en la enzima, el cual fue incorporado en el ensayo para mejorar la solubilidad de los compuestos.

8. REEVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN EN CASPASA-3

8.1 GENERALIDADES

Sobre el final de la Tesis, se decidió realizar nuevos experimentos respecto a la capacidad de los compuestos de inhibir caspasa-3 y -7 con el fin, en principio, de caracterizar el tipo de inhibición. En particular, se pretendía estudiar la cinética de inhibición con el fin de comprender en qué escala de tiempo se alcanzaba el equilibrio entre la enzima y el inhibidor. Se pretendía estudiar también el mecanismo de inhibición, si los inhibidores eran irreversibles o reversibles y, en este último caso, si se estaba ante inhibidores competitivos o de otro tipo.

Para obtener dicha información, se realizó la reevaluación de los compuestos que en los ensayos preliminares a 100 μM de compuesto habían presentado inhibición de la actividad de caspasas-3, en este caso se consideraron porcentajes de inhibición aceptables aquellos mayores a 60 %, seleccionando entonces a los compuestos **17**, **18**, **38** y **59**. En primer lugar, se evaluaron los derivados a la misma concentración del ensayo preliminar para repetir los resultados obtenidos previamente.

A su vez, se evaluó la capacidad inhibitoria de la actividad de caspasa-7 de los compuestos seleccionados a partir de los ensayos de actividad preliminares en caspasa-3.

8.2 REEVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3

8.2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar los ensayos de inhibición de la actividad en caspasa-3 y -7 se llevó a cabo el mismo procedimiento explicado en el punto 4.3.1 de la presente Tesis.

8.2.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar la reevaluación de los derivados en caspasa-3 no fue posible reproducir los porcentajes de inhibición de la actividad de caspasa-3 obtenidos en los ensayos preliminares. Para los derivados **17** y **18**, en la reevaluación se obtuvieron valores máximos de 40 y 39 %, respectivamente; en los ensayos preliminares habían presentado porcentajes de inhibición de 82 y 84 %, respectivamente. Además, los valores presentaban alta dispersión y no era posible reproducir los resultados entre un experimento y otro.

Para los compuestos seleccionados **38** y **59** sucedió algo similar, no fue posible repetir los porcentajes de inhibición obtenidos en la evaluación preliminar y los nuevos valores obtenidos no eran reproducibles. Para el compuesto **38** no se logró obtener inhibición, debido a que el valor máximo obtenido rondó el 14 % de inhibición. Para el compuesto **59** la inhibición máxima obtenida en la evaluación rondó el 20 %.

En esta oportunidad se evaluó también la capacidad inhibitoria de la actividad de caspasa-7, obteniéndose para los cuatro compuestos seleccionados valores cercanos al 10 % de inhibición.

Para tratar de comprender la falta de actividad inhibitoria de caspasa-3 y la variabilidad en los resultados se siguieron distintas estrategias. Se evaluó si los compuestos eran capaces de interferir en la emisión de fluorescencia del AMC, y que dicha interferencia fuera la responsable de los falsos positivos de inhibición observados en los ensayos preliminares. A su vez, se estudió si los compuestos sufrían algún tipo de cambio al estar en la solución amortiguadora de actividad y cómo se comportaban en la solución, lo que pudiera contribuir a la variabilidad de los resultados obtenidos.

8.3 CONTROL DE INTERFERENCIA DE LOS COMPUESTOS EN LA MEDIDA DE FLUORESCENCIA

En esta instancia, debido a la estructura de los compuestos seleccionados, principalmente la presencia del agrupamiento nitro, se analizó la posibilidad de que los compuestos pudieran generar alguna interferencia en la fluorescencia del producto de la reacción enzimática, AMC. Para esto se realizó un control de la interferencia de los compuestos en la medida de fluorescencia.

8.3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó la posible interferencia de los compuestos en la medida de fluorescencia a una concentración de AMC de 0.6 μM . Esta concentración de AMC correspondía a un 10 % de producción de AMC en el ensayo enzimático realizado con 6.6 μM de sustrato según los ensayos preliminares de inhibición.

En cada pocillo se adicionó el compuesto a una concentración igual a 100 μM , que era la utilizada en los ensayos preliminares, 0.6 μM de AMC, y solución amortiguadora de actividad. La cantidad de DMSO en el pocillo fue de 1 %. Los pocillos que contenían derivados se realizaron por duplicado y los pocillos que sólo presentaban AMC se realizaron por cuadruplicado.

La interferencia por parte de los compuestos se evaluó realizando espectros de emisión (400 a 500 nm) con una $\lambda_{excitación} = 380$ nm. Para estimar en cuánto disminuía la fluorescencia por la presencia de cada derivado, se midió el valor de la fluorescencia a 440 nm ($\lambda_{emisión}$ del AMC).

8.3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar si los compuestos seleccionados eran capaces de interferir en la emisión de fluorescencia del AMC, se registró el espectro de emisión de AMC (400-500 nm) en presencia de 100 μ M de los compuestos **17**, **18**, **38** y **59** (Figura 8.3.1).

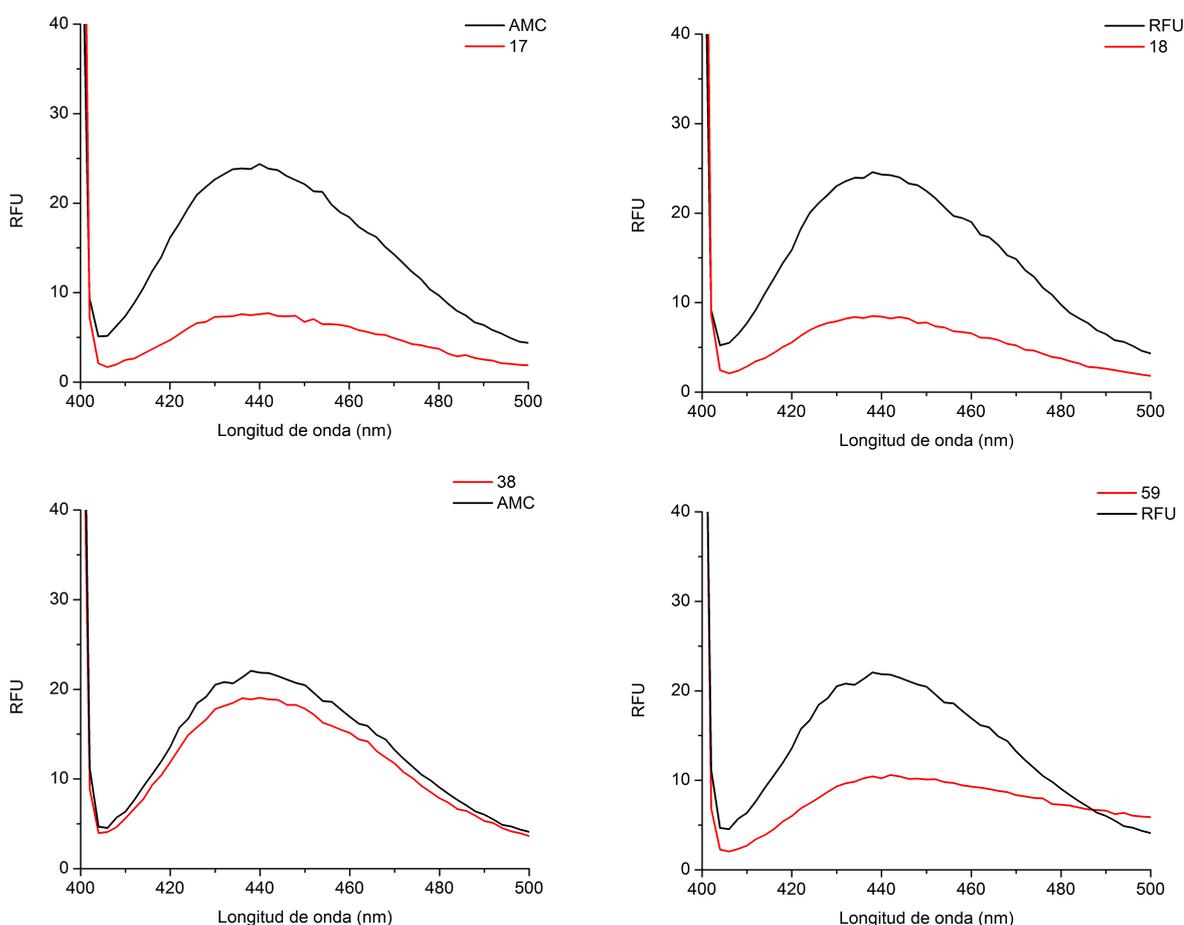


Figura 8.3.1 Espectros de emisión ($\lambda_{excitación} = 380$ nm) de fluorescencia de la AMC (0.6 μ M) en presencia y ausencia de los derivados **17**, **18**, **38** y **59** (100 μ M), en la solución amortiguadora de actividad con 1 % de DMSO.

Los derivados **17**, **18** y **59**, que presentan el agrupamiento nitro en su estructura, interfirieron en la emisión de la fluorescencia de AMC. Esta interferencia puede deberse a un efecto de filtro interno debido a la absorbancia y/o dispersión de la luz por parte de los compuestos. También puede deberse a un efecto de apagamiento (*quenching*) dinámico o estático, de la fluorescencia. El compuesto **38** presentó el menor efecto en la emisión (Figura 8.3.1).

Teniendo en cuenta la interferencia de los derivados seleccionados, se volvió a evaluar su capacidad inhibitoria de la actividad de caspasa-3. Simultáneamente se realizaron curvas de calibración de AMC en presencia de los derivados, esto posibilita obtener los valores de inhibición corregidos por dicha interferencia. Considerando entonces los aportes de la interferencia por parte de los compuestos a la inhibición de la actividad de caspasa-3, se volvieron a calcular los porcentajes de inhibición. Para los derivados **17** y **18**, los porcentajes de inhibición se redujeron a la mitad respecto a los valores de inhibición de la actividad de caspasa-3 en los ensayos prelimines obtenidos previamente a esta etapa de reevaluación. Para el derivado **59**, no se observó inhibición. Por lo tanto, para el derivado **59**, el resultado preliminar obtenido acerca de que inhibía la actividad caspasa se puede explicar por una interferencia en la medida de fluorescencia.

8.4 ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD EN LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ACTIVIDAD

Para profundizar en por qué no fue posible reproducir los resultados preliminares de inhibición de la actividad de caspasa-3, particularmente para los derivados **17**, **18** y **38**, se trató de comprender si estos derivados en la solución amortiguadora presentaban problemas de solubilidad o sufrían cambios en su estructura que impidieran la repetición de los resultados preliminares.

En primer lugar, se realizó una inspección visual de las soluciones de los derivados **17**, **18** y **38** a 100 μM en la solución amortiguadora de actividad. Se observó que las soluciones estaban turbias, por lo cual los derivados no estaban solubilizados completamente.

Adicionalmente, se realizaron espectros de absorbancia UV-Vis de los derivados a la concentración del ensayo de inhibición (100 μM) a distintos tiempos, para observar si la permanencia de los derivados en esta solución acuosa generaba cambios en sus espectros. Se evaluó lo que sucedía a tiempo 0 y luego de 60 minutos. Esto representa el tiempo de incubación de los derivados en presencia de la enzima en el ensayo de inhibición. A su vez estos espectros se realizaron en presencia y ausencia de la enzima caspasa-3, para evaluar que, en caso que se observaran cambios, éstos fueran promovidos por la enzima (Figura 8.4.1). En todos los espectros se restó la contribución a la absorbancia de la solución amortiguadora de actividad que absorbía a longitudes de onda menores a 270 nm.

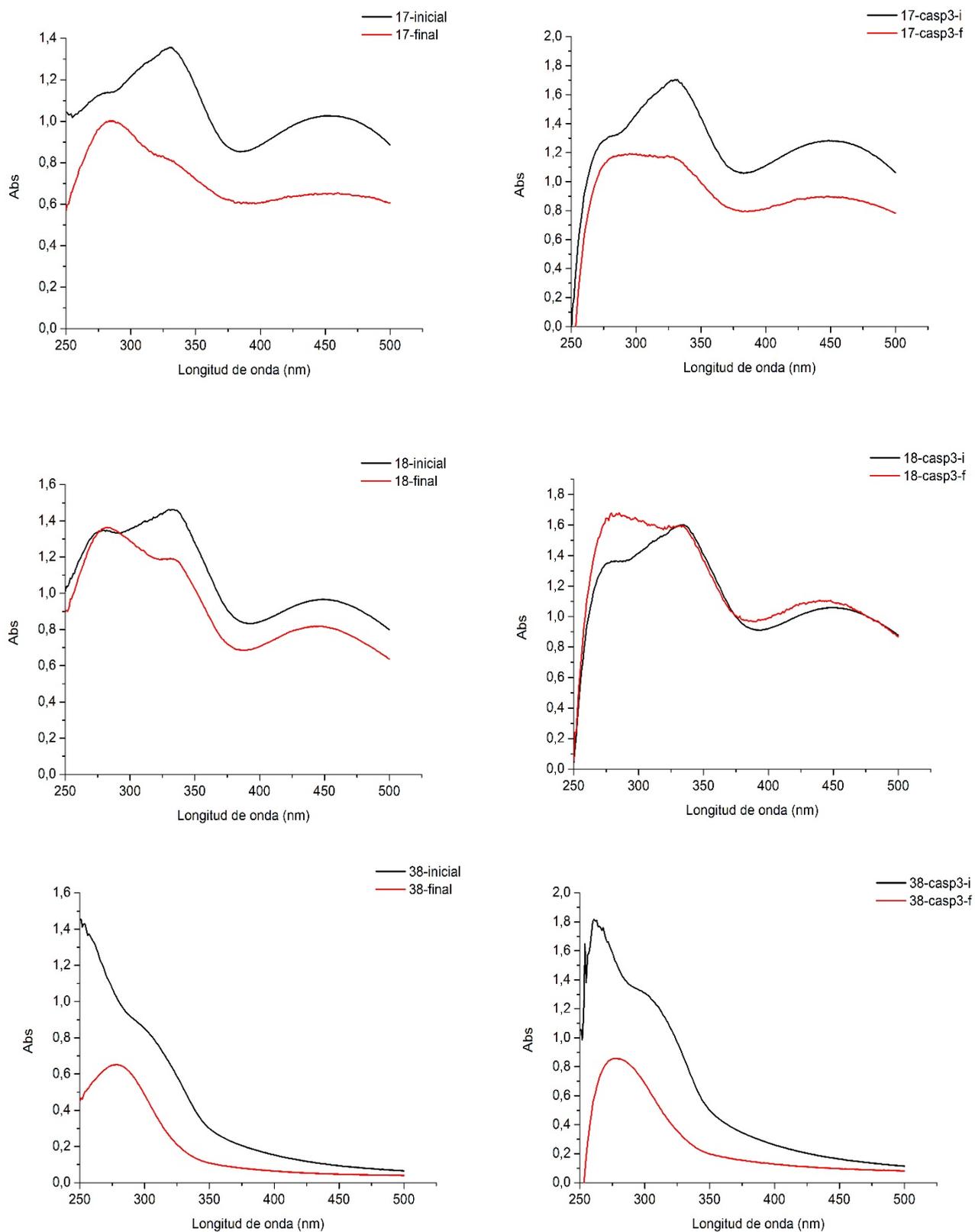


Figura 8.4.1 Espectros de los derivados **17**, **18** y **38** en ausencia (A, C, E) y presencia de caspasa-3 (B, D, F) al inicio de formar la solución a 100 μ M en el amortiguador de actividad (pipes pH 7.2) y luego de 60 minutos a 37 $^{\circ}$ C. En todos los espectros se restó la contribución a la absorbancia de la solución amortiguadora de actividad que absorbía a longitudes de onda menores a 270 nm.

Como se muestra en la Figura 8.4.1, los derivados **17**, **18** y **38** presentaron absorbancia a todas las longitudes de onda, esto indicaría dispersión de la luz y que los derivados no fueron capaces de solubilizarse en la solución amortiguadora. Los derivados mostraron también picos u hombros en la zona de 300-350 nm. En el caso de los compuestos **17** y **18**, que presentan grupos nitro, también se observaron picos en la zona de 450 nm. Al cabo de una hora, se observó una disminución en la absorbancia a todas las longitudes de onda, esto podría indicar que a medida que pasa el tiempo los derivados precipitan, lo que genera una disminución en la absorbancia.

La presencia de caspasa-3 en las mezclas solo parece afectar al derivado **18** donde no se observó una disminución en la absorbancia luego de los 60 minutos de incubación a 37 °C, como sí se evidenció para los demás derivados (Figura 8.4.1 B, D, F).

Adicionalmente, se evaluó cómo variaban los espectros de estos compuestos en los 60 minutos de incubación, para esto se realizaron espectros cada 15 minutos de los derivados en ausencia de caspasa-3 (Figura 8.4.2).

Al realizar los espectros cada 15 minutos (Figura 10.4.2) se observó que, en general, la absorbancia iba disminuyendo a medida que pasaba el tiempo. Luego de 60 minutos de incubación se obtuvieron valores de absorbancia menores a los observados en el ensayo anterior (Figura 10.4.1), a su vez no siempre a un tiempo mayor disminuía la absorbancia (Figura 10.4.2 B y C). Esto muestra la variabilidad que produce la falta de solubilidad de los derivados en la solución amortiguadora, debido a que en cada mediada no se conoce exactamente cuánta concentración se está midiendo. Esto podría explicar en cierta medida la imposibilidad de reproducir los ensayos preliminares de inhibición de la actividad de caspasa-3.

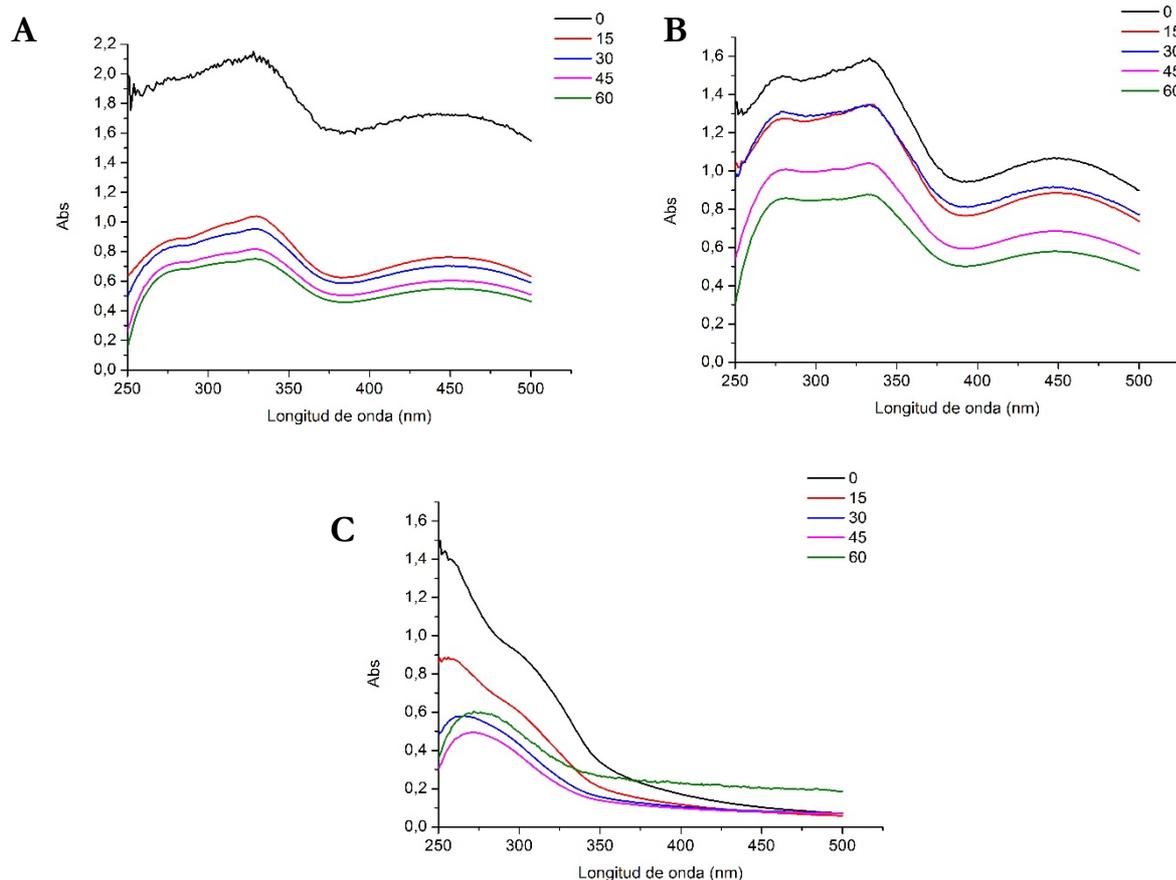


Figura 8.4.2 Espectros de los derivados **17**, **18** y **38** (A, B, C) inmediatamente de mezclado a 100 μ M en la solución amortiguadora de actividad y cada 15 minutos hasta 60 minutos a 37 °C totales. En todos los espectros se restó la contribución a la absorbancia de la solución amortiguadora de actividad que absorbía a longitudes de onda menores a 270 nm.

Para avanzar en la comprensión de por qué no fue posible reproducir la inhibición de la actividad de caspasa-3 del derivado **38**, que presentaba muy poco efecto de interferencia con el AMC, se realizaron incubaciones del derivado (100 μ M) en solución amortiguadora de actividad a 37 °C durante 1 h y 1 h y 30 minutos, y se realizaron extracciones del derivado con acetato de etilo. Se realizó CCF para identificar si había cambios en su estructura. También se realizó la extracción de un blanco que estaba formado únicamente por solución amortiguadora de actividad y el mismo porcentaje de DMSO al usado en el ensayo.

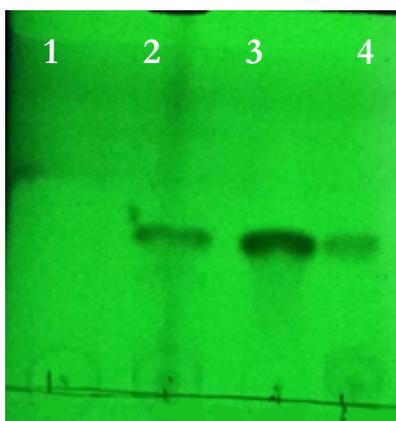


Figura 8.4.3 Cromatografía en capa fina (fase estacionaria: sílica, fase móvil: hexano:acetato de etilo 8:2). **1** representa al blanco, **2** a lo extraído luego de 1 hora de incubación a 37 °C, **3** al patrón del derivado y **4** a lo extraído luego de incubación por 1 hora y 30 minutos a 37 °C. No se sembró la misma cantidad de cada muestra, por lo tanto este resultado es únicamente cualitativo.

No se observaron cambios en la CCF para el derivado **38**, lo que indicaría que luego de estar 1 h y 1 h 30 minutos en solución amortiguadora, este derivado no presentaría modificaciones en su estructura.

Adicionalmente se realizaron ciclos de sonicado del compuesto **38** en solución amortiguadora de actividad a la misma concentración del ensayo de actividad (100 μM), para observar si mejoraba la solubilidad del compuesto en solución. Para identificar cambios se realizó una inspección visual de la solución y posteriores espectros de absorbancia.

Se sonicó la muestra por 8 minutos. Para evitar el calentamiento, el sonicado se realizó en ciclos de 2 min. En la inspección visual de la muestra no se detectaron mejorías en la turbiedad de la solución entre los ciclos de sonicado. En el espectro UV-Vis se observa absorbancia a todas longitudes de onda, lo cual sugiere que los ciclos de sonicado realizados no aumentaron la solubilidad del compuesto **38** (Figura 8.4.4).

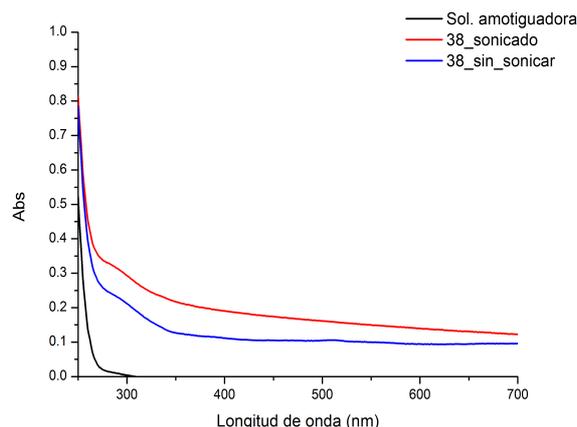


Figura 8.4.4 Espectros de la solución amortiguadora (negro), compuestos **38** luego de sonicar (rojo) y sin sonicar (azul) a una concentración igual a 100 μ M en la solución amortiguadora de actividad con 1 % de DMSO.

El compuesto **38** se dejó a temperatura ambiente en la solución amortiguadora de actividad por 2 h y se volvieron a realizar espectros.

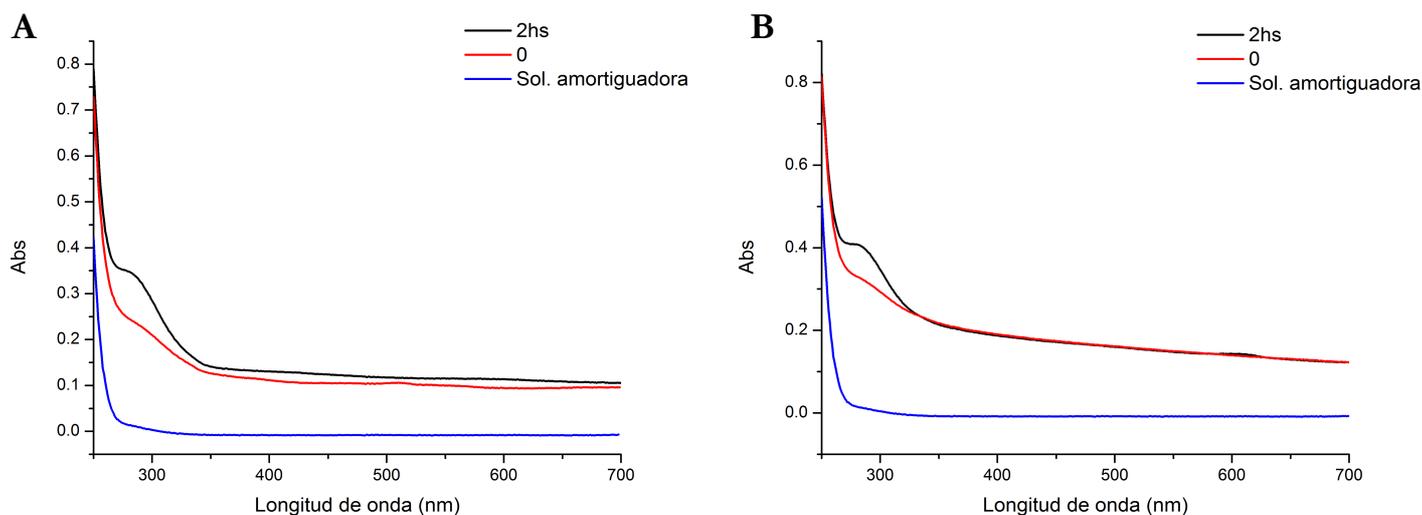


Figura 8.4.5 Espectros del compuesto **38** a 100 μ M en la solución amortiguadora de actividad a tiempo cero y luego de 2 h a temperatura ambiente, de la mezcla sin sonicar (A) y sonicada (B).

Luego de dejar la mezcla a temperatura ambiente por 2 h sin sonicar y sonicada (Figura 8.4.5 A y B) no se observan diferencias en los espectros del compuesto **38**. Sí se observan diferencias entre los espectros a tiempo cero y luego de 2 h en ambos ensayo.

En su conjunto, estos resultados demuestran la variabilidad en el comportamiento del compuesto **38** en la solución amortiguadora de actividad.

9. DISCUSIÓN GENERAL

En la presente Tesis se planteó realizar un abordaje multidisciplinario para encontrar nuevas moléculas como posibles inhibidores de caspasa-3. Con este abordaje se pretendía acortar camino en el diseño de fármacos, debido a que con las metodologías propuestas se pretendía realizar una buena caracterización de los compuestos propuestos para acercarnos a la selección de compuestos con el perfil adecuado para ser incluido en ensayos *in vivo*.

La hipótesis de este trabajo se centró en que derivados de 4-fenil-1,3-tiazol serían capaces de inhibir de forma reversible y selectiva a la actividad de la enzima caspasa-3. Para esto, nos basamos en inhibidores de caspasa-3 reportados, los cuales eran derivados de 2-(1,4-benzodioxanos)-1,3-tiazol⁷⁷. Nos basamos también en un estudio teórico-computacional donde se estudiaron en detalle los sitios de interacción y la dinámica de interacción de los compuestos con las enzimas, realizado por nuestro grupo de investigación previamente al comienzo de esta tesis⁷⁸.

La síntesis de los derivados de 4-fenil-1,3-tiazol no tuvo buenos porcentajes de rendimiento. No obstante, fue posible obtener un buen número de compuestos que presentaron variaciones estructurales. Dentro de las series sintetizadas, para la Serie A, derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-carbamato, únicamente los derivados alifáticos pudieron obtenerse, con rendimientos moderados. Respecto a la Serie B, derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol, donde se pretendía explorar diversos sustituyentes en la posición 2 del anillo tiazólico, la mayoría de los derivados se obtuvieron con rendimientos moderados, pero como se discutió anteriormente, la naturaleza de las aminas utilizados no siempre permitía el desarrollo de la reacción de síntesis. La Serie C, derivados de 2-amino-4-naftil-1,3-tiazol, se obtuvieron con rendimientos bajos, mientras que la Serie D, derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-éter, se obtuvieron en su totalidad con rendimientos de moderados a bajos.

Se evaluó en primer lugar si los compuestos obtenidos eran capaces de inhibir la actividad de caspasa-3 a una concentración igual a 100 μ M. Estos resultados se denominaron resultados preliminares y se consideraron como un primer acercamiento a la capacidad inhibitoria de los compuestos. En base a estos resultados preliminares, se seleccionaron aquellos con una inhibición superior al 40 % de la actividad de caspasa-3 para continuar con el resto de la caracterización de los compuestos. Una vez realizado un conjunto de estudios preclínicos y computacionales, ya sobre el final del trabajo, se realizó una reevaluación de los compuestos con mejores perfiles de inhibición a 100 μ M (**17**, **18**, **38** y **59**). En esta instancia no fue posible repetir los resultados obtenidos en los ensayos preliminares. Debido a este inesperado resultado se realizaron análisis para intentar comprender el origen de la discrepancia. En primer lugar, se intentó comprender si estos

compuestos interferían con la medida de fluorescencia utilizada en el ensayo de actividad, encontrándose que los compuestos **17**, **18** y **59**, que poseían agrupamientos nitro, sí podían interferir con ésta. La interferencia en la fluorescencia resultó irrelevante únicamente en el caso del compuesto **38**. Es importante destacar la importancia de tener en cuenta posibles interferencias en los ensayos de actividad, particularmente cuando se trabaja con técnicas basadas en fluorescencia, y la posibilidad de tener que recurrir a otro tipo de ensayos. A su vez, se pusieron de manifiesto problemas de baja solubilidad de los compuestos en la solución amortiguadora utilizada en los ensayos de actividad enzimática. En particular, el compuesto **38**, si bien no parecía descomponerse, no se solubilizaba ni siquiera mediante tratamientos de sonicación. La baja solubilidad de los compuestos en el medio acuoso es seguramente la causa de la variabilidad en los ensayos realizados. Retrospectivamente, es importante cuestionar la elección de una concentración 100 μM para realizar los ensayos preliminares, pues se trata de una concentración relativamente alta, difícil de alcanzar *in vivo*. De haberse obtenido compuestos con una buena capacidad inhibitoria, ésta debería manifestarse en ensayos de inhibición a concentraciones micromolar bajo o submicromolares de compuesto. Parece entonces recomendable, con el fin de ahorrar tiempo y esfuerzo, la utilización de concentraciones significativamente menores de compuesto en ensayos de inhibición. Además, las concentraciones menores mitigarían los problemas vinculados a la solubilidad.

Este estudio pone en evidencia la importancia de tener en cuenta ciertas características fisicoquímicas de los compuestos en el diseño de nuevos fármacos, y que no sólo es necesario enfatizar el diseño en los determinantes estructurales que maximizarían las interacciones con el blanco terapéutico seleccionado. En nuestro caso, además de ser importante el blanco en sí, también era importante su ubicación, debido a que la caspasa-3 se encuentra en todo el organismo, pero su vinculación a la EA se daba en el cerebro. Esto llevó a que para el diseño fuera importante que los compuestos tuvieran cierto carácter hidrofóbico con el fin de fomentar el pasaje por la barrera hematoencefálica. Otra característica deseable es su solubilidad en el medio acuoso debido a que la falta de solubilidad lleva a que el compuesto tenga dificultades para su uso como fármaco requiriendo de estrategias para promover su distribución en el organismo, estrategias que son utilizadas cuando los fármacos presentan muy buenos perfiles de actividad en el blanco terapéutico¹⁵⁵. Esta solubilidad es crucial para poder realizar los ensayos. Por lo tanto, para futuros diseños es necesario llegar a un balance entre características estructurales que brinden, para el caso de estudio, capacidad de solubilidad en el medio acuoso, características de hidrofobicidad que permitan atravesar la barrera hematoencefálica y que a su vez le permitan inhibir la actividad de la enzima blanco.

En el contexto del abordaje planteado en esta Tesis, se llevaron a cabo estudios que permitieran determinar si los compuestos tenían buenos perfiles como posibles fármacos, considerando futuros ensayos *in vivo* de los mismos. Se realizó una caracterización preclínica de los compuestos, en la que se pretendió establecer si los compuestos eran citotóxicos en la línea celular HT22, si generaban nuevos metabolitos *in vitro* cuando se exponían a la fracción subcelular S9 de hígado de rata, si eran capaces de cruzar la barrera hematoencefálica mediante el ensayo *in vitro* PAMPA y por último si eran mutagénicos utilizando el ensayo *in vitro* Ames. En el ensayo de citotoxicidad se obtuvo que los compuestos **17** y **18** presentaron un IC₅₀ menor a 100 µM. Para los compuestos **38** y **59** no fue posible determinar los valores del IC₅₀, pero sí se determinó que los compuestos no eran citotóxicos a concentraciones de 100 µM. En los ensayos de metabolización se obtuvo que los compuestos seleccionados en los ensayos preliminares **18**, **38** y **59** eran metabolizados *in vitro* debido a que se obtenían nuevos derivados en la CCF, mientras que el compuesto **17** parecería no ser metabolizado. Respecto al ensayo PAMPA, por problemas en la solubilidad de los compuestos en la solución amortiguadora fue necesario modificarlo mediante el agregado de un 0.2 % del detergente Tween-80. Al realizar la modificación se observaron problemas con el control negativo debido a que presentó un valor alto de Papp que se corresponde con la posibilidad de pasaje a través de la barrera hematoencefálica. Esto se atribuye a que la preparación de lípidos no era fresca como se recomienda en la bibliografía. No se pudo realizar el ensayo con la incorporación de Tween-80 y lípidos frescos debido a la dificultad de conseguir un cerebro de cerdo para realizar una nueva extracción de lípidos. No obstante, se puede afirmar que en las condiciones del ensayo los compuestos presentaron valores de Papp similares al control positivo, lo cual sugiere que los compuestos podrían trasapasar la barrera hematoencefálica. En los ensayos de mutagénesis se obtuvo que únicamente el compuesto **38** no resultó mutagénico en las cepas evaluadas TA98, TA100, TA1535 y TA97a.

Con los cálculos *in silico* se determinaron los posibles sitios de interacción de los compuestos en caspasa-3 y -7, así como también que la presencia de éstos no generaba cambios significativos en la estructura de ambas enzimas. Sin embargo, al no obtener resultados confiables en los ensayos de inhibición enzimática debido a la interferencia de la fluorescencia del producto por parte de los compuestos y a problemas en la solubilidad de los compuestos en el medio de trabajo, no fue posible relacionar los resultados experimentales con aquellos obtenidos en los cálculos *in silico*.

Por último, en el ensayo de interacción inhibidor-caspasa por RMN tampoco fue posible obtener resultados acerca de la interacción entre la enzima y los compuestos por problemas en la solubilidad de éstos. Se logró solubilizarlos con el agregado de Tween-20, pero no se observaron

señales sugerentes de interacción entre la proteína y los compuestos. A su vez, la presencia de Tween20 no asegura la integridad de la proteína.

En suma, en la presente Tesis no fue posible obtener nuevos compuestos como posibles inhibidores de la enzima caspasa-3. A pesar de estos resultados negativos, se rescata el abordaje realizado como una buena estrategia en el diseño de fármacos. Con este abordaje es posible, una vez que se tienen los compuestos deseados, evaluar su capacidad inhibitoria del blanco terapéutico y caracterizar el tipo de inhibición. A su vez, es posible evaluar cómo interaccionan con la enzima experimentalmente, mediante los ensayos de RMN, así como mediante una aproximación *in silico*. Por otra parte, este abordaje permite evaluar posibles efectos que los compuestos podrían tener en el organismo, evaluando *in vitro* su citotoxicidad, metabolización y mutagénesis, y también evaluar su potencial para alcanzar el lugar requerido en el organismo, para seleccionar aquellos compuestos que podrían ser incluidos en fases posteriores del desarrollo de fármacos. Para completar este abordaje sería necesario añadirle un etapa de evaluación de la solubilidad de los compuestos sintéticos en los medios donde se espera evaluarlos, debido a que ésta fue una de las mayores dificultades encontradas en el trabajo.

10. CONCLUSIONES

10.1 SÍNTESIS ORGÁNICA

Se diseñaron cuatro series de compuestos orgánicos como posibles inhibidores selectivos y reversibles de caspasa-3. Se obtuvieron 41 de estos derivados mediante metodologías de síntesis orgánica convencional con rendimientos de bajos a moderados.

Los derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-amilcarbamato fueron los más complicados de obtener por la baja estabilidad de los reactivos de partida, mientras que los derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-alkilcarbamato fueron obtenidos con rendimientos bajos a moderados; en este caso la baja eficiencia de la reacción se atribuye a la baja nucleofilia de la amina de partida.

Respecto a los derivados de 2-amino-4-fenil-1,3-tiazol, se pudieron obtener con mayor eficiencia que los derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-amilcarbamato, pero en este caso la eficiencia y rendimiento de la reacción dependió de las aminas de partida. Las reacciones con aminas aromáticas presentaron muy bajos rendimientos debido a su baja nucleofilia. Con aminas primarias con sustituyentes aromáticos se obtuvieron rendimientos moderados de reacción, mientras que con aminas secundarias con heteroátomos se obtuvieron rendimientos moderados. Con aminas secundarias puramente alifáticas fue posible obtener un derivado con muy bajo rendimiento. Este bajo rendimiento se debió probablemente a reacciones secundarias.

Adicionalmente, se obtuvieron derivados de 4-fenil-1,3-tiazol-2-éter, los cuales presentaron moderados porcentajes de rendimiento. Es importante destacar que la síntesis de estos derivados en las condiciones llevadas a cabo en esta Tesis no ha sido reportadas.

10.2 ACTIVIDAD DE CASPASA-3 Y -7 Y ENSAYO PRELIMINAR DE INHIBICIÓN

Fue posible determinar la concentración óptima de la enzima para realizar los ensayos preliminares de inhibición de la actividad de caspasa-3, así como también calcular los valores de K_m y k_{cat} para caspasa-3 y -7. Los valores obtenidos para cada enzima estuvieron dentro de lo esperado respecto a la bibliografía.

Los ensayos preliminares de inhibición a 100 μM de compuesto en primera instancia mostraron que los derivados **17**, **18**, **38** y **59** presentaron los mejores porcentajes de inhibición. Sin embargo,

al realizarse la reevaluación de la actividad inhibitoria se determinó que los compuestos no fueron capaces de inhibir la caspasa-3.

Para los compuestos **17**, **18** y **59**, que presentaban un agrupamiento nitro en su estructura, la inhibición obtenida en los ensayos preliminares podría haber sido sobreestimada debido a la interferencia en la emisión de fluorescencia del producto AMC de la reacción catalizada por caspasa-3.

Respecto al compuesto **38**, que no tenía grupo nitro y presentó la menor interferencia en la emisión de fluorescencia del AMC, la falta de reproducibilidad de la inhibición observada en los ensayos preliminares puede ser atribuida a problemas en la solubilidad del compuesto en la solución amortiguadora de actividad.

10.3 EVALUACIÓN PRECLÍNICA

10.3.1 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD EN LA LÍNEA CELULAR HT22

A partir de la evaluación de la citotoxicidad de los compuestos seleccionados según los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se obtuvo que los compuestos **17** y **18** se encontraban en concentraciones tóxicas para la línea celular HT22, a las concentraciones del ensayo de inhibición de la actividad enzimática. El resto de los compuestos seleccionados se encontraron en concentraciones subtóxicas para la línea celular HT22 en el ensayo de inhibición de la actividad de caspasa-3.

10.3.2 METABOLIZACIÓN

En el ensayo de metabolización se obtuvo que los compuestos **18**, **38** y **59** generaron nuevas entidades con distintos valores de *r_f* que los compuestos de partida. Respecto al compuesto **17** no es posible concluir que no haya producción de nuevas entidades debido a que en la CCF realizada se observó una mancha muy extensa que no permitió descartar la ausencia de metabolitos.

10.3.2 APROXIMACIÓN A LA PERMEABILIDAD A TRAVÉS DE LA MEMBRANA HEMATOENCEFÁLICA (PAMPA)

Fue posible realizar el ensayo PAMPA para aproximarnos a la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica *in vitro* utilizando controles positivos (verapamilo) y negativos (teofilina) así como lípidos extraídos en el laboratorio para simular la barrera hematoencefálica.

No es posible concluir acerca del comportamiento de los compuestos debido a problemas con el control negativo cuando se modificó el ensayo mediante la adición del detergente Tween-80 para promover la solubilidad de los compuestos. Esto se debió probablemente a que los lípidos extraídos no provenían de un cerebro de cerdo fresco.

10.4.3 EVALUACIÓN DE MUTAGÉNESIS

Los compuestos seleccionados **17**, **18** y **59** resultaron mutagénicos en la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*, mientras que el derivado **38** no resultó mutagénico en las cepas evaluadas (TA98, TA100, TA1535 y TA97a).

10.4 EVALUACIÓN *IN SILICO*

A partir de la evaluación *in silico* mediante *docking* y dinámica molecular fue posible corroborar que la presencia de los compuestos no genera cambios importantes en la posición de residuos claves para la actividad de ambas enzimas.

A su vez se determinó que el sitio de interacción obtenido a través del *docking* molecular no se mantiene una vez que se realiza la DM en ambas enzimas. Por lo tanto, el *docking* nos brinda una aproximación del posible sitio de interacción en la enzima, que en nuestro caso no se mantuvo una vez que se realizó la DM.

Por los cambios en el posicionamiento luego de 100 ns de DM se puede determinar que en caspasa-3 estos compuestos no interaccionarían en los bolsillos catalíticos de ambos heterodímeros, debido a que únicamente el ligando **59** permaneció en ambos bolsillos luego de la simulación. Respecto a caspasa-7, únicamente el ligando **17** se mantiene en ambos bolsillos catalíticos.

10.5 INTERACCIÓN COMPUESTO-CASPASA POR RMN

En este ensayo no fue posible determinar si existía una interacción entre los compuestos y las enzimas. Además, fue necesaria la adición de Tween20 (10 %) para promover la disolución de los compuestos en la solución amortiguadora y evidenciar las señales por RMN.

11. PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta la ausencia de inhibición de la actividad de caspasa-3 por parte de los compuestos obtenidos y las estructuras de los compuestos en las que nos basamos para realizar el diseño, es posible suponer que la presencia de un nexo de uno o más átomos entre la posición 2 del anillo tiazólico y el sustituyente no favorecen a la inhibición de la actividad de caspasa-3. Por lo tanto, el aumento en la cantidad de átomos en el nexo no sería un factor a incluir en el rediseño de nuevos posibles inhibidores. En este sentido, se propone como posible re-diseño de compuestos a derivados tiazólicos que presenten como sustituyentes de la posición 2 del anillo tiazólico agrupamientos de tipo fenil, naftil, benzofuranil e indolil (Figura 11.1).

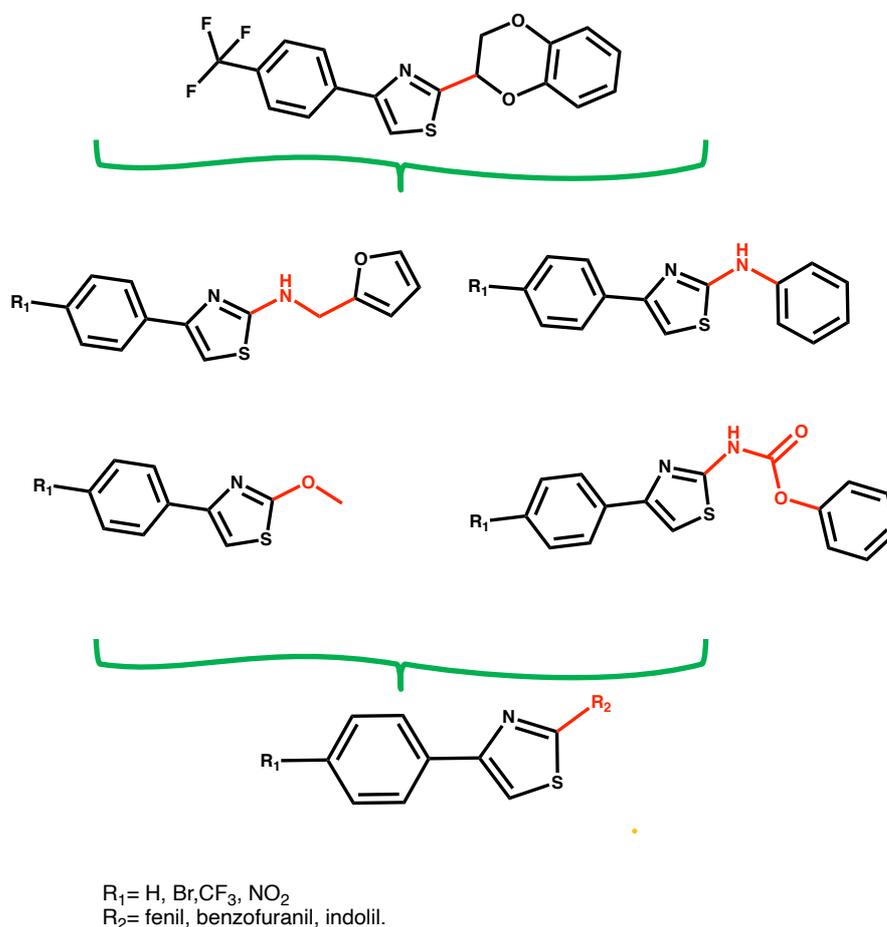


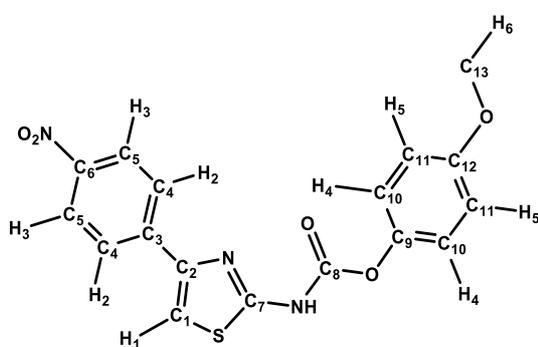
Figura 11.1 Arriba, estructura del compuesto 2 utilizado para el diseño de los compuestos obtenidos; entre las llaves estructura de las series obtenidas en este trabajo, abajo, estructura de los compuestos del rediseño propuesto.

Debido a los problemas de solubilidad observados en este trabajo se propone que en un eventual rediseño de compuestos como posibles inhibidores de caspasa-3, en primer lugar se evalúe la solubilidad de los compuestos en las soluciones amortiguadoras donde se pretende realizar los ensayos de actividad. Para esto podría utilizarse uno de los criterios de la regla de Lipinski¹⁵⁶, la cual propone condiciones que debe tener un nuevo candidato a fármaco. El criterio a utilizar se basa en la solubilidad de los compuestos. Se mide experimentalmente o se calcula el logaritmo del coeficiente de partición en octanol/agua (LogP), el cual debe ser menor a 5 para ser considerado como un buen candidato, y por lo tanto presenta solubilidad en el medio acuoso. También se realizarían cálculos teórico-computacionales de docking y dinámica molecular, como los realizados en este trabajo, que brinden información sobre el posible sitio de interacción con mayor inhibición en relación con los de menor inhibición conduzca a mejoras en el diseño de compuestos y así acercarse a obtener futuros derivados con un mejor perfil de actividad biológica. Además, en eventuales ensayos preliminares para evaluar la actividad inhibitoria, se consideraría utilizar concentraciones menores a 100 μM , no solo para disminuir problemas de solubilidad sino también para favorecer la selección de compuestos con una buena capacidad inhibitoria.

Otro problema que se tuvo que afrontar en este trabajo fue la interferencia en la fluorescencia del producto de la reacción del ensayo de actividad de caspasa-3. Para evitar esta interferencia podría utilizarse otra metodología para medir la actividad de caspasa-3, como por ejemplo medir absorbancia para seguir la cinética de la reacción y no fluorescencia.

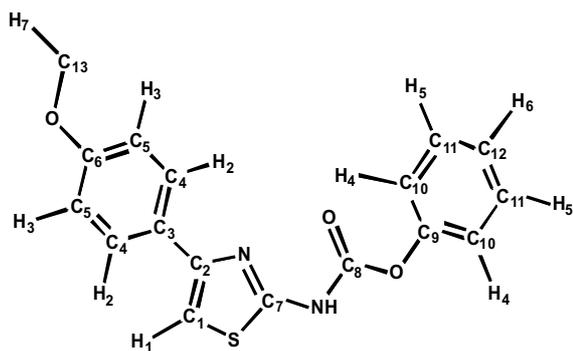
12. ANEXO ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

Derivados 4-fenil-2-arilcarbonilamino-1,3-tiazol



C₉, 147.5 C₃, 157.8 C₁₂, 160.4 (m, C₆, C₇, C₈)

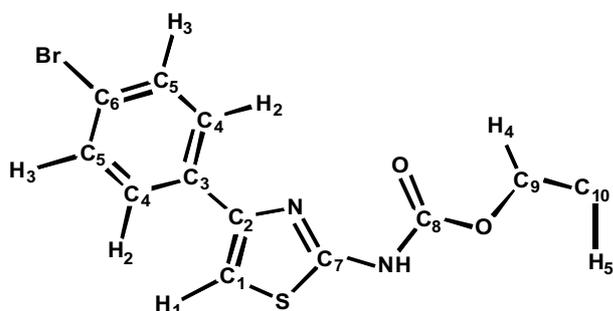
2-(4-metoxifenoxicarbonilamnio)-(4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol, 4. Sólido amarillo, (R = 4%) ¹H-RMN (Acetona d₆, 400 Hz) δ_H (ppm): 3.81 (3H, s, H₆), 6.93 (2H, d, J 9.2 Hz, H₅), 7.21 (2H, d, J 9.2 Hz, H₄), 7.92 (1H, s, H₁), 8.22 (2H, d, J 9.2 Hz, H₃), 8.35 (2H, d, J 9.2 Hz, H₂). ¹³C-NMR δ_C (ppm): 55.1 C₁₃, 111.6 C₁, 114.7 C₁₁, 122.3 C₁₀, 124.7 C₄, 127.3 C₅, 140.2 C₂, 144.7



C₁₀, C₁₁)

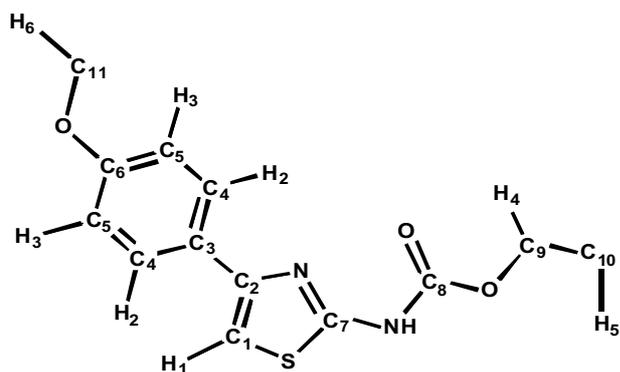
2-Fenilcarbonilamino-4-(4-metoxifenil)-1,3-tiazol, 5. Sólido blanco, (R = 7.5 %) ¹H-RMN (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm): 3.92 (3H, s, H₇), 7.41 (1H, s, H₁), 7.03 (2H, d, J 8.8 Hz, H₃), 7.32 (2H, m, H₄), 7.34 (2H, m, H₅), 7.56 (2H, t, J 6.8 Hz H₆) 7.91 (2H, d, J 8.8 Hz, H₂), ¹³C-NMR δ_C (ppm): 105.2 C₁, 112.4 C₅, 127.1 C₄, 130.3 C₁₂, 149.2 C₂, 159.7 C₃, 160.1 (m, C₆, C₇, C₈, C₉,

Derivados 4-fenil-2- alquilcarbonilamino-1,3-tiazol



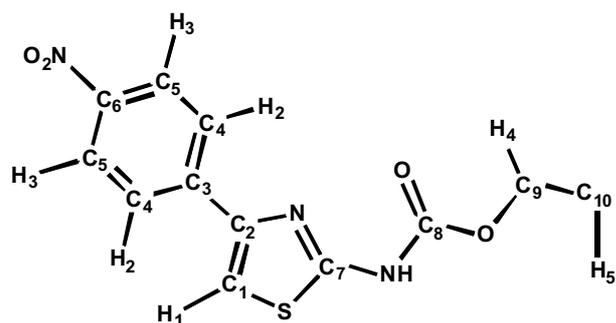
12.1 C₁₀, 62.4 C₉, 109.7 C₁, 121.2 C₆, 129.7 C₅, 132.6 C₄, 135.7 C₃, 149.2 C₂, 153.7 C₈, 161.2 C₇.

2-Etilcarbonilamino-4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol, 11. Sólido blanco, (R= 22 %) ¹H-RMN (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm): 1.41 (3H, t, J 7.2 Hz, H₅), 4.43 (2H, d, J 6.8 Hz H₄), 7.54 (1H, s, H₁), 7.66 (2H, d, J 8.8 Hz, H₃), 7.95 (2H, d, J 8.4 Hz, H₂). ¹³C-NMR δ_C (ppm):



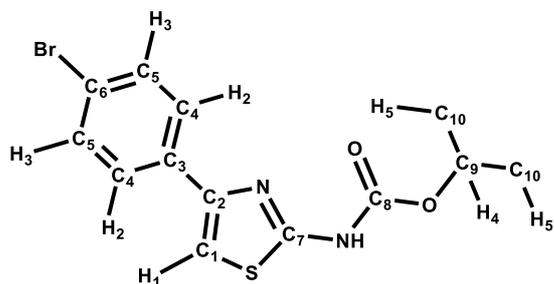
62.7 C₉, 105.2 C₁, 114.5 C₅, 127.1 C₄, 128.7 C₃, 150.2 C₂, 153.7 C₇, 155.1 C₈. 160.4 C₆.

2-Etilcarbonilamino-4-(4-metoxifenil)-1,3-tiazol, 12. Sólido blanco, (R= 30 %) ¹H-RMN (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm): 1.32 (3H, t, *J* 7.2 Hz, H₅), 3.86 (3H, s, H₆), 4.34 (2H, d, *J* 7.2 Hz H₄), 7.03 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H₃), 7.33 (1H, s, H₁), 7.83 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H₂). ¹³C-NMR δ_C (ppm): 14.1 C₁₀, 55.4 C₁₁,



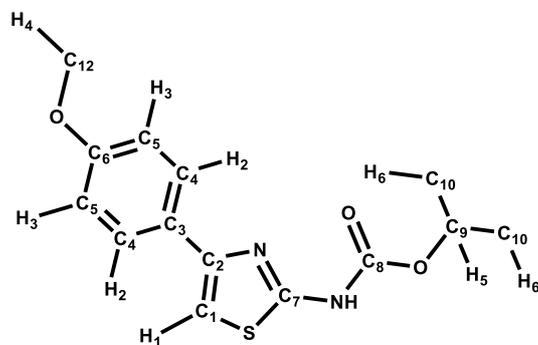
126.2 C₅, 139.7 C₂, 149.3 C₃, 150.7 C₆, 152.4 C₈, 153.2 C₇.

2-Etilcarbonilamino-4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol, 13. Sólido amarillo, (R= 8 %) ¹H-RMN (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm): 1.33 (3H, t, *J* 7.2 Hz, H₅), 4.42 (2H, d, *J* 7.2 Hz H₄), 7.32 (1H, s, H₁), 7.97 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H₃), 8.32 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H₂), ¹³C-NMR δ_C (ppm): 15.4 C₁₀, 64.6 C₉, 109.1 C₁, 124.4 C₄,



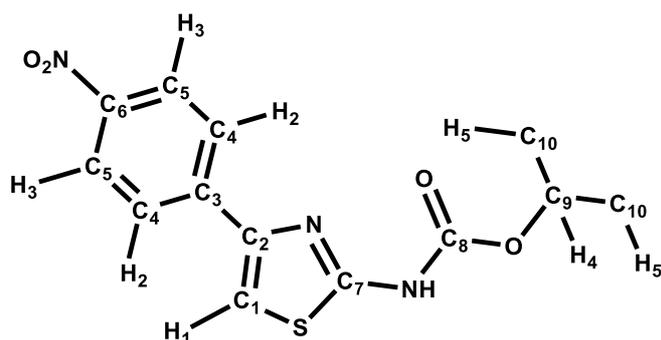
δ_C (ppm): 21.4 C₁₀, 72.5 C₉, 106.1 C₁, 120.6 C₆, 130.7 C₄, 132.2 C₅, 135.4 C₃, 149.1 C₂, 150.3 C₈, 160.1 C₇.

2-Isopropilcarbonilamino-4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol, 14. Sólido blanco, (R= 29%) ¹H-RMN (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm): 1.03 (6H, d, *J* 6.8 Hz, H₅), 2.05 (1H, m, H₆), 4.12 (2H, d, *J* 6.4 Hz H₄), 7.52 (1H, s, H₁), 7.63 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H₃), 7.81 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H₂). ¹³C-NMR



112.5 C₅, 126.3 C₄, 150.4 C₂, 155.2 C₈, 160.1 C₆.

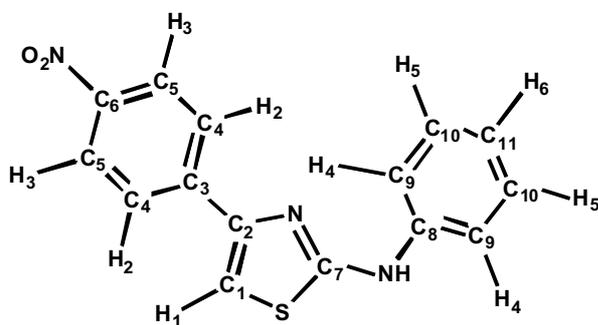
2-Isopropilcarbonilamino-4-(4-metoxifenil)-1,3-tiazol, 15. Sólido blanco, (R = 16%) ¹H-RMN (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm) 1.02 (6H, d, *J* 7.2 Hz, H₆), 2.03 (1H, m, H₅) 7.21 (1H, s, H₁), 7.56 (2H, d, *J* 8.8 Hz), 7.92 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H₃), ¹³C-NMR δ_C (ppm): 19.2 C₁₀, 29.3 C₉, 42 C₇, 71 C₉, 106.3 C₁, 128.2 C₃,



2-Isopropilcarbonilamino-4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol, 16. Sólido amarillo, (R= 8%) $^1\text{H-RMN}$ (Acetona, 400 Hz) δ_{H} (ppm): 1.19 (6H, d, J 7.2 Hz, H₅), 4.77 (1H, m, H₄) 7.61 (1H, s, H₁), 8.16 (2H, d, J 8.0 Hz H₄), 8.28 (2H, d, J 8.8 Hz) $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (ppm): 21.2 C₁₀, 72.1 C₉, 106.4

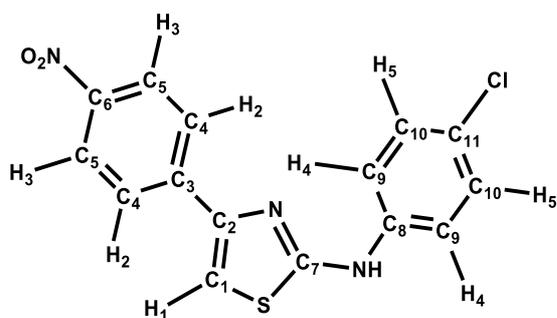
C₁, 124.6 C₅, 126.7 C₄, 129.1 C₃, 149.2 C₆, 150.2 C₂, 154.7 C₈, 164.1 C₇.

Derivados de 4-aryl-2-aryl-1,3-tiazolamina



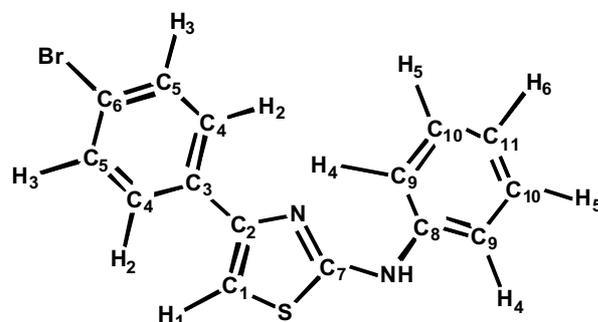
N-fenil(4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol-2-il)amina, 17. Sólido naranja (R = 55%). **PF** = 208 – 210 °C. **EM (m/z), (%):** 297.05 (M, 100.0), 298.05 (19.9), 299.05 (6.5), 251.05 (10.4). **¹H-RMN (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 7.01 (3H, t, J 8.8 Hz H₆), 7.42 (2H, t, J 9.2 Hz, H₅), 7.53 (1H, s, H₁), 7.82 (2H, d, J 8.8 Hz, H₄), 8.21 (2H, d, J

9.2 Hz, H₃), 8.35 (2H, d, J 8.8 Hz, H₂) **¹³C-NMR δ_C (ppm):** 107.2 C₁, 117.1 C₉, 118.7 C₈, 122.1 C₁₁, 129.2 C₁₀, 124.1 C₄, 127.2 C₅, 141.6 C₂, 149.8 C₃, 148.2 C₆, 164.8 C₇.



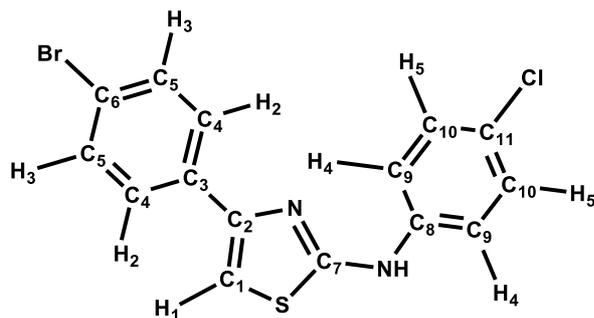
N-4-cloro-fenil(4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol-2-il)amina, 18. Sólido naranja (R = 44 %). **PF** = 233 – 234 °C. **EM (m/z), (%):** 331.05 (M, 100.0), 332.05 (27.8), 333.05 (38.2), 285.05 (11.3). **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 7.31 (1H, s, H₁), 7.45 (2H, d, J 9.2 Hz, H₅), 7.61 (2H, d, J 9.2 Hz, H₃),

7.85 (2H, d, J 9.2 Hz, H₄), 7.92 (2H, d, J 8.8 Hz, H₂). **¹³C-NMR δ_C (ppm):** 103.5 C₁, 121.1 C₆, 125.2 C₁₁, 128.7 C₄, 132.7 C₅, 134.2 C₃, 138.1 C₁₀, 140.8 C₈, 140.2 C₉, 150.7 C₂, 165.1 C₇.



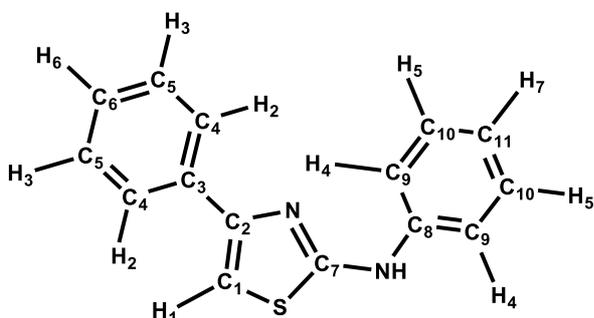
N-fenil(4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol-2-il)amina, 21. Sólido marrón (R = 23 %). **EM (m/z), (%):** 332.0 (M⁺, 100.0), 333.0 (19.2), 331.0 (52.6), 334.0 (5.8). **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 7.01 (1H, t, J 8.8 Hz, H₆), 7.34 (1H, s, H₁), 7.41 (2H, t, J 8.8 Hz, H₅), 7.62 (2H, d, J 8.8 Hz, H₃), 7.81 (2H, d, J 7.6 Hz, H₄), 7.94

(2H, d, J 8.4 Hz, H₂). **¹³C-NMR δ_C (ppm):** 103.1 C₁, 117.6 C₉, 121.7 C₆, 122.8 C₁₁, 127.1 C₄, 129.8 C₁₀, 132.1 C₅, 134.2 C₃, 140.7 C₈, 150.2 C₂, 164.1 C₇.

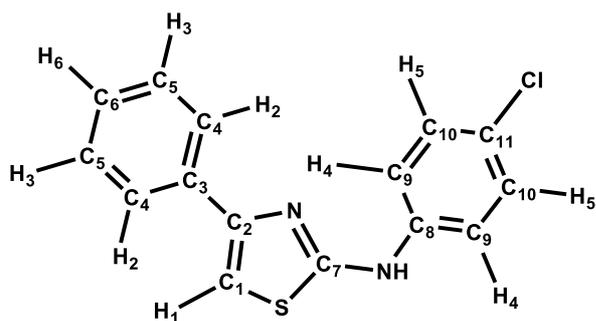


N-4-cloro-fenil(4-(4-bromofenil-1,3-tiazol-2-il)amina, 22. Sólido marrón. (R = 47 %). **PF** = 145-146 °C. **EM (m/z), (%)**: 366.0 (M, 100.0), 367.0 (24.6), 368.0 (28.9), 365.0 (38.9) **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 7.3 (1H, s, H₁), 7.4 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H₅), 7.6 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H₃), 7.8 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H₄), 7.9 (2H, d, *J* 8.8 Hz,

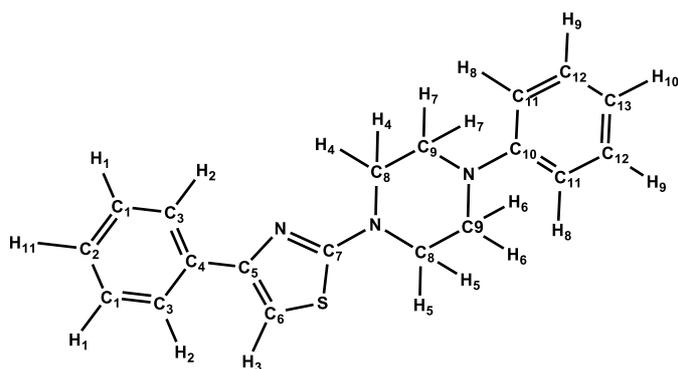
H₂). **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 103.1 C₁, 121.4 C₆, 125.4 C₁₁, 128.6 C₄, 132 C₅. 134 C₃, 138 C₁₀. 140 C₈, 140 C₉, 150 C₂, 165 C₇.



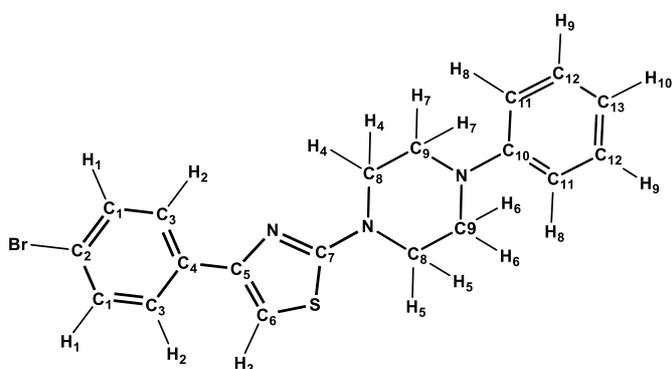
N-fenil(4-fenil-1,3-tiazol-2il)amina, 23. Sólido blanco (R = 34 %). **EM (m/z), (%)**: 252.1 (100.0), 253.1 (19.6), 251.1 (43.1) **PF** = 135-137 °C. **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 7.0 (1H, t, *J* 8.0 Hz, H₇), 7.2 (1H, s, H₁), 7.4 (5H, m, H₅, H₃, H₆), 7.83 (2H, d, *J* 8,0 Hz, H₄), 8.01 (2H, d, *J* 8,0 Hz, H₂). **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 103.1 C₁, 117.4 C₉, 123.1 C₁₁, 124.7 C₄, 128-129 C₅-C₆-C₁₀, 134.3 C₃, 141.1 C₈, 152.7 C₂, 162.1 C₇.



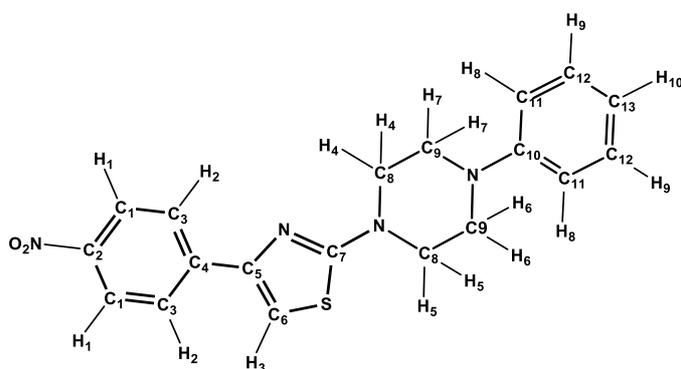
N-4-cloro-fenil(4-fenil-1,3-tiazol-2il)amina, 24. Sólido blanco (R = 38 %). **EM (m/z), (%)**: 286.1 (100.0), 287.1 (32.5), 285.1 (43.9) **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 7.24 (1H, s, H₁), 7.40 (5H, m, H₅, H₃, H₆), 7.89 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H₄), 7.99 (2H, d, *J* 4.0 Hz, H₃). **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 102.2 C₁, 119.1 C₉, 127-129 C₄-C₅-C₆-C₁₀-C₁₁, 134.6 C₃, 141.5 C₈, 152.2 C₂, 162.1 C₇.



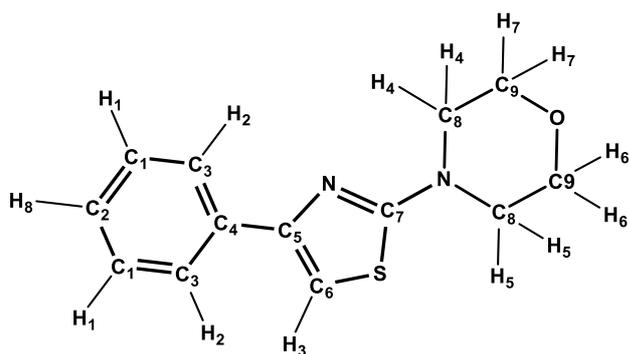
4-fenil-2-(4-fenilpiperazin-1-il)-1,3-tiazol, 25. Sólido blanco, (R= 14 %). **EM (m/z), (%):** 321.1 (M, 22.1, 322.1 (5.3), 189 (100) **PF** = 130 - 132 °C. **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 3.39 (4H, m, H₇, H₈), 3.71 (4H, m, H₄, H₅), 6.87 (1H, t, J₁ 8.0 Hz, H₁₀), 7.06 (2H, d, J₁ 8.0 Hz, H₁), 7.16 (1H, s, H₃), 7.29 (3H, m, H₉), 7.40 (2H, t, J₁ 8.0, J₂ 8.0 Hz, H₂), 7.95 (2H, d, J₁ 4.0, Hz H₈). **¹³C-NMR δ_C (ppm):** 48 C₉, 48 C₈, 117.2 C₁, 120.5 C₂, 120.9 C₁₃, 126.3 C₁₁, 129.5 C₃, 129.8 C₁₂, 135.7 C₄, 150.4 C₅, 151.2 C₁₀, 171.3 C₇.



4-(4-bromofenil)-2-(4-fenilpiperazin-1-il)-1,3-tiazol 26. Sólido color crudo (R = 49 %) **EM (m/z), (%):** 401.0 (M, 12.6), 399.0 (12.1), 269.0 (43.7) **PF** = 131 - 132 °C **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 3.37 (4H, m, H₇, H₈), 3.71 (4H, m, H₄, H₅), 6.87 (1H, t, J₁ 8.0 Hz, H₁₀), 7.06 (2H, d, J₁ 8.0 Hz, H₉), 7.16 (1H, s, H₃), 7.28 (2H, t, J₁ 8.0, J₂ 8.0 Hz H₈), 7.58 (2H, d, J₁ 8.0 Hz, H₂), 7.90 (2H, d, J₁ 8.0 Hz, H₁). **¹³C-NMR δ_C (ppm):** 48.2 C₈, 48.6 C₉, 103.2, C₆, 116.1 C₁₂, 120.5 C₁₃, 121.8 C₄, 129.2 C₁₁, 129.7 C₃, 131.2 C₁, 134.7 C₂, 150.1 C₅, 151.4 C₁₀, 171.6 C₇.

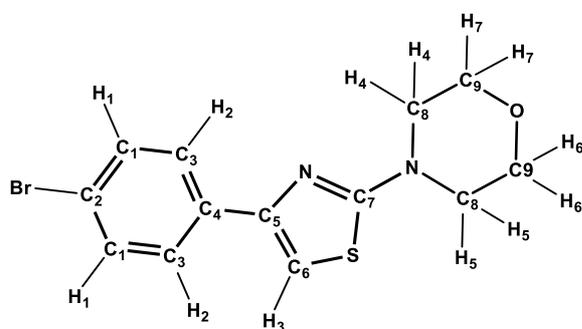


4-(4-nitrofenil)-2-(4-fenilpiperazin-1-il)-1,3-tiazol 27. Sólido anaranjado (R = 22 %) **EM (m/z), (%):** 366.1 (M, 26.2), 367.1 (6.4), 247.0 (10.1), 234.0 (55.4), 145.2 (100.0) **PF** = 155 - 157 °C **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 3.39 (4H, m, H₇, H₈), 3.75 (4H, m, H₅, H₆), 6.87 (1H, t, J₁ 8.0 Hz, H₁₀), 7.07 (2H, d, J₁ 8.0 Hz, H₉), 7.16 (1H, s, H₄), 8.29 (2H, d, J₁ 8.0 Hz, H₁), 7.29 (2H, t, J₁ 8.0, J₂ 8.0 Hz H₈), 7.53 (H, s, H₃), 8.20 (2H, d, J₁ 8.0 Hz, H₂). **¹³C-NMR δ_C (ppm):** 47.2 C₈, 47.8 C₉, 106.1 C₆, 116.3 C₁₂, 120.1 C₁₃, 124.4 C₁, 126.6 C₃, 129.2 C₁₁, 141.1 C₂, 146.2 C₄, 149.4 C₅, 151.1 C₁₀, 171.5 C₇.



4-(4-phenil)-2-morfolino-1,3-tiazol. Sólido color amarillo palido. (R = 28 %) **EM (m/z), (%)**: 246.1 (M, 100.0), 247.1 (16.16), 189.1 (60.4) **PF** = 99 - 100 °C **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 3.51 (4H, t, *J*₁ 4.0 *J*₂ 4.0 Hz H₄, H₅), 3.81 (4H, t, *J*₁ 4.0 *J*₂ 4.0 Hz H₆, H₇), 7.15 (1H, s, H₃), 7.29 (1H, t, *J*₁ 8.0 *J*₂ 8.0

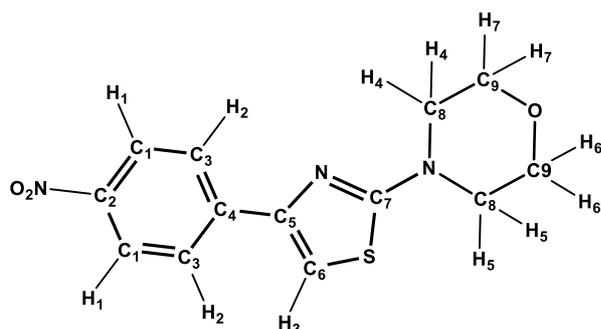
Hz H₈), 7.39 (2H, t, *J*₁ 8.0 *J*₂ 8.0 Hz, H₁), 7.93 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₂). **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 48.3 C₈, 65.4 C₉, 102.6 C₆, 126.4 C₃, 127.8 C₂, 129.1 C₁, 135.8 C₄, 153.5 C₅, 172.7 C₇.



4-(4-bromofenil)-2-morfolino-1,3-tiazol. 32.

Sólido color blanco, (R = 17 %) **EM (m/z), (%)**: 326.0 (M⁺, 100.0), 325.0 (28.0), 324.0 (97.7) 269.0 (63.5) **PF** = 130 - 131 °C **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 3.51 (4H, t, *J*₁ 4.0 *J*₂ 4.0 Hz H₄, H₅), 3.81 (4H, t, *J*₁ 4.0 *J*₂ 4.0 Hz H₆, H₇), 7.23 (1H, s, H₃), 7.57 (2H, t, *J*₁ 8.0 *J*₂ 8.0 Hz, H₁), 7.88

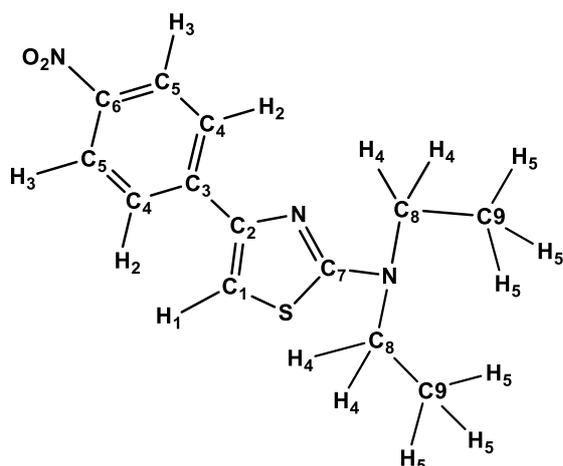
(2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₂). **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 48.4 C₈, 65.8 C₉, 103.0 C₆, 120.5 C₂, 127.4 C₃, 131.7 C₁, 134.3 C₄, 150.7 C₅, 170.6 C₇.



4-(4-nitrofenil)-2-morfolino-1,3-tiazol. 33.

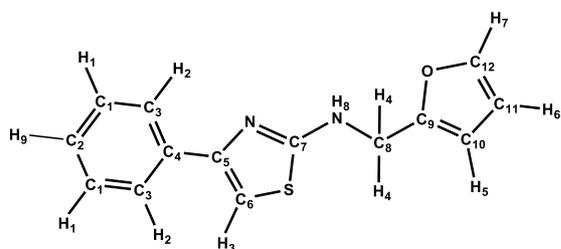
Sólido anaranjado oscuro, (R = 29 %) **EM (m/z), (%)**: 291.1 (M, 100.0), 292.1 (17.0), 234.0 (74.7) **PF** = 175 - 177 °C **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 3.55 (4H, t, *J*₁ 4.0 *J*₂ 4.0 Hz H₄, H₅), 3.82 (4H, t, *J*₁ 4.0 *J*₂ 4.0 Hz H₆, H₇), 7.53 (1H, s, H₃), 8.19 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₂), 8.28 (2H,

d, *J*₁ 8.0 *J*₂ 8.0 Hz, H₁), **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 48.6 C₈, 66.3 C₉, 105.8 C₆, 122.1 C₁, 127.7 C₃, 140.1 C₂, 145.6 C₄, 150.5 C₅, 171.6 C₇.



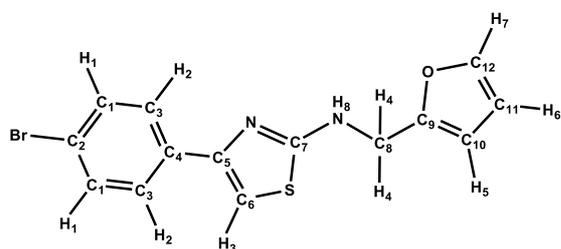
***N,N*-diethyl-4(4-nitrofenil-1,3-tiazol-2-il)amina.**

36. Sólido amarillo, (R = 3 %) **EM (m/z), (%)**: 277.1 (M, 4.4), 278.1 (2.1), 150 (100.0) **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 1.32 (6H, m, H₅), 3.62 (4H, q, *J*₁ 8.0 Hz, H₄), 8.21 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₂), 7.45 (1H, s, H₁), 8.30 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₃), **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 12.2 C₉, 45.9 C₈, 105.3 C₁, 124.4 C₅, 126.2 C₄, 140.8 C₃, 148.1 C₆, 150.4 C₂, 157.8 C₇.



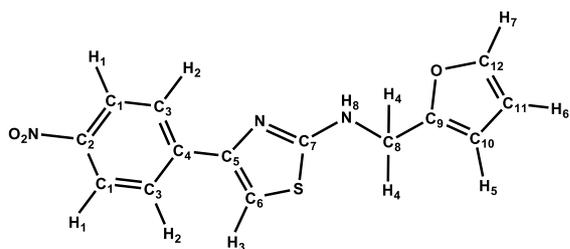
4-phenil-*N*-(furfuril-1,3-tiazol-2-il)amina. 37.

Sólido marrón claro, (R = 23 %) **EM (m/z), (%)**: 256.1 (M, 91.7), 257.1 (15.8), 258.1 (5.5), 227.1 (27.7) **PF = 109 - 111 °C ¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 4.65 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H₄), 6.38 (2H, m, H₅, H₆), 6.99 (1H, s, H₃), 7.16 (1H, m, H₈), 7.28 (1H, t, *J*₁ 4.0, *J*₂ 8.0 Hz, H₉), 7.38 (2H, t, *J*₁ 8.0, *J*₂ 8.0 Hz, H₂), 7.50 (H, m, H₇), 7.92 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H₁), **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 41.6 C₈, 101.3 C₆, 107.3 C₁₀, 110.4 C₁₁, 126.5 C₁, 127.1 C₂, 128.5 C₃, 135.2 C₄, , 142.5 C₁₂, 152.8 C₅, 152.9 C₉, 168.0 C₇.



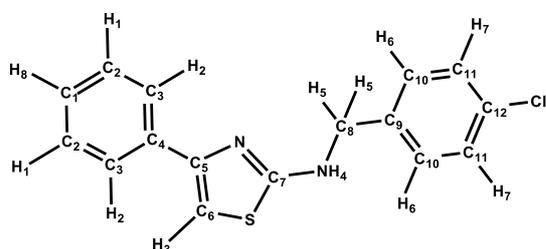
4-(4-bromofenil)-*N*-(furfuril-1,3-tiazol-2-il)-

amina. 38. Sólido marrón claro, (R = 26 %). **EM (m/z), (%)**: 334.0 (M, 27.1), 336.0 (28.0), 337.0 (4.8), 307.0 (6.0) **PF = 128 - 129 °C ¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 4.64 (2H, d, *J* 4.0 Hz, H₄), 6.39 (2H, m, H₅, H₆), 7.08 (1H, s, H₃), 7.24 (1H, m, H₈), 7.50 (H, m, H₇), 7.56 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H₂), 7.87 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H₁), **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 41.2 C₈, 102.1 C₆, 108.4 C₁₁, 110.1 C₁₀, 120.9 C₂, 128.3 C₁, 132.1 C₃, 135.7 C₄, 142.6 C₁₂, 149.9 C₅, 152.4 C₉, 168.0 C₇.



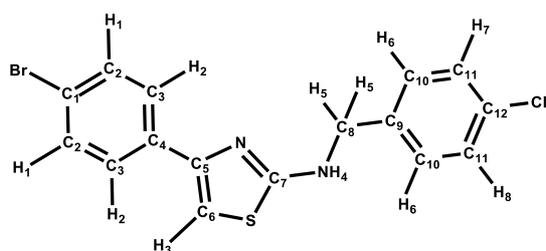
4-(4-nitrofenil)-N-(furfuril-1,3-tiazol-2-il)-amina. 39. Sólido amarillo, (R = 26 %). **EM (m/z), (%):** 301.1 (M, 34.2), 302.1 (6.0), 303.1 (2.2) **PF = 135 - 136 °C** **¹H (Acetona, 400 Hz)** δ_{H} (ppm): 4.51 (2H, s, H₄), 6.42 (2H, m, H₅, H₆),

7.53 (1H, s, H₃), 7.63 (1H, s, H₇), 8.11 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H₂), 8.23 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H₁), **¹³C-NMR δ_{C} (ppm):** 43.3 C₈, 106.5 C₆, 109.8 C₁₁, 111.2 C₁₀, 124.9 C₁, 126.7 C₃, 139.0 C₄, 141.3 C₉, 142.3 C₁₂, 149.1 C₅, 150.9 C₂, 170.2 C₇.



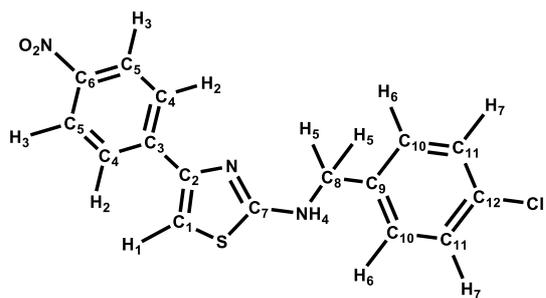
N-(4-clorobencil)-4-(fenil-1,3-tiazol-2-il)amina. 40. Sólido amarillo, (R = 10 %) **EM (m/z), (%):** 300.1 (M, 83.6), 301.1 (20.6), 302.1 (29.8), 232.1 (30.5) **PF = 174 - 175 °C** **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_{H} (ppm):** 7.30 (1H, m, H₈),

7.91 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₂), 6.97 (1H, s, H₃), 4.66 (2H, m, H₅), 7.38 (2H, m, H₆), 7.41 (2H, m, H₇), 7.35 (2H, m, H₁). **¹³C-NMR δ_{C} (ppm):** 47.7 C₈, 101.5 C₆, 127.2 C₁, 128.1 C₁₀, 128.7 C₃, 129.2 C₂, 129.1 C₁₁, 132.0 C₁₂, 139.1 C₄, 140.8 C₉, 149.4 C₅, 170.2 C₇.



N-(4-clorobencil)-4-(4-bromofenil-1,3-tiazol-2-il)-amina. 41. Sólido amarillo, (R = 23 %) **EM (m/z), (%):** 379.9 (M, 35.4), 379.0 (10.0), 377.9 (26.7), 241.9 (6.9) **PF = 137 - 138 °C** **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_{H} (ppm):** 4.66 (2H, m, H₅), 7.03 (1H, s, H₃),

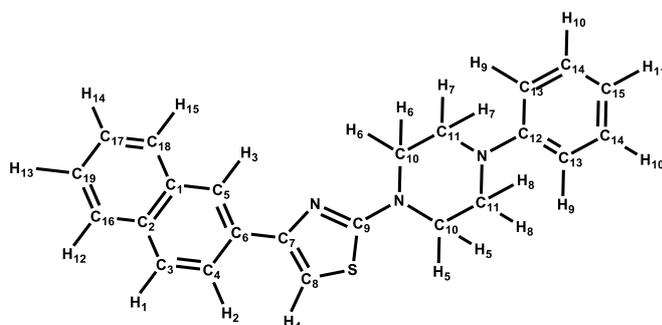
7.31 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₇), 7.57 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₆), 7.66 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₁), 7.8 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₂). **¹³C-NMR δ_{C} (ppm):** 47.3 C₈, 103.7 C₆, 123.2 C₁, 126.7 C₃, 127.8 C₁₁, 129.6 C₁₀, 131.2 C₂, 132.4 C₁₂, 135.0 C₄, 140.3 C₉, 149.6 C₅, 168.2 C₇.



N-(4-clorobencil)-4(4-nitrofenil-1,3-tiazol-2il)-amina. 42. Sólido anaranjado, (R = 19 %) **EM (m/z), (%):** 345.1 (M, 31.1), 346.1 (7.1), 347.1 (12.1), 206.9 (4.1), 125.1 (100.0) **PF** = 199 - 200 °C **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 4.69 (2H, d, J_f 8.0 Hz, H₅), 7.36 (1H, s, H₁), 7.39 (2H, d, J_f 8.0 Hz, H₇),

7.52 (2H, d, J_f 8.0 Hz, H₆), 8.15 (2H, d, J_f 8.0 Hz, H₂), 8.26 (2H, d, J_f 8.0 Hz, H₃). **¹³C-NMR δ_C (ppm):** 48.5 C₈, 103.2 C₁, 124.6 C₅, 126.5 C₄, 126.3 C₃, 128.2 C₁₁, 129.6 C₁₀, 132.3 C₁₂, 138.1 C₉, 148.4 C₆, 150.6 C₂, 169.3 C₇.

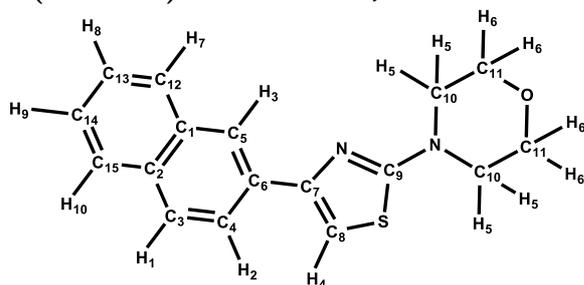
Derivados de 4-naftil-2-tiazolamina



4-(naftalen-2-il)-2-(4-fenilpiperazin-1-il)-1,3-tiazol 55. Sólido color crudo, (R = 3 %) **¹H (d₆-DMSO, 400 Hz) δ_H (ppm):** 6.85 (1H, J_f 8.0 Hz, H₁₁), 7.03 (2H, d, J_f 8.0 Hz, H₁₀), 7.27 (2H, t, J_f 8.0 J_2 8.0 Hz, H₉), 7.51 (3H, m, H₁, H₁₅, H₄), 8.03 (1H, d, J_f 4.0 Hz, H₂), 8.43 (1H, s, H₃), **¹³C-NMR δ_C (ppm):**

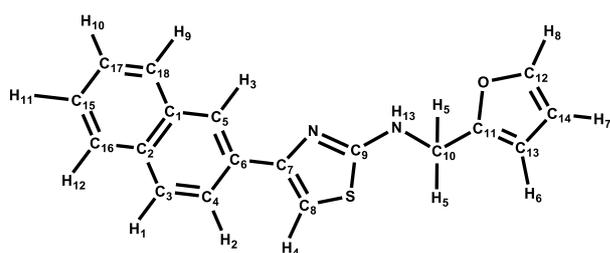
41.9 C₁₀, 101.3 C₈, 108.2 C₁₃, 111.2 C₁₄, 120.5 C₁₅, 124-125 C₁₆-C₁₇-C₁₉, C₄-C₆, 126-127 C₃-C₁₈, 132-133 C₂-C₅, 134.3 C₁, 141.7 C₁₂, 150.2 C₇, 153.9 C₁₁, 168.3 C₉.

4-(naftil-2-il)-2-morfolino-1,3-tiazol 56. Sólido color blanco, (R = 12 %) **EM (m/z), (%):** 296.1



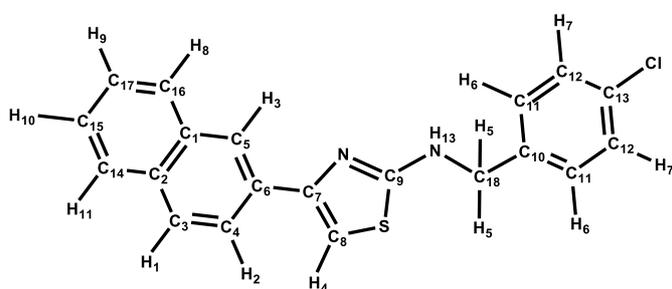
(M, 100.0), 297.1 (20.9), 298.1 (6.5), 239.1 (58.4), 184.1 (21.2) **PF** = 131 - 133 °C **¹H (acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 3.56 (4H, m, H₆), 3.84 (4H, m, H₅), 7.31 (1H, s, H₄), 7.51 (2H, m, H₉, H₈), 7.93 (3H, m, H₁, H₂, H₁₀), 8.06 (1H, m, H₇). **¹³C-NMR δ_C (ppm):** 48.5 C₁₀, 66.8 C₁₁, 105.5 C₈, 126.8 C₁₃-

C₁₄-C₁, 127 C₃-C₄-C₅, 128 C₁₂-C₁₅, 132-133 C₂-C₆, 126-150 C₇, 160.8 C₉.



***N*-(furan-2-ilmetil)-4-(naftil-2-il-1,3-tiazol)amina. 57.** Sólido color crudo, (R = 18 %) **EM (m/z), (%)**: 306.1 (M, 56.4), 307.1 (12.6), 277.1 (17.4), 184.0 (27.7) **PF** = 120 - 121 °C **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 7.92

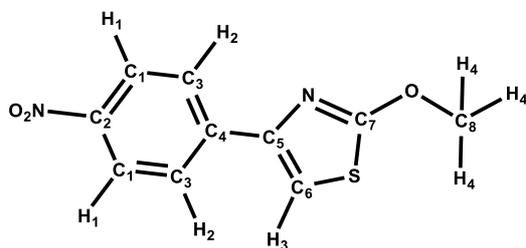
(3H, m, H₁, H₁₂, H₁₉), 8.05 (1H, dd, *J*₁ 4.0, *J*₂ 6.0 Hz, H₂), 8.48 (H, s, H₃), 7.16 (1H, s, H₄), 7.5 (3H, m, H₈, H₁₅, H₁₇), 7.16 (1H, s, H₄), 4.7 (2H, d, *J*₁ 4.0, H₅), 6.43 (2H, m, H₆, H₇), 7.22 (1H, m, H₁₃). **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 41.0 C₁₀, 101.8 C₈, 108.9 C₁₃, 111.6 C₁₄, 124.0 C₄, 124.5 C₅, C₁₅-C₁₇ 125-126 C₃, 128-129 C₁₆-C₁₈, 132.4 C₆, 134.6 C₁, 133.9 C₂, 141.5 C₁₂, 153.6 C₁₁, 150.9 C₇, 168.6 C₉.



***N*-(4-clorobencil)-4-(naftil-1,3-tiazol-2-il)-amina 58.** Sólido color marrón, (R = 7 %) **EM (m/z), (%)**: 350.1 (M, 1.7), 155.1 (98.9), 127.0 (100.0), **¹H (acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 4.35 (2H, s, H₅), 7.10 (1H, s, H₄), 7.32 (2H, d, *J*₁ 8,0 Hz, H₆),

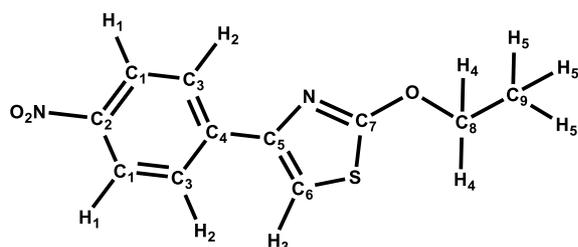
7.40 (2H, d, *J*₁ 8,0 Hz, H₇), 7.59 (2H, m, H₁₅, H₁₇), 8.01 (3H, m, H₁, H₈, H₁₁), 8.52 (1H, m, H₃). **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 49.9 C₁₈, 105.6 C₈, 126 C₁₅-C₁₇-C₁, 127 C₃-C₄-C₅, 128 C₁₄-C₁₆, 128 C₁₂, 129.6 C₁₁, 133 C₂-C₆-C₁₃, 140.5 C₁₀, 150.1 C₇, 165.5 C₉.

Derivados de 4-fenil-2-alquiloxtiazol



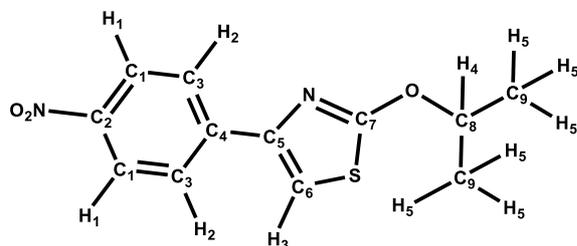
2-metoxi-4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol. 59. Sólido amarillo, (R = 67 %). **EM (m/z), (%)**: 236.0 (M, 100.0), 237.0 (13.1), 238.0 (5.8), 204 (6.0), 175 (35.2) **PF** = 145 - 146 °C **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm)**: 4.20 (3H, s, H₄), 7.67 (1H, s, H₃), 8.19 (2H,

d, *J*₁ 8.0 *J*₂ 8.0 Hz, H₁), 8.30 (2H, d, *J*₁ 8.0 Hz, H₂), **¹³C-NMR δ_C (ppm)**: 59.3 C₈, 105.8 C₆, 124.6 C₃, 127.4 C₁, 140.8 C₅, 146.5 C₄, 148.4 C₂, 175.0 C₇.



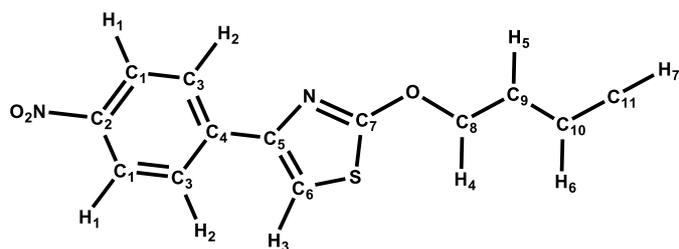
2-etoxi-4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol. 60. Sólido amarillo (R = 34 %). **EM (m/z), (%):** 250.2 (M, 4.2), 251.2 (1.8), 236.2 (25.1), 221.1 (6.2). **PF** = 146 – 148 °C **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 1.42 (3H, t, J_1 8.0 J_2 8.0 Hz, H₅), 4.62 (2H, q, J_1 8.0 J_2

8.0 Hz, H₄), 7.66 (1H, s, H₃), 8.19 (2H, d, J_1 8.0 J_2 8.0 Hz, H₁), 8.30 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₂). **¹³C-NMR δ_C (ppm):** 15.7 C₉, 64.8 C₈, 108.3 C₆, 124.9 C₁, 126.4 C₃, 140.8 C₄, 148.9 C₂, 153.7 C₅, 172.4 C₇.

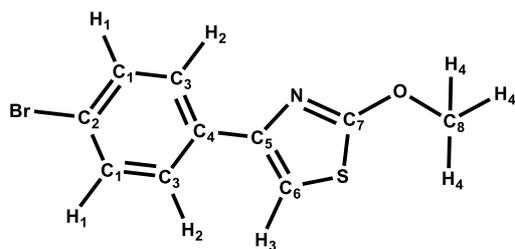


2-isopropoxi-4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol. 61. Sólido amarillo, (R= 22 %) **EM (m/z), (%):** 264.1 (M, 11.5), 265.1 (1.32), 222.0 (100.0), 149.1 (20.1). **PF** = 101 – 102 °C. **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 1.47 (6H, d, J_1 4.0 Hz, H₅), 5.38 (2H, q, J_1 4.0 J_2 4.0 Hz, H₄), 7.64 (1H, s, H₃), 8.18 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₁), 8.30 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₂),

NMR δ_C (ppm): 23.2 C₉, 73.9 C₈, 109.0 C₆, 124.5 C₁, 126.4 C₃, 140.6 C₄, 148.4 C₂, 153.0 C₅, 172.3 C₇.

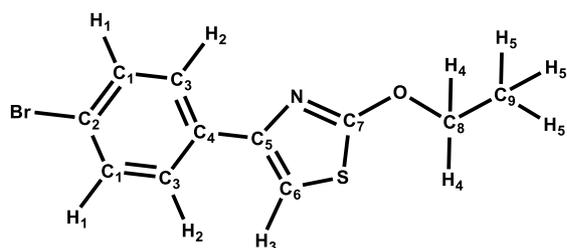


2-butanoxi-4-(4-nitrofenil)-1,3-tiazol. 62. Sólido amarillo, (R= 22 %) **EM (m/z), (%):** 278.1 (M, 14.7), 279.1 (2.5), 222.0 (100.0), 146.1 (4.0). **PF** = 101 – 102 °C. **¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm):** 1.00 (3H, t, J_1 4.0 J_2 8.0 Hz, H₇), 1.52 (2H, m, H₆), 1.86 (2H, m, H₅), 4.58 (2H, t, J_1 8.0 J_2 4.0 Hz, H₄), 7.66 (1H, s, H₃), 8.18 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₂), 8.30 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₁) **NMR δ_C (ppm):** 12.9 C₁₁, 19.4 C₁₀, 30.0 C₉, 72.4 C₈, 109.3 C₆, 124.2 C₁, 126.8 C₃, 140.3 C₄, 150.5 C₂, 152.5 C₅, 175.4 C₇.



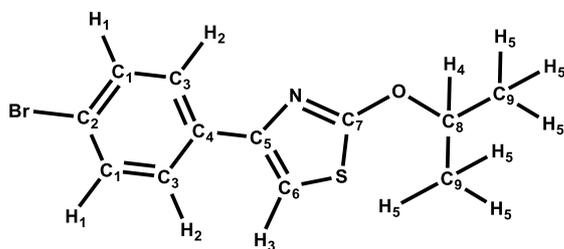
(2H, d, J_1 8.0 Hz, H₂), ¹³C-NMR δ_C (ppm): 59.5 C₈, 110.5 C₆, 123.7 C₂, 128.9 C₃, 131.4 C₁, 132.2 C₄, 152.6 C₅, 175.7 C₇.

2-metoxi-4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol. 63. Sólido blanco, (R = 18 %). EM (m/z), (%): 270.1 (M, 69.3), 268.1 (69.1), 239.9 (3.2), 271.9 (8.88) PF = 107 – 109 °C ¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm): 4.17 (3H, s, H₄), 7.38 (1H, s, H₃), 7.60 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₁), 7.88

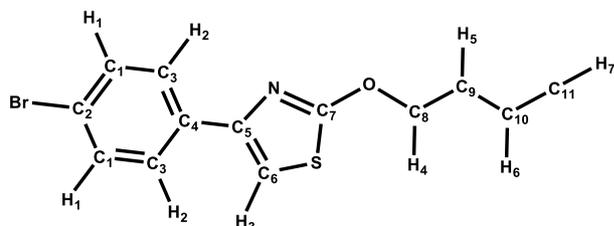


J_2 8.0 Hz, H₄), 7.35 (1H, s, H₃), 7.59 (2H, d, J_1 8.0 J_2 8.0 Hz, H₁), 7.85 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₂). ¹³C-NMR δ_C (ppm): 13.3 C₉, 67.5 C₈, 106.9 C₆, 124.6 C₂, 127.2 C₃, 131.0 C₁, 133.8 C₄, 153.1 C₅, 174.7 C₇.

2-etoxi-4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol. 64. Sólido amarillo (R = 11 %). EM (m/z), (%): 285.0 (M, 96.7), 282.29 (90.3), 256.9 (98.8), 254.9 (100.0). PF = 98 – 99 °C ¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm): 1.40 (3H, t, J_1 8.0 J_2 8.0 Hz, H₅), 4.56 (2H, q, J_1 8.0



2-isopropoxi-4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol. 65. Sólido blanco, (R= 7 %). ¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm): 1.32 (6H, d, J_1 4.0 Hz, H₅), 4.70 (2H, m, H₄), 7.23 (1H, s, H₃), 7.56 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₁), 7.81 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₂).



2-butanoxi-4-(4-bromofenil)-1,3-tiazol. 66. Sólido amarillo, (R= 3 %) EM (m/z), (%): 278.1 (M, 14.7), 279.1 (2.5), 222.0 (100.0), 146.1 (4.0). PF = 97 – 98 °C. ¹H (Acetona, 400 Hz) δ_H (ppm): 0.87 (3H, t, J_1 8.0 J_2 8.0 Hz, H₇), 1.37 (2H, m, H₆), 1.70 (2H, m, H₅), 4.36 (2H, t, J_1 8.0 J_2 4.0 Hz, H₄), 7.20 (1H, s, H₃), 7.44 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₂), 7.72 (2H, d, J_1 8.0 Hz, H₁) NMR δ_C (ppm): 13.2 C₁₁, 19.0 C₁₀, 30.3 C₉, 72.9 C₈, 105.5 C₆, 123.5 C₂, 127.8 C₁, 131.4 C₃, 132.2 C₄, 152.1 C₅, 174.8 C₇

13. REFERENCIAS

1. Anand, A., Patience, A. A., Sharma, N. & Khurana, N. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. *Eur. J. Pharmacol.* **815**, 364–375 (2017).
2. Grøntvedt, G. R., Schröder, T. N., Sando, S. B., White, L. & Bråthen, G. Alzheimer's disease. *Curr. Biol.* **28**, R645–R649 (2018).
3. Association, A. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* **14**, 367–429 (2018).
4. No Title. <http://www.worldlifeexpectancy.com/cause-of-death/>.
5. Awada, A. A. Early and late-onset Alzheimer's disease: What are the differences? *J Neurosci Rural Pr.* **6**, 455–456 (2015).
6. Silva, T., Reis, J., Texeira, J. & Borges, F. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes. *Ageing Res. Rev.* **15**, 116–145 (2014).
7. Ulep, M. G., Saraon, S. K. & McLea, S. Alzheimer Disease. *J. Nurse Pract.* **14**, 129–135 (2018).
8. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. & Hyman, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, 1–23 (2011).
9. Jones, D. T. *et al.* Tau, amyloid, and cascading network failure across the Alzheimer's disease spectrum. *CORTEX* **97**, 143–159 (2017).
10. Sonkusare, S. K., Kaul, C. L. & Ramarao, P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders - Memantine, a new hope. *Pharmacol. Res.* **51**, 1–17 (2005).
11. Madav, Y., Wairkar, S. & Prabhakar, B. Recent therapeutic strategies targeting beta amyloid and tauopathies in Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* **146**, 171–184 (2019).
12. Rubio, a, Pérez, M. & Avila, J. Acetylcholine receptors and tau phosphorylation. *Curr. Mol. Med.* **6**, 423–8 (2006).
13. O'Brein, R. J. & Wong, P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* **34**, 185–204 (2011).
14. Chen, Y.-G. Research Progress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Chin. Med. J. (Engl.)*. **131**, 1618 (2018).
15. Perry, G., Kawai, M., Tabaton, M., Onorato, P., Mulvihill, P., Richey, P., Morandi, J.A., Connolly, J. A., Gambetti, P. Neuropil threads of Alzheimer's disease show a marked alteration of the normal cytoskeleton. *J. Neuroscience* **11**, 1748–1755 (1991).
16. Schiel, K. A. A new etiologic model for Alzheimers Disease. *Med. Hypotheses* **111**, 27–35 (2018).
17. Henriques, A. D., Benedet, A. L., Camargos, E. F., Rosa-Neto, P. & Nóbrega, O. T. Fluid and imaging biomarkers for Alzheimer's disease: Where we stand and where to head to. *Exp. Gerontol.* **107**, 169–177 (2018).
18. Castellani, R. J. & Perry, G. The complexities of the pathology – pathogenesis relationship in Alzheimer disease. *Biochem. Pharmacol.* **88**, 671–676 (2014).
19. Cummings, J. L. *Biomarkers in Alzheimer's disease drug development.* *Alzheimer's & Dementia* vol. 7 (Elsevier Ltd, 2011).
20. Craig, L. A., Hong, N. S. & McDonald, R. J. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **35**, 1397–1409 (2011).

21. Barage, S. H. & Sonawane, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **52**, 1–18 (2015).
22. Pimplikar, S. W. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1261–1268 (2009).
23. Zheng, Y. *et al.* Bioorganic Chemistry Design , synthesis and evaluation of pterostilbene b -amino alcohol derivatives as multifunctional agents for Alzheimer ' s disease treatment. *Bioorg. Chem.* **78**, 298–306 (2018).
24. Scheltens, P. *et al.* Alzheimer ' s disease. *Lancet* **388**, 505–517 (2016).
25. Dumas, J. A. & Newhouse, P. A. Pharmacology , Biochemistry and Behavior The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again : Cholinergic functional compensation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **99**, 254–261 (2011).
26. Bartus RT, Dean III RL, Beer B, L. A. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (80-.)*. **217**, 408–417 (1982).
27. Contestabile, A. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav. Brain Res.* **221**, 334–340 (2011).
28. Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **8**, 595–608 (2018).
29. Drachman, D. A. The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **10**, 372–380 (2014).
30. Hernández, F. *et al.* GSK3 : A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp. Neurol.* **223**, 322–325 (2010).
31. Tong, H. *et al.* Amyloid-beta peptide decreases expression and function of glutamate transporters in nervous system cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **85**, 75–84 (2017).
32. Zoltowska, K. M., Maesako, M., Meier, J. & Berezovska, O. Novel interaction between Alzheimer's disease-related protein presenilin 1 and glutamate transporter 1. *Sci. Rep.* **8**, 8718 (2018).
33. Kodis, E. J., Choi, S., Swanson, E., Ferreira, G. & Bloom, G. S. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx connects amyloid- β oligomers to ectopic neuronal cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **14**, 1302–1312 (2018).
34. Hellström-Lindahl, E. Modulation of β -amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **393**, 255–263 (2000).
35. Yin, Y. *et al.* Accumulation of human full-length tau induces degradation of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ via activating calpain-2. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
36. Islam, B. ul & Tabrez, S. Management of Alzheimer's disease—An insight of the enzymatic and other novel potential targets. *Int. J. Biol. Macromol.* **97**, 700–709 (2017).
37. Atri, A. *et al.* Effect of idalopirdine as adjunct to cholinesterase inhibitors on change in cognition in patients with Alzheimer disease three randomized clinical trials. in *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 319 130–142 (2018).
38. Parsons, C. G., Danysz, W., Dekundy, A. & Pulte, I. Memantine and cholinesterase inhibitors: Complementary mechanisms in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotox. Res.* **24**, 358–369 (2013).
39. Lewis, T. J. & Trempe, C. L. The amyloid cascade hypothesis. in *The end of Alzheimer's* vol. Unknown 26–50 (2017).
40. van Dyck, C. H. Anti-Amyloid- β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biol. Psychiatry* **83**, 311–319 (2017).
41. Ferrero, J. *et al.* First-in-human, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation study of aducanumab (BIIB037) in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2**, 169–176 (2016).

42. Haeberlein, S. B. *et al.* 24-Month Analysis of Change From Baseline in Clinical Dementia Rating Scale Cognitive and Functional Domains in Prime: a Randomized Phase 1B Study of the Anti-Amyloid Beta Monoclonal Antibody Aducanumab. in *Alzheimer's & Dementia* vol. 14 P242 (Elsevier Ltd, 2018).
43. Bachurin, S. O., Gavrilova, S. I., Samsonova, A., Barreto, G. E. & Aliev, G. Mild cognitive impairment due to Alzheimer disease: Contemporary approaches to diagnostics and pharmacological intervention. *Pharmacol. Res.* **129**, 216–226 (2018).
44. Panza, F. *et al.* Monoclonal antibodies against beta-amyloid for treatment of Alzheimer's disease: the beta-amyloid target. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 679–686 (2011).
45. Neve, R. L. & Robakis, N. K. Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci.* **21**, 15–19 (1988).
46. Camacho, V. *et al.* Amyloid PET in neurodegenerative diseases with dementia. *Rev. Esp. Med. Nucl. Imagen Mol.* **37**, 397–406 (2018).
47. Iqbal, K., Liu, F., Gong, C. X. & Grundke-Iqbal, I. Tau and Alzheimer disease and related tautopathies. *Curr. Alzheimer Res.* **7**, 656–664 (2010).
48. Pradeepkiran, J. A., Reddy, A. P. & Reddy, P. H. Pharmacophore-based models for therapeutic drugs against phosphorylated tau in Alzheimer's disease. *Drug Discov. Today* **00**, (2018).
49. Takeda, S. Progression of Alzheimer's disease, tau propagation, and its modifiable risk factors. *Neurosci. Res.* (2018) doi:10.1016/j.neures.2018.08.005.
50. Goodman, Y., Steiner, M. R., Steiner, S. M. & Mattson, M. P. Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid β -peptide toxicity, and attenuates free radical and calcium accumulation. *Brain Res.* **654**, 171–176 (1994).
51. El Kadmiri, N. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease. *Pathol. Biol.* **62**, 333–336 (2014).
52. D'Amelio, M. *et al.* Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **14**, 69–79 (2011).
53. D'Amelio, M., Sheng, M. & Cecconi, F. Caspase-3 in the central nervous system: Beyond apoptosis. *Trends Neurosci.* **35**, 700–709 (2012).
54. Crawford, E. D. & Wells, J. A. Caspase substrate and cellular remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **20**, 1055–1087 (2011).
55. Fuentes-Prior, P. & Salvesen, G. S. The protein structure that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochemistry* **384**, 201–232 (2004).
56. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
57. Fang, B., Boross, P., Tozser, J. & Weber, I. T. Structural and kinetic analysis of caspase-3 reveals role for S5 binding site in substrate recognition. *J. Mol. Biol.* **350**, 654–666 (2006).
58. Agniswamy, J., Fang, B. & Weber, I. T. Plasticity of S2-S4 specificity pockets of executioner caspase-7 revealed by structural and kinetic analysis. *FEBS J.* **274**, 4752–4765 (2007).
59. Fang, B., Fu, A. G., Agniswamy, A. J., Harrison, R. W. & Weber, A. I. T. Caspase-3 binds diverse P4 residues in peptides as revealed by crystallography and structural modeling. 741–752 (2009) doi:10.1007/s10495-009-0333-y.
60. Feeney, B., Pop, C., Swartz, P., Mattos, C. & Clark, A. C. Role of loop bundle hydrogen bonds in the maturation and activity of (Pro)caspase-3. *Biochemistry* **45**, 13249–13263 (2006).
61. Häcker, H. G., Sisay, M. T. & Gütschow, M. Allosteric modulation of caspases. *Pharmacol. Ther.* **132**, 180–195 (2011).
62. Walters, J., Schipper, J. L., Swartz, P., Mattos, C. & Clark, A. C. Allosteric modulation of caspase-3 through

- mutagenesis. *Biosci. Rep.* **32**, 401–411 (2012).
63. Chu, J. *et al.* Gamma secretase-activating protein is a substrate for caspase-3: Implications for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* **77**, 720–728 (2015).
 64. Louneva, N. *et al.* Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **173**, 1488–1495 (2008).
 65. Zhao, M., Su, J., Head, E. & Cotman, C. W. Accumulation of caspase cleaved amyloid precursor protein represents an early neurodegenerative event in aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **14**, 391–403 (2003).
 66. Plóciennik, A., Prendecki, M., Zuba, E., Siudzinski, M. & Dorszewska, J. Activated Caspase-3 and Neurodegeneration and Synaptic Plasticity in Alzheimer's Disease. *Adv. Alzheimer's Dis.* **4**, 63–77 (2015).
 67. Su, J. H., Zhao, M., Aderson, A. J., Srinivasan, A. & Cotman, C. W. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer's pathology. *Brain Res.* **898**, 350–357 (2001).
 68. Masumura, M. *et al.* Caspase-3 activation and inflammatory responses in rat hippocampus inoculated with recombinant adenovirus expressing the Alzheimer amyloid precursor protein. *Mol. Brain Res.* **80**, 219–227 (2000).
 69. Sandhu, P. *et al.* Ser422phosphorylation blocks human Tau cleavage by caspase-3: Biochemical implications to Alzheimer's Disease. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **27**, 642–652 (2017).
 70. Chu, J., Lauretti, E. & Praticò, D. Caspase-3-dependent cleavage of Akt modulates tau phosphorylation via GSK3 β kinase: Implications for Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* **22**, 1002–1008 (2017).
 71. Vickers, C. J., Gonza, G. E. & Wolan, D. W. Selective Detection of Caspase - 3 versus Caspase - 7 Using Activity- Based Probes with Key Unnatural Amino Acids. (2013).
 72. Hardy, J. A. & Wells, J. A. Dissecting an allosteric switch in caspase-7 using chemical and mutational probes. *J. Biol. Chem.* **284**, 26063–26069 (2009).
 73. Feldman, T. *et al.* A Class of Allosteric Caspase Inhibitors Identified by High-Throughput Screening. *Mol. Cell* **47**, 585–595 (2012).
 74. Choong, I. C. *et al.* Identification of potent and selective small-molecule inhibitors of caspase-3 through the use of extended tethering and structure-based drug design. *J. Med. Chem.* **45**, 5005–5022 (2002).
 75. Lee, D. *et al.* Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J. Biol. Chem.* **275**, 16007–16014 (2000).
 76. Chu, W., Rothfuss, J., Zhou, D. & MacH, R. H. Synthesis and evaluation of isatin analogs as caspase-3 inhibitors: Introduction of a hydrophilic group increases potency in a whole cell assay. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 2192–2197 (2011).
 77. Fattorusso, R., Jung, D., Crowell, K. J., Forino, M. & Pellicchia, M. Discovery of a novel class of reversible non-peptide caspase inhibitors via a structure-based approach. *J. Med. Chem.* **48**, 1649–1656 (2005).
 78. Minini, L., Ferraro, F., Cancela, S. & Merlino, A. Insight into the mechanism of action and selectivity of caspase-3 reversible inhibitors through in silico studies. *J. Mol. Struct.* **1147**, 558–568 (2017).
 79. Mata, G., Do Rosário, V. E., Iley, J., Constantino, L. & Moreira, R. A carbamate-based approach to primaquine prodrugs: Antimalarial activity, chemical stability and enzymatic activation. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 886–892 (2012).
 80. Rannard, S. P. & Davis, N. J. The Selective Reaction of Primary Amines with Carbonyl Imidazole Containing Compounds: Selective Amide and Carbamate Synthesis. *Org. Lett.* **2**, 2117–2120 (2002).
 81. Siddiqui, N. & Ahsan, W. Triazole incorporated thiazoles as a new class of anticonvulsants: Design, synthesis and in vivo screening. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 1536–1543 (2010).
 82. Lagoja, I. *et al.* Substituted 2-aminothiazoles are exceptional inhibitors of neuronal degeneration in tau-driven

- models of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharm. Sci.* **43**, 386–392 (2011).
83. Li, Z. *et al.* Design, synthesis and Structure-activity relationship studies of new thiazole-based free fatty acid receptor 1 agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Eur. J. Med. Chem.* **113**, 246–257 (2016).
 84. Franco, J. *et al.* In vitro activity and mode of action of distamycin analogues against African trypanosomes. *Eur. J. Med. Chem.* **126**, 776–788 (2017).
 85. Kuehne, M. E. & Shannon, P. J. Reduction of Amides and Lactams to Amines by Reactions with Phosphorus Oxychloride and Sodium Borohydride. *J. Org. Chem.* **42**, 2082–2087 (1977).
 86. Weber, C. C., Masters, A. F. & Maschmeyer, T. Steric, hydrogen-bonding and structural heterogeneity effects on the nucleophilic substitution of N-(p-fluorophenyldiphenylmethyl)-4-picolinium chloride in ionic liquids. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 2534–2542 (2013).
 87. Denault, J. B. & Salvesen, G. S. Expression, purification and Characterization of Caspases. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Unit 21.13**, 1–15 (2002).
 88. Gasteiger, E. *et al.* ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acid Res.* **31**, 3784–3788 (2003).
 89. Michaelis, L. & Menten, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemistryoc* **49**, 333–369 (1913).
 90. Poreba, M., Strózyk, A., Salvesen, G. S. & Drag, M. Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, 1–20 (2013).
 91. Demon, D. *et al.* Proteome-wide substrate analysis indicates substrate exclusion as a mechanism to generate caspase-7 versus caspase-3 specificity. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 2700–2714 (2009).
 92. Moretti, A. *et al.* Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11860–11865 (2002).
 93. Garcia-Calvo, M. *et al.* Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ.* **6**, 362–369 (1999).
 94. Asha, S. & Vidyavathi, M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 1699–1722 (2010).
 95. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
 96. Langdon, S. P. Cancer Cell Culture. *Cancer Cell Cult.* **731**, 237–245 (2003).
 97. Wen, X. *et al.* Neuroprotective effect of astaxanthin against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells: Involvement of the Akt/GSK-3 β pathway. *Neuroscience* **303**, 558–568 (2015).
 98. Schulz, M. *et al.* Neuroprotective effect of juçara (*Euterpe edulis* Martius) fruits extracts against glutamate-induced oxytosis in HT22 hippocampal cells. *Food Res. Int.* **120**, 114–123 (2019).
 99. Costa, A., Sarmiento, B. & Seabra, V. An evaluation of the latest in vitro tools for drug metabolism studies. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **10**, 103–119 (2014).
 100. Plant, N. Strategies for using in vitro screens in drug metabolism. *Drug Discovery Today* (2004) doi:10.1016/S1359-6446(03)03019-8.
 101. J. Richardson, S., Bai, A., A. Kulkarni, A. & F. Moghaddam, M. Efficiency in Drug Discovery: Liver S9 Fraction Assay As a Screen for Metabolic Stability. *Drug Metab. Lett.* **10**, 83–90 (2016).
 102. Samiei, M. *et al.* Investigating the mutagenic effects of three commonly used pulpotomy agents using the ames test. *Adv. Pharm. Bull.* **5**, 121–125 (2015).
 103. Connors, K. A. *et al.* Comparative pharmaceutical metabolism by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fractions. *Environ. Toxicol. Chem.* **32**, 1810–1818 (2013).

104. Ismail, A. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
105. Gates, L. A., Phillips, M. B., Matter, B. A. & Peterson, L. A. Comparative metabolism of furan in rodent and human cryopreserved hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 1132–1136 (2014).
106. Von Grafenstein, S. *et al.* Precursors for cytochrome P450 profiling breath tests from an in silico screening approach. *J. Breath Res.* **8**, (2014).
107. Kansy, M., Senner, F. & Gubernator, K. Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* **41**, 1007–1010 (1998).
108. Bicker, J., Alves, G., Fortuna, A., Soares-Da-Silva, P. & Falcão, A. A new PAMPA model using an in-house brain lipid extract for screening the blood-brain barrier permeability of drug candidates. *Int. J. Pharm.* **501**, 102–111 (2016).
109. Kansy, M., Avdeef, A. & Fischer, H. Advances in screening for membrane permeability: High-resolution PAMPA for medicinal chemists. *Drug Discov. Today Technol.* **1**, 349–355 (2004).
110. Ruell, J. A. & Avdeef, A. Absorption Screening Using the PAMPA Approach. *Optim. Drug Discov.* 37–64 (2009) doi:10.1385/1-59259-800-5:037.
111. Trial, O. N. D41586-018-05719-4. doi:10.1038/d41586-018-05719-4.
112. Towns, T. G. Determination of Aqueous Phosphate by Ascorbic Acid Reduction of Phosphomolybdic Acid. *Anal. Chem.* **58**, 223–229 (1986).
113. Di, L., Kerns, E. H., Fan, K., McConnell, O. J. & Carter, G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 223–232 (2003).
114. Liu, H. *et al.* In Vitro Permeability of Poorly Aqueous Soluble Compounds Using Different Solubilizers in the PAMPA Assay with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Detection. *Pharm. Res.* **20**, 1820–1826 (2003).
115. Mortelmans, K. & Zeiger, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **455**, 29–60 (2000).
116. McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J. & Ames, B. N. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 979–983 (1975).
117. Maron, D. M. & Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* **113**, 173–215 (1983).
118. Balasubramanyam, A. *et al.* In vitro mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the Salmonella/microsome assay. *Toxicol. Vitr.* **24**, 1871–1876 (2010).
119. Zahin, M., Ahmad, I., Gupta, R. C. & Aqil, F. Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo[a]pyrene induced DNA adducts. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
120. Zeiger, E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **841**, 43–48 (2019).
121. Chu, K. C. *et al.* EVALUATING STATISTICAL ANALYSES AND REPRODUCIBILITY OF MICROBIAL MUTAGENICITY ASSAYS. *Mutat. Res.* **85**, 119–132 (1981).
122. Sun, H. & Scott, D. O. Structure-based drug metabolism predictions for drug design. *Chem. Biol. Drug Des.* **75**, 3–17 (2010).
123. Morris, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **19**, 1639–1662 (1998).
124. Fratev, F., Steinbrecher, T. & Jónsdóttir, S. Ó. Prediction of Accurate Binding Modes Using Combination of Classical and Accelerated Molecular Dynamics and Free-Energy Perturbation Calculations: An Application to Toxicity Studies. *ACS Omega* **3**, 4357–4371 (2018).

125. Morris, G. *et al.* Autodock4 and autodocktools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791 (2009).
126. Cui, M., Mihaly, M., Hong-Xing, Z. & Meng, X.-Y. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* **7**, 146–157 (2011).
127. MacKerell, A. D. *et al.* All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586–3616 (1998).
128. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S. & Tirado-Rives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225–11236 (1996).
129. Scott, W. R. P. *et al.* The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J. Phys. Chem. A* **103**, 3596–3607 (1987).
130. Wang, R. M., Wolf, J. W., Caldwell, P. A., Kollman, D. & Case, A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem* **25**, 1157–1174 (2004).
131. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. & Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **97**, 10269–10280 (1993).
132. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690 (1984).
133. Nosé, A. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *J. Chem. Phys.* **81**, 511–519 (1984).
134. Hoover, W. G. Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. *Phys Rev A Gen Phys* **31**, 1695–1697 (1985).
135. Allan, M. P. & Tildesley, D. J. Computer simulations of liquids, clarendon press. **1987**.
136. Aqvist, J., Wennerstrom, P., Nervall, M., Bjelic, S. & Brandsdal, B. O. Molecular dynamics simulations of water and biomolecules with a Monte Carlo constant pressure algorithm. *Chem. Phys. Lett.* **384**, 288–294 (2004).
137. Essmann, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577–8593 (1995).
138. Mortier, J. *et al.* The impact of molecular dynamics on drug design: Applications for the characterization of ligand-macromolecule complexes. *Drug Discov. Today* **20**, 686–702 (2015).
139. Frisch, M. J. *et al.* Gaussian 09 Rev. D.0.1. *Gaussian, Inc, Wallingford, CT, USA.* (2013).
140. Mennucci, B. Polarizable continuum model. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2**, 386–404 (2012).
141. Tomasi, J., Mennucci, B. & Cancès, E. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. *J. Mol. Struct.* **464**, 211–226 (1999).
142. Bondi, A. van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem* **68**, 441–451 (1964).
143. Becker, J. *et al.* Reducing the peptidyl features of caspase-3 inhibitors: a structural analysis. *J Med Chem.* **47**, 2466–2474 (2004).
144. Agniswamy, J., Fang, B. & Weber, I. T. Conformational similarity in the activation of caspase-3 and -7 revealed by the unliganded and inhibited structures of caspase-7. *Apoptosis* **14**, 1135–1144 (2009).
145. Case, D. A. *et al.* AMBER 2016, University of California, San Francisco. (2016).
146. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327–341 (1977).
147. Shao, J., Tanner, S. W., Thompson, N. & Cheatham, T. E. Clustering and molecular dynamics trajectories: Characterizing the performance of different clustering algorithms. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 2312–2334 (2007).

148. Meyer, B. & Peters, T. NMR Spectroscopy of Proteins NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors *Angew. Chem. Int. Ed* **42**, 864–890 (2003).
149. Pellecchia, M. Solution nuclear magnetic resonance spectroscopy techniques for probing intermolecular interactions. *Chem. Biol.* **12**, 961–971 (2005).
150. Gossert, A. D. & Jahnke, W. NMR in drug discovery: A practical guide to identification and validation of ligands interacting with biological macromolecules. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **97**, 82–125 (2016).
151. Harner, M. J., Mueller, L., Robbins, K. J. & Reily, M. D. NMR in drug design. *Arch. Biochem. Biophys.* **628**, 132–147 (2017).
152. Viegas, A., Manso, J., Corvo, M. C., Marques, M. M. B. & Cabrita, E. J. Binding of ibuprofen, ketorolac, and diclofenac to COX-1 and COX-2 studied by saturation transfer difference NMR. *J. Med. Chem.* **54**, 8555–8562 (2011).
153. Merlino, A. *et al.* Amidines bearing benzofuroxan or benzimidazole 1,3-dioxide core scaffolds as Trypanosoma cruzi-inhibitors: Structural basis for their interactions with cruzipain. *Medchemcomm* **3**, 90–101 (2012).
154. Laplante, S. R. *et al.* Compound Aggregation in Drug Discovery : Implementing a Practical. *J. Med. Chem.* **56**, 5142–5150 (2013).
155. Savjani, K. T., Gajjar, A. K. & Savjani, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm.* **2012**, 1–10 (2012).
156. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26 (2001).