



Tesis de Maestría en Química
Facultad de Química – PEDECIBA Química
Universidad de la República – Uruguay



***Nitronas como potenciales fármacos
neuroprotectores para el tratamiento de la
Enfermedad de Alzheimer: un abordaje
multidisciplinario.***

Lic. Saira Cancela

Orientadoras: Dra. Alicia Merlino

Dra. Paola Hernández

Dra. María Laura Lavaggi

Dra. Patricia Lagos

Noviembre 2020



Contenidos

1.1.1. Relevancia en el mundo.	9
1.1.2. Mecanismos básicos en neurodegeneración.	10
1.1.3. Tratamientos actuales para la EA.	13
1.2.1. Roles de la caspasa-3 en neurodegeneración.	13
1.2.2. Caspasas: Función, estructura y actividad biológica.	16
1.2.3. Mecanismo de reconocimiento y unión al sustrato.	19
1.2.4. Inhibidores de caspasa-3.	20
1.3.1. Estructura química, propiedades farmacológicas y aplicaciones en química medicinal de las nitronas.	21
1.3.2. Propiedades farmacológicas y aplicaciones en química medicinal de derivados de tiadiazoles y tiazoles.	24
2.1. Objetivo general.	31
2.2. Objetivos específicos.	31
3.1.1. Consideraciones generales.	33
3.1.2. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-etoxycarbonil-1,3-tiazol.	33
3.1.3. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol.	34
3.1.4. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-formil-1,3-tiazol.	34
3.1.5. Síntesis de derivados de α -(4-aryl-1,3-tiazol-2-il)-N-tert-butilnitrona.	34
3.2.1. Aspectos generales.	35
3.2.2. Cultivo celular.	35
3.2.3. Estudio de la viabilidad celular.	36
3.2.4. Determinación de la actividad antioxidante.	36
3.2.4.1. Determinación de la viabilidad celular en presencia de H_2O_2	36
3.2.4.2. Determinación del efecto antioxidante.	37
3.2.5. Inhibición de la apoptosis.	38
3.3.1. Consideraciones generales.	39
3.3.2. Obtención de enzimas recombinantes.	40
3.3.3. Estimación de la concentración enzimática.	40
3.3.4. Actividad enzimática.	41
3.3.5. Puesta a punto de la concentración de enzima.	42
3.3.6. Determinación de parámetros cinéticos: K_M y V_{max}	42
3.4.1. Efecto de apagamiento de la fluorescencia.	42
3.4.2. Inhibición de la actividad enzimática.	43
3.5.1. Aproximación a la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica (PAMPA) ...	44

3.6.1. Consideraciones generales.....	45
3.6.2. Búsqueda de bolsillos de unión a ligando.....	46
3.6.3. Análisis hotspot.....	46
3.6.4. <i>Docking</i> molecular.....	47
3.6.4.1. Preparación de las dianas para <i>docking</i>	47
3.6.4.2. <i>Docking</i> molecular.....	47
3.6.5. Optimización de la estructura tridimensional de moléculas orgánicas.....	48
3.6.6. Preparación de los sistemas para simulaciones de dinámica molecular.....	48
3.6.7. Simulaciones de dinámica molecular convencional.....	49
3.6.7.1. Equilibrado.....	49
3.6.7.2. Producción de la simulación.....	49
3.6.8. Dinámica molecular acelerada.....	49
3.6.9. Análisis de los componentes principales (PCA).....	51
4.1.1. Síntesis de derivados 4-Aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol.....	53
4.1.2. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol.....	54
4.1.3. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-formil-1,3-tiazol.....	55
4.1.4. Síntesis de derivados de α -(4-aryl-1,3-tiazol-2-il)- <i>N-tert</i> -butilnitrona.....	56
4.2.1. Determinación de la viabilidad celular.....	60
4.2.2. Determinación de la actividad antioxidante.....	61
4.2.2.1. Determinación de la viabilidad celular.....	61
4.2.2.2. Determinación de la actividad antioxidante.....	62
4.2.2.2.1. Inducción de ROS intracelular.....	62
4.2.2.2.2. Actividad antioxidante de derivados de nitrona.....	62
4.2.3. Determinación de la inhibición de apoptosis celular.....	64
4.1.2. Expresión de enzimas recombinantes.....	67
4.3.2. Determinación de la concentración de caspasa-3 y -7.....	68
4.3.3. Actividad enzimática.....	69
4.3.4. Determinación de parámetros cinéticos: K_M y V_{max}	71
4.1.2. Efecto de apagamiento de la fluorescencia.....	75
4.4.2. Inhibición de la actividad enzimática.....	78
4.5.1. Aproximación a la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica (PAMPA)...	80
4.6.1. Predicción de bolsillos de unión a ligando.....	82
4.6.2. Hotspots.....	84
4.6.3. Simulaciones de dinámica molecular.....	86

Agradecimientos

Le agradezco a Alice por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación en su línea de trabajo, por creer en mí y por brindarme oportunidades que me han permitido crecer, aprender y consolidarme como científica. Deseo que donde quiera que este se sienta orgullosa del trabajo logrado ya que gran parte del mérito es suyo.

Le agradezco a Paola por enseñarme sobre técnicas de cultivo celular, por apoyarme y por brindarme soluciones cuando las necesite.

A María Laura gracias por incorporarte como orientadora del trabajo, por ayudarme con la síntesis, apoyarme y hacerte cargo de la parte administrativa.

A Patricia Lagos gracias por el apoyo y estar presente a lo largo de estos años.

A Fernando Ferreira gracias por permitirme hacer la síntesis en su laboratorio.

A Lucía Minini por ayudarme con la síntesis, realizar el ensayo PAMPA y estar siempre dispuesta a darme una mano.

A Gustavo Mourglia por su buena predisposición y colaboración en los ensayos de apoptosis.

A Lucía Canclini por colaborar en los ensayos de ROS y estar siempre dispuesta a ayudar.

A Ileana Corvo y su grupo por producir la caspasa-3 y -7 recombinantes y hacérselas llegar.

A Patricia Burgos por recibirme en su laboratorio y a Hianara Bustamante por enseñarme la técnica de Western Blot y ayudarme en mi trabajo durante mi estancia.

A Nuria Campillo por recibirme en su laboratorio y a Carlos Roca por guiarme en mi trabajo de modelado computacional y colaborar en la obtención y análisis de resultados.

A Mariana Ingold por ayudarme con los espectros de masa y anteriormente con la síntesis de nitronas.

Al laboratorio de Química Orgánica por permitirme realizar los ensayos de puntos de fusión.

Al laboratorio de Enzimología por permitirme realizar los ensayos enzimáticos.

A mis compañeros, amigos y familia por el apoyo y aliento a seguir.

A todas las personas que de una u otra manera hicieron esta tesis posible!!

Gracias infinitas a todos!!

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en el mundo, con alrededor de 47.5 millones de personas afectadas. Actualmente no existe cura y los únicos fármacos aprobados para su tratamiento tienen como efecto una mejora transitoria de los síntomas de la enfermedad, pero no son capaces de revertir o detener el daño neuronal asociado. Esto se debe a que los procesos bioquímicos que desencadenan la enfermedad aún se desconocen. Un rasgo distintivo y común en los procesos neurodegenerativos es el aumento intracelular de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, lo que desencadena una serie de eventos que conducen a la apoptosis.

La enzima caspasa-3 ha sido identificada como un blanco terapéutico interesante, ya que la misma no sólo actúa como un mediador clave en la apoptosis neuronal, sino que también participa en procesos no apoptóticos mediante la formación de fragmentos tóxicos de proteínas específicas que afectan la sinapsis y la plasticidad neuronal en etapas tempranas de la EA. Se ha observado que la caspasa-3 no sólo se activa selectivamente en células de hipocampo de ratones transgénicos modelo de EA alterando la función sináptica que da inicio a la pérdida de memoria, sino que también en cerebros de pacientes con EA existen niveles elevados de esta enzima.

En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos capaces de modular la sobreactivación de caspasa-3, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en el desarrollo de inhibidores reversibles y selectivos de caspasa-3 evidenciando que aquellos compuestos derivados de tiazol y nitrona (imina *N*-óxido) son buenos inhibidores de caspasa-3 y presentan elevada capacidad antioxidante. En base a estos antecedentes, en el presente trabajo se realizó la síntesis de nuevas moléculas híbridas conteniendo agrupamientos nitrona y tiazol diseñadas para potenciar la selectividad y actividad inhibitoria frente a caspasa-3. Se determinó el efecto neuroprotector antioxidante, antiapoptótico, la capacidad inhibitoria frente a caspasa-3 y caspasa-7 *in vitro* y se realizaron estudios teóricos de *docking* y dinámica molecular para estudiar la interacción a nivel atómico de los compuestos en la caspasa-3 y caspasa-7. Los resultados obtenidos muestran que los compuestos evaluados son excelentes agentes antioxidantes y antiapoptóticos, y moderados inhibidores de caspasa-3. El análisis teórico indica que los derivados se unen en la zona de la interfase cercano al sitio alostérico interaccionando con residuos clave para mantener la conformación activa de la enzima caspasa-3 y con menor afinidad en caspasa-7. Las nitronas **a4** y **a6** presentan muy buena actividad neuroprotectora e inhiben al menos un 20% la actividad caspasa-3. Esto las posiciona como nuevos hits para el rediseño y desarrollo de futuros potenciales fármacos contra EA y otras enfermedades neurodegenerativas.

Abreviaturas

Aβ	Péptido beta-amiloide
Ala	Alanina
AMC	7-amino-4-metilcumaria
AMPA	Receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
Apaf1	<i>Apoptosis protease-activating factor-1</i>
APP	Proteína precursora amiloide
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
AV	Anexina V
BCL	Baicaleína
BHE	Barrera Hematoencefálica
CPT	Camptotecina
Cys	Cisteína
DCF	Diclorodihidrofluoresceína
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilen diamino tetra-acético
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EN	Enfermedades neurodegenerativas
EM	Esclerosis múltiple
EP	Enfermedad de Parkinson
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
Glu	Glutamato
His	Histidina
IEF-PCM	<i>Integral Equation Formalism - Polarizable Continuum Model</i>
Ile	Isoleucina

IP	Ioduro de propidio
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MD	<i>Molecular Dynamics</i>
MeOH	Metanol
Met	Metionina
MM-PBSA	<i>Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area</i>
MS	Mass spectroscopy
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol
NFTs	Neurofibrillary tangles
NMDA	Receptores de N-metil-D-aspartato
Papp	Permeabilidad aparente
PCA	<i>Principal component analysis</i>
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
PF	Punto de fusión
RMSD	<i>Root-mean square deviation</i>
RMSF	<i>Root-mean square fluctuation</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Reactive oxygen species
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SOD1	Superóxido dismutasa 1
THF	Tetrahidrofolato
Thr	Treonina
TPSA	Área de superficie polar topológica
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

1. Introducción

1.1. La Enfermedad de Alzheimer.

1.1.1. Relevancia en el mundo.

Las enfermedades neurodegenerativas son crónicas y se caracterizan por la pérdida lenta, progresiva e irreversible de neuronas en determinadas áreas del sistema nervioso lo que conlleva a alteraciones en la sinapsis y funciones específicas del cerebro como la memoria, el movimiento y el desarrollo cognitivo [1]. Estos desórdenes neurológicos tienen un alto impacto a nivel mundial y constituyen un serio problema de salud pública en especial en países de bajos recursos, debido a su alta prevalencia y costo socioeconómico. De acuerdo a un reporte de la organización mundial de la salud (OMS) en el año 2015 los desórdenes neurodegenerativos son responsables de casi el 14% de la tasa global de morbilidad [2].

De entre las principales enfermedades neurodegenerativas, el Alzheimer (EA), el Parkinson (EP) y la Esclerosis Múltiple (EM) son responsables de la mayoría de los casos detectados en el mundo, estando las dos primeras estrechamente relacionadas con la edad. La EA es la primera causa de demencia en el mundo, en el 2016 afectaba alrededor de 47.5 millones de personas y se estima que en unos 20 años este número podría ascender a 131.5 millones [3]. Las estadísticas también indican que cada 68 segundos se diagnostica un nuevo paciente con enfermedad de Alzheimer [4], estimándose que para el año 2050 una de cada 85 personas en el mundo tendrá Alzheimer [5,6].

Teniendo en cuenta el incremento poblacional, el aumento en la esperanza de vida y el envejecimiento de la población, todo indicaría que la prevalencia y la incidencia de estas enfermedades tiende a ir en ascenso, principalmente en los países con ingresos bajos y medios [7,8].

Luego de décadas de estudio, se puede evidenciar que estas patologías están relacionadas con el mal procesamiento de diversas proteínas, lo que resulta en la formación de agregados y depósitos de proteínas anormales a los cuales las neuronas son particularmente vulnerables [9-14]. Las causas continúan siendo desconocidas y, por lo tanto, actualmente no existe una cura para este tipo de patologías. Lamentablemente, los tratamientos utilizados actualmente no previenen ni detienen el progreso de las mismas, sino que producen una mejora transitoria de los síntomas, aunque pierden eficacia con el paso del tiempo, y pueden causar varios efectos secundarios [15,17].

En este sentido, es de gran urgencia generar conocimiento acerca de los mecanismos celulares implicados en el desarrollo y progreso de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas, con el fin de encontrar nuevos blancos moleculares para el desarrollo de terapias efectivas.

1.1.2. Mecanismos básicos en neurodegeneración.

Los principales mecanismos que conducen a la neurodegeneración son multifactoriales e incluyen factores genéticos, ambientales y endógenos asociados a la edad. A lo largo de los años, se han propuesto diversas hipótesis que intentan explicar los mecanismos moleculares de daño celular implicados en neuropatologías [28-24]. Si bien estas han brindado un marco de referencia para las investigaciones en esta área, el rol patogénico y los mecanismos básicos moleculares que subyacen a estos desórdenes no han sido del todo elucidados y, por tanto, aún no se ha logrado dar cuenta de los orígenes de las mismas [6,25].

A pesar de la heterogeneidad presente en las distintas enfermedades neurodegenerativas, existen varios procesos relevantes comunes a estos trastornos en los que se incluyen: alteraciones en la proteostasis (homeostasis proteica dentro de la célula) debido a deficiencias del sistema ubiquitina-proteosoma y de la autofagia (responsables del transporte, degradación y reciclaje de proteínas innecesarias)[26-28], producción y acumulación de proteínas anormales y/o metabolismo alterado de las mismas [29-32], procesos pro-inflamatorios, acumulación de radicales libres y estrés oxidativo [33-35], daño mitocondrial [36], alteraciones en la homeostasis del calcio [37], excitotoxicidad [38], y resistencia central a la insulina [39], entre otros. Todos estos mecanismos interrelacionados conllevan finalmente a la muerte celular programada. Más concretamente, la característica común en estas patologías de formar agregados insolubles de proteínas denominadas “amiloides” en diferentes áreas del cerebro, conlleva a la muerte celular y daño inflamatorio en zonas específicas del cerebro. Un amiloide es una proteína fibrosa compleja que está compuesta por proteínas acumuladas en una estructura particular similar a una hoja plegada. Los depósitos de amiloide en forma de placas de amiloide se asocian con una variedad de enfermedades degenerativas [40], su localización puede ser intra- o extra-celular y la sintomatología clínica depende del área cerebral afectada. En este contexto es que surge la hipótesis amiloide de la EA, la cual dominó el campo de la investigación de dicha enfermedad en los últimos 20 años siendo la patología con amiloide cerebral más ampliamente estudiada. Esta sostiene que hay una sobreproducción del péptido A β como consecuencia de la interrupción de los procesos homeostáticos que regulan la escisión proteolítica de la proteína precursora amiloide (APP) [41]. La proteína APP es una proteína transmembrana con un segmento extracelular amino terminal largo y un segmento intracelular carboxilo terminal corto. La vía amiloidogénica produce el péptido A β por medio del clivaje sucesivo de β - y γ -secretasas. La acción de la β -secretasa (BACE1) genera un fragmento carboxilo terminal (llamado C99 o CTF β) que es sucesivamente clivado por la γ -secretasa liberando A β . La producción y acumulación de los péptidos A β 40 o A β 42 de esta vía forman agregados insolubles altamente neurotóxicos.

Mientras que en la vía no amiloidogénica el APP es clivado por la α -secretasa aproximadamente en el medio de la región A β . Esto genera un APP CTF truncado (llamado C83 o CTF α) que carece de la porción amino terminal del dominio A β . El clivaje sucesivo del C83 por la γ -secretasa libera un péptido A β truncado (p3). La γ -secretasa además de liberar A β del C99 y p3 del C83 genera en ambos casos un fragmento que se corresponde con el dominio intracelular del APP (AICD) (Figura 1). Este fragmento se libera en el citosol y se cree que podría llevar a cabo funciones de señalización en el núcleo [42,43].

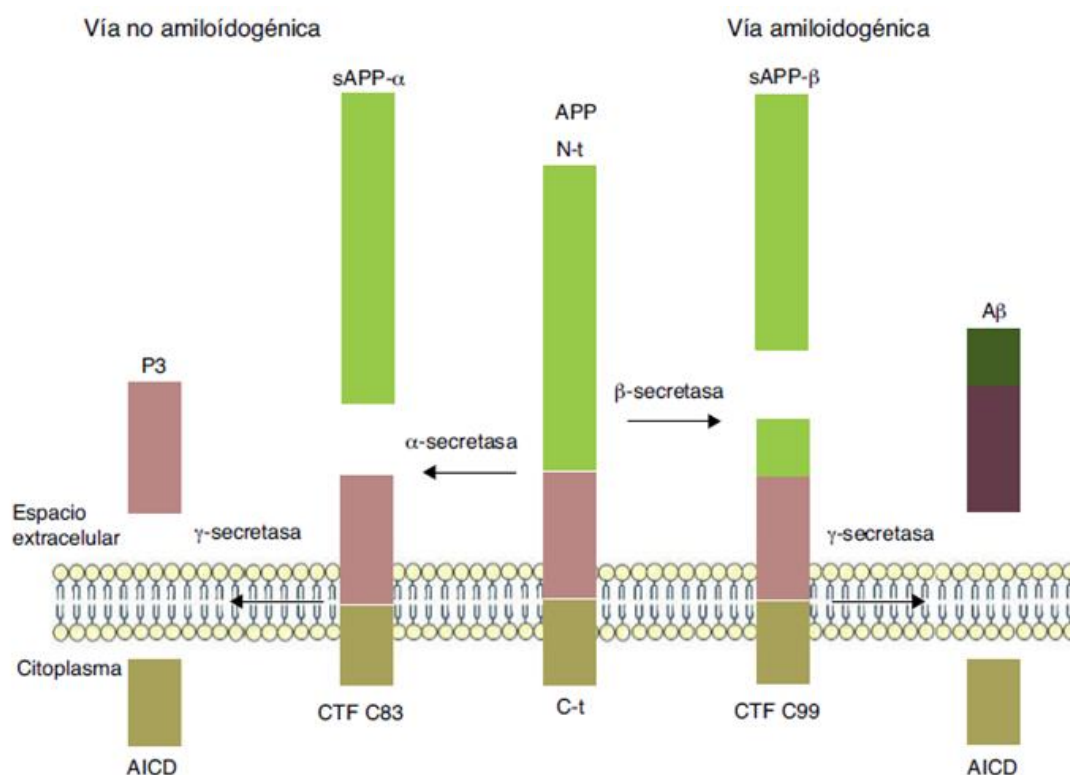


Figura 1. Esquema representativo de la vía de procesamiento de la proteína precursora del péptido amiloide (APP) en condiciones fisiológicas y patológicas. Tomado de ref. [44].

Previo a la aparición de placas seniles se produce un aumento en la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*) intracelular como radicales del tipo hidroxilo (.OH), anión superóxido (O_2^-), óxido nítrico (.ON), peroxinitrito ($ONOO^-$) [48], los cuales son claves para la agregación de proteínas en etapas tempranas de la patología [35,45]. Este incremento intracelular de ROS y RNS genera daño oxidativo en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos iniciando una cascada de eventos, incluidas alteraciones en la respiración mitocondrial, la excitotoxicidad y un aumento

excesivo del calcio citosólico que conducen a la disfunción celular. Además, los productos de estas reacciones, son capaces de interactuar con receptores a múltiples ligandos que activan señales de transducción induciendo la formación de citoquinas pro-inflamatorias, que son en parte responsables del comienzo y la progresión de estas neuropatías (Figura 2) [39].

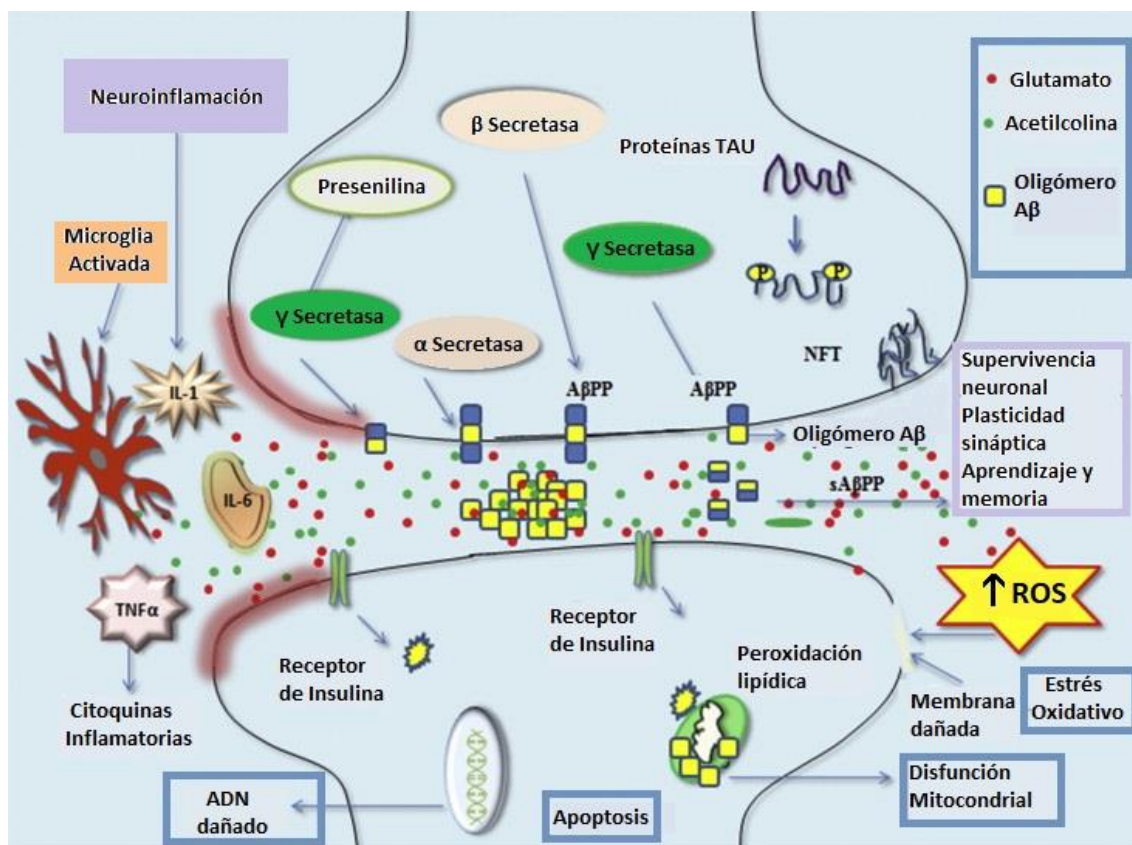


Figura 2. Neurobiología de la enfermedad de Alzheimer. APP: Proteína precursora de amiloide, AβPP: Proteína precursora de beta amiloide, sAβPP: Proteína precursora de beta amiloide soluble, ROS: Especies Reactivas del Oxígeno, IL-1: Interleucina-1, IL-6: Interleucina-6, TNF: Factor de Necrosis Tumoral Alfa, NFT: Ovillos Neurofibrilares. Adaptado de ref. [49].

La disfunción mitocondrial genera efectos deletéreos en las neuronas, incluyendo la activación de la óxido nítrico sintasa, el desacople de la fosforilación oxidativa con efectos negativos en la energía de la mitocondria y la activación de la transición de la permeabilidad mitocondrial. Este último fenómeno, en el cual se produce un cambio abrupto en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna en respuesta a calcio, estrés oxidativo y depleción de ATP, contribuye a la citotoxicidad por necrosis y/o apoptosis [50,51]. Recientemente se han encontrado dentro de las mitocondrias proteínas relacionadas con EA, EP, ELA y EH, entre las que se destacan APP, Aβ, presenilina, α-sinucleína, parkin, SOD1 y huntingtina respectivamente las cuales promueven la

liberación de citocromo c desde la mitocondria y la consecuente cascada apoptótica de las caspasas [51-54].

1.1.3. Tratamientos actuales para la EA.

Los fármacos que se utilizan actualmente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas únicamente llegan a una parte de la población afectada debido a que son costosos [4], y están dirigidos exclusivamente al alivio sintomático de la enfermedad siendo incapaces de revertir o detener el daño neurológico asociado.

En el caso de la EA existen únicamente cinco fármacos aprobados por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) para su tratamiento. Estos son inhibidores de acetilcolinesterasa - Tacrina, Donepezilo, Galantamina y Rivastigmina-; y el antagonista del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) – Memantina - que inhibe la acción tóxica del glutamato en las neuronas. Su uso genera una mejora a nivel cognitivo, pero tienen la desventaja de tener varios efectos adversos [55]. Tacrina fue retirada del mercado en 2012 debido a su hepatotoxicidad [56].

Una opción alternativa de terapia para la EA fue propuesta hace unos años en base al uso de anticuerpos anti-A β . Sin embargo, los mismos no fueron capaces de superar los ensayos clínicos de fase III. Se observó que son poco eficientes en lo que respecta a la mejora cognitiva en pacientes con Alzheimer en etapas intermedias [57]. Esto condice con que a pesar de la cantidad de ensayos clínicos en fase III que se llevan a cabo, desde el 2004 no se han aprobado nuevos agentes terapéuticos.

1.2. Caspasa-3 como nuevo blanco molecular para el tratamiento y/o prevención de EA.

1.2.1. Roles de la caspasa-3 en neurodegeneración.

La apoptosis es un mecanismo clave en la muerte de neuronas en neurodegeneración [58] y otras patologías como isquémica, cardiomiopatías, sepsis y diabetes tipo I [59,60]. En particular la caspasa-3, entre todas las caspasas, se ha identificado como un blanco molecular común a varios desórdenes neurodegenerativos desde que se conoce su implicancia en la progresión de EA [61], y también en EP, EH, y ELA [62-65]. Además, se ha demostrado que la caspasa-3 cumple determinados roles no apoptóticos en procesos neurodegenerativos. La misma se encuentra implicada en el clivaje de proteínas específicas vinculadas a EA, PD y HD, generando fragmentos

tóxicos que contribuyen de alguna manera al desarrollo neuropatogénico de estas enfermedades [66-71].

Hasta ahora, cuatro proteínas han sido identificadas como factores etiológicos críticos para la EA, estas son: apolipoproteína E, presenilina-1 (PSEN-1), presenilina-2 (PSEN-2) y APP [50]. Interesantemente, se han detectado tres sitios de corte para caspasa-3 en la secuencia proteica de APP: dos en el dominio extracelular y uno en el extremo intracelular C-terminal [72] lo que altera su procesamiento proteolítico normal favoreciendo la vía amiloidogénica [64,73].

Estudios sostienen que el aumento del péptido A β observado después de la activación de caspasa-3 es independiente del clivado del APP por esta enzima [74]. Sin embargo, se demostró que el péptido A β induce a la caspasa-3 a clivar el APP en la posición Asp664 de la región C-terminal del mismo liberando el fragmento C-terminal (C31) potencialmente citotóxico. A su vez, un estudio que utilizó ratones transgénicos y muestras de tejido de cerebro de pacientes humanos *post-mortem*, observó que el aumento del péptido A β está dado por la activación vía caspasa-3 de la proteína activadora de γ -secretasa conocida como GSAP responsable de generar los péptidos A β 41 y A β 42 encontrados en las placas amiloides. Asimismo, se observó que la inhibición de caspasa-3 disminuye significativamente la fosforilación de la proteína Tau en modelos murinos transgénicos [50]. Esto se correlaciona con la implicancia de caspasa-3 en la truncación de Tau, ya que la misma cliva a la proteína Akt1 supresora de la quinasa GSK-3 que fosforila a Tau [75,76], lo que favorece la formación de ovillos neurofibrilares que contribuyen a la degeneración sináptica durante el progreso de la enfermedad [50,77-79].

Un estudio que utiliza modelos de ratones transgénicos con EA proporciona evidencias de que existe un aumento en la actividad caspasa-3 en las etapas iniciales de esta enfermedad, y que esto está vinculado al desarrollo de alteraciones en la transmisión sináptica proporcionándole funciones no apoptóticas dentro de la célula. El modelo propuesto para la pérdida sináptica mediada por el péptido A β sostiene que la acumulación de A β en las dendritas conlleva al estrés mitocondrial y la subsiguiente liberación de citocromo-c promoviendo la formación del apoptosoma y finalmente la activación de caspasa-3. Esta última activa la calcineurina, que desfosforila a los receptores AMPA con la consecuente remoción de los mismos de la superficie de la dendrita causando degeneración de las espinas dendríticas [50,80]. Como consecuencia de todos estos procesos se producen alteraciones en la transmisión sináptica y plasticidad del sistema nervioso (Figura 3). Asimismo, en este estudio se observó que la inhibición de caspasa-3 es capaz de restaurar la transmisión sináptica en ratones con síntomas iniciales de EA [80].

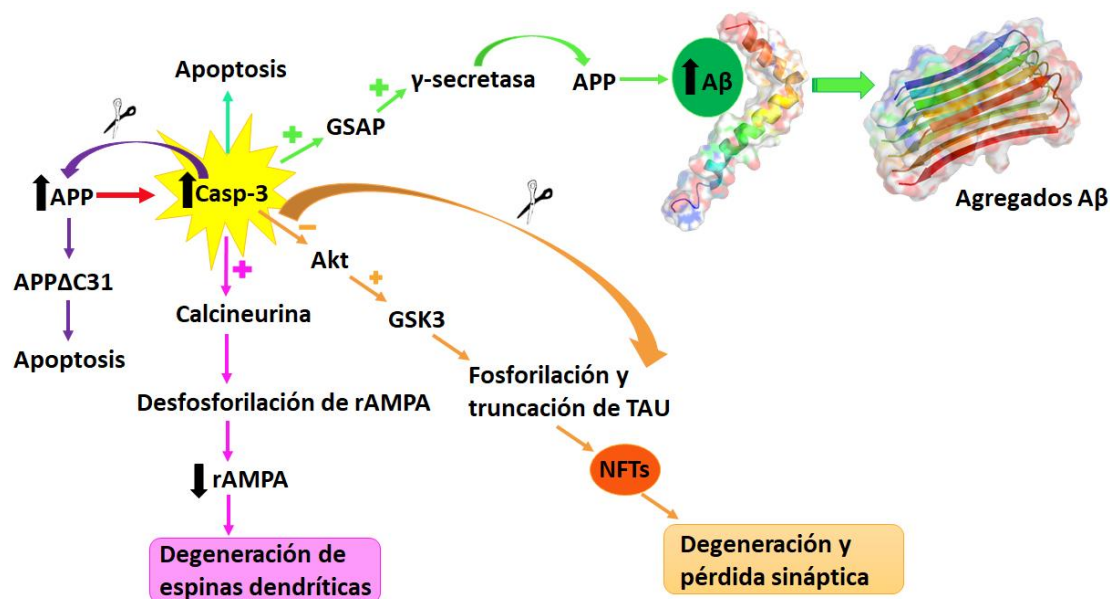


Figura 3. Roles de caspasa-3 en neurodegeneración. APP: Proteína precursora de amiloide, rAMPA: Receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico, Akt: Proteína quinasa de treonina, GSK3: Glucógeno sintasa-3-quinasa, NFTs: Ovillos neurofibrilares, GSAP: Proteína activadora de γ -secretasa A β : Péptido beta amiloide.

La sobreexpresión y aumento en la actividad caspasa-3 también se ha descrito en pacientes y modelos *in vivo* de EP, EH y ELA [81-84]. Caspasa-3 desempeña un papel crucial en la patogenia de estas otras enfermedades neurodegenerativas mediante la generación de fragmentos de proteínas tóxicas, inhibiendo transportadores de glutamato promoviendo así la excitotoxicidad, y volviendo a las neuronas mucho más sensibles a la muerte neuronal, entre otros [85].

Estos hallazgos experimentales sugieren que el rol de esta proteasa no es solamente ser un mediador de la muerte celular programada, sino que estaría participando de forma activa en la degeneración y disfunción neuronal durante el desarrollo de estas enfermedades. La sobreexpresión y activa participación de caspasa-3, así como los resultados positivos obtenidos tras su inhibición estarían sugiriendo que esta enzima podría ser uno de los blancos moleculares responsables del inicio y progresión de estos desórdenes. Por lo tanto, la modulación reversible y selectiva de caspasa-3 podría resultar en una estrategia atractiva para el tratamiento de EA y otras enfermedades neurodegenerativas [63,80,86-88].

1.2.2. Caspasas: Función, estructura y actividad biológica.

Las caspasas son una familia de cisteín-aspartato-proteasas. Estas proteínas son multifuncionales, poliespecíficas, están altamente reguladas y catalizan diversas reacciones biológicas. Se destaca su rol como mediadores de la muerte celular programada donde ejecutan el proceso apoptótico de la célula y la mayoría de los cambios morfológicos que se desencadenan durante la apoptosis [89]. Hasta el momento se han identificado 14 caspasas en mamíferos y al menos siete participan en el proceso apoptótico. Las caspasas se clasifican en iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y efectoras (caspasas 3, 6 y 7) de la apoptosis. Al igual que la mayoría de las proteasas, las caspasas efectoras se sintetizan como zimógenos inmaduros y se activan cuando son clivadas proteolíticamente en un residuo de aspartato específico. La estructura del zimógeno de caspasa consiste en una subunidad larga (p20), una subunidad corta (p10 o p12) y un prodominio de reclutamiento N-terminal. Las procaspasas 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12 y 13 tienen un dominio largo N-terminal llamado el dominio de reclutamiento de caspasa (CARD, del inglés *capase recruiting domain*), mientras que el de caspasa 8 y 10 se llama dominio efector de la muerte (DED, del inglés *death-effector domain*). Para la activación de las caspasas es necesario que una molécula reguladora se una de forma específica al dominio CARD/DED. El momento crítico en la regulación de la muerte celular mediada por caspasa subyace en la activación de las caspasas iniciadoras, pasando de un estado inactivo como monómero a activo en forma de dímero sin requerir procesamiento proteolítico mediante una señal de muerte celular como es el factor tumoral de necrosis alfa (TNF-alfa). Las caspasas iniciadoras son las responsables de activar las caspasas efectoras, que a diferencia de las iniciadoras, éstas circulan inactivas en forma de dímeros y presentan un corto prodominio N-terminal. Cuando las caspasas efectoras son clivadas se separa la subunidad grande de la pequeña y el pro-dominio es removido. Existen dos vías de activación de la cascada apoptótica: la vía extrínseca en la cual se activa la caspasa-8 vía receptores transmembrana de TNF (del inglés *tumor necrosis factor*) de tipo I, y la vía intrínseca que puede ser desencadenada por daño en el ADN o estrés celular [91]. Esto promueve la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria con la consecuente liberación de la proteína citocromo-c al citosol que conlleva a la formación del apoptosoma mediante la activación de Apaf1 y el reclutamiento de caspasa-9, complejo proteico que finalmente recluta y cliva a la procaspasa-3 generando la caspasa-3 en su forma activa [50].

Todas las caspasas en su forma activa son heterotetrámeros formados por dímeros conteniendo dos subunidades grandes (p17) y dos subunidades pequeñas (p12) (Figura 4a). Presentan dos sitios activos ubicados en la interfaz entre subunidades, los cuales consisten en una díada catalítica de Cys-His y un bolsillo extenso conformado por cuatro *loops* (L1-L4) en donde se

encuentran los aminoácidos pertenecientes a los sitios S1-S4 capaces de acomodar los residuos en posición P1-P4 del sustrato en una posición extendida [90] (Figura 4b). Si bien tradicionalmente los sitios se han tratado como idénticos, en nuestro grupo de investigación hemos encontrado que los mismos tienen un comportamiento diferente cuando están interaccionando con ligandos, tal es así que un mismo ligando que se une en ambos sitios activos altera la posición de los aminoácidos de alrededor y la conformación de los *loops* en donde se encuentran esos residuos de manera distinta [92]. La caspasa-3 presenta un 56% de identidad de secuencia y un 73% de similitud de secuencia con caspasa-7 [64], conservando residuos importantes incluyendo a la díada catalítica y aminoácidos pertenecientes a los sitios S1-S4 [91,93].

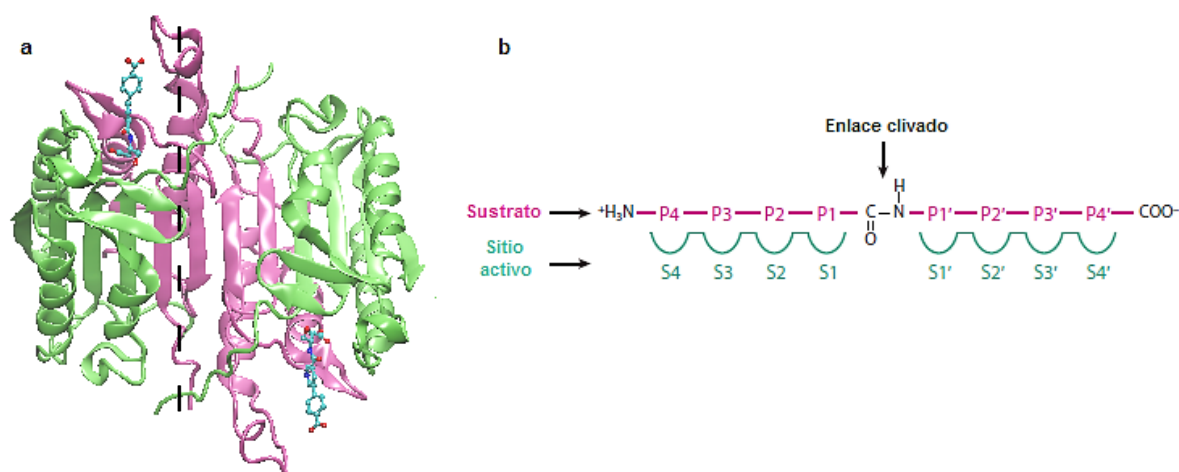


Figura 4. (a) Heterotetrámero de caspasa-3. Las subunidades grandes se muestran en verde y las pequeñas en lila. El inhibidor irreversible derivado del ácido nicotínico unido al sitio activo se muestra en bolas y varillas (código PDB: 1RHM). La interfase del dímero se indica con una línea punteada.

(b) Representación esquemática de la notación utilizada en general para los sitios activos de proteasas. Adaptado de ref. [90]

En caspasa-3 los cuatro *loops* implicados en la catálisis de uno de los heterodímeros están conformados por: L1 (52-66), L2 (163-175), L3 (198-213) y L4 (247-263). L2 y L4 interaccionan con el *loop* L2' (176'-192') del otro heterodímero lo que estabiliza la conformación activa [94,95]. Se ha descrito que los *loops* juegan un rol importante en la activación de las caspasas. En la pro-caspasa L2 y L2' están covalentemente unidos en el mismo heterodímero, en el proceso de maduración se separan los dos *loops* mediante el clivado entre residuos de Asp y Ser. Este proceso separa los *loops* L2-L2' de la pro-enzima, lo que conlleva a un re-arreglo conformacional importante de los cuatro *loops* [96].

La regulación alostérica en proteínas por medio de cambios en la conformación es uno de los principales medios de control en la actividad biológica. Las caspasas presentan un sitio alostérico común que se localiza en la cavidad interna de la interfase del dímero a una distancia de 14 Å del sitio activo, y está conformado por tres residuos de Arg132, Tyr153 y Pro157 (Figura 5) [97]. La función del sitio alostérico está acoplada a la del sitio activo, dado que la unión de inhibidores alostéricos impide la correcta conformación de los *loops* por choques estéricos, resultando en una conformación desordenada de los mismos y consecuentemente impidiendo la unión del sustrato peptídico [98,99]. En caspasa-3 se ha observado que ligandos que desplazan aguas conservadas en el sitio alostérico promueven la conformación inactiva de la enzima [100].

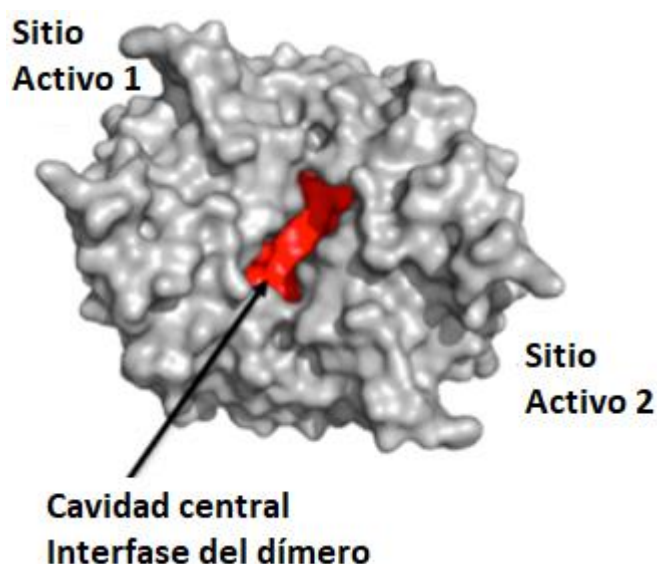


Figura 5. Estructura de caspasa-3 (PDB ID 2J30). En rojo se muestra el bolsillo alostérico en la cavidad central de la interfase del dímero. Adaptado de ref. [99].

Los sitios alostéricos ofrecen alternativas atractivas para el desarrollo de nuevos fármacos debido a que las propiedades químicas para la unión son diferentes de la unión directa de compuestos al sitio activo. Esta característica brinda oportunidades para desarrollar estructuras químicas alternativas y mejorar la selectividad en la unión. Se ha descrito un mecanismo de acción para inhibidores alostéricos que se unen en la interfase del dímero en el sitio alostérico común entre caspasas. Este mecanismo implica la ruptura de interacciones de apilamiento entre Arg132, Tyr153 y Pro157 que contribuyen a mantener la conformación activa del sitio catalítico, lo que conlleva a un estado inactivo de la enzima [98]. Además, enlaces de hidrógeno entre la

Arg132 y residuos de glutamato de la interfase del dímero estabilizan la enzima en su forma activa.

1.2.3. Mecanismo de reconocimiento y unión al sustrato.

Todas las caspasas requieren de forma absoluta un residuo de Asp en posición P1 dado que el sitio 1 es altamente específico. En P1' se ubica un aminoácido pequeño tal como Ala, Gly o Ser [101,102] en ocasiones la Ser se puede encontrar fosforilada [103-106]. La especificidad en posiciones P2 y P3 es variada, en general en P2 se prefieren aminoácidos hidrofóbicos y en P3 aminoácidos hidrofílicos [107]. Las caspasas se dividen en tres grupos dependiendo de su similitud en la secuencia y el aminoácido de preferencia en P4 [108]. Las caspasas -1, -4 y -5 implicadas en el proceso de inflamación prefieren Trp o Leu en la posición P4, las caspasas efectoras -3, -6 y -7 prefieren un residuo polar en dicha posición más específicamente Asp, mientras que las caspasas iniciadoras -8, -9 y -10 prefieren Leu o Val en P4, es decir un residuo con características hidrofóbicas. Los residuos de los sitios mantienen al sustrato peptídico unido por medio de interacciones electrostáticas, puentes salinos, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas de Van der Waals y participan en la regulación de la actividad de la enzima [107].

El reconocimiento molecular del sustrato es diferente entre las distintas caspasas debido a la presencia de un sitio 5 (S5) descrito en caspasas -2, -3 y -7 que confiere a estas enzimas distinta afinidad por un mismo sustrato [107]. Si bien los aminoácidos correspondientes a los sitios S1 y S2 son iguales entre caspasa-3 y caspasa-7, las diferencias existentes a nivel de los sitios S3-S5 pueden ser explotadas en la búsqueda de inhibidores selectivos. El S5 en caspasa-3 es, a diferencia de caspasa-7, hidrofóbico, y por lo tanto residuos hidrofóbicos en esa posición favorecen la catálisis en caspasa-3 y no en caspasa-7. El S5 en caspasa-3 está compuesto por dos residuos aromáticos mientras que en caspasa-7 lo conforman dos residuos polares: Gln y Asp (Figura 6). Esta característica puede resultar de utilidad a la hora de diseñar inhibidores selectivos de caspasa-3 o -7 que se unan en la región del sitio catalítico [107,109,110].

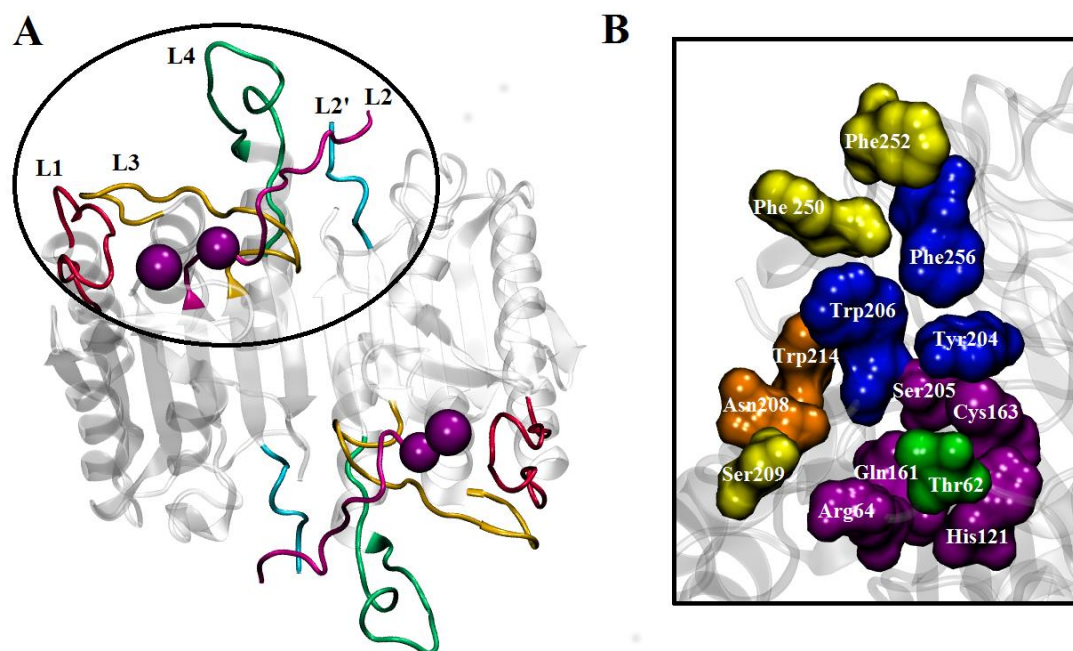


Figura 6. Estructura de la caspasa-3 (PDB ID 1RHM). **(A)** Heterotetrámero de caspasa-3. Se muestra la díada catalítica en bolas (violeta). Los distintos *loops* que conforman el bolsillo de unión al sustrato L1 (rojo), L2 (magenta), L3 (naranja), L4 (verde) y L2' del otro heterodímero (celeste). **(B)** Aminoácidos que pertenecen a los sitios S1-S5 implicados en la catálisis y que forman parte de los distintos *loops* S1 (violeta), S2 (azul), S3 (verde), S4 (naranja), S5 (amarillo). Adaptado de ref. [111].

La secuencia de clivaje de los sustratos de caspasa -3 y -7 es variada, y por tanto se sabe que la estructura primaria no es suficiente para el reconocimiento del sustrato siendo necesario un reconocimiento tridimensional por parte de las caspasas [102]. La mayoría de los cortes proteolíticos se dan en la zona de los *loops* [102,103], lo que sugiere que las caspasas requieren de un re-arreglo en su estructura para poder clivar al sustrato [112,113]. Éstos forman un surco de unión al sustrato de carácter hidrofóbico, el cual es capaz de acomodar una variedad de sustratos mediante un cambio conformacional en la zona del sitio catalítico inducido por el *loop* 4 y estabilizado por enlaces de hidrógeno. Tanto el *loop* 1 como el 4 son flexibles en condiciones fisiológicas y esta flexibilidad contribuye a la unión con el sustrato [95,109,111].

1.2.4. Inhibidores de caspasa-3.

El uso de inhibidores de caspasa ha mostrado ser efectivo en modelos animales para el tratamiento de distintas enfermedades donde el incremento descontrolado en la actividad de una determinada caspasa conduce a condiciones patológicas en enfermedades neurodegenerativas [114,115] y otras patologías [116-121]. Cabe destacar que gran parte de

estos estudios fueron realizados utilizando inhibidores peptídicos irreversibles de caspasas, siendo la mayoría de los inhibidores de caspasa son pseudo-sustratos basados en péptidos, peptidomiméticos, compuestos no peptídicos e inhibidores alostéricos [97,98]. Si bien los inhibidores irreversibles resultan, en general, más potentes que los inhibidores reversibles, los mismos presentan baja selectividad pudiendo en algunos casos inhibir otras proteasas celulares [122]. Debido al rol fundamental que juegan estas proteasas en el desarrollo normal de la célula, el uso de inhibidores no selectivos e irreversibles podría ocasionar distintos efectos adversos *in vivo*. Por otra parte, los inhibidores peptídicos tienen la desventaja de ser inestables en plasma, aunque se han desarrollado distintas estrategias para mejorar este aspecto [123]. Por este motivo, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en el desarrollo de inhibidores no peptídicos y reversibles de distintas caspasas [124], incluyendo caspasa-3 [125-132].

Si bien muchos de estos inhibidores muestran buena actividad *in vitro* frente a caspasa-3, en la mayoría de los casos no existen datos comparativos que den cuenta de su selectividad, o no existe información disponible sobre la citotoxicidad de los compuestos, o su actividad *in vivo* [134-142]. Por otra parte, se desconoce el mecanismo de inhibición de estos compuestos, y los datos estructurales disponibles referentes al modo de unión se basan en estudios de *docking* molecular en caspasa-3 donde no se tiene en cuenta la flexibilidad de la proteína, lo cual ha limitado considerablemente el avance en el diseño racional de nuevas entidades químicas. Todo esto vuelve necesario encontrar inhibidores reversibles, selectivos y capaces de modular la actividad caspasa-3 en las células.

1.3. Nitronas, tiadiazoles y tiazoles como agentes neuroprotectores.

1.3.1. Estructura química, propiedades farmacológicas y aplicaciones en química medicinal de las nitronas.

En los últimos años se ha trabajado intensamente en la búsqueda de moléculas capaces de contrarrestar el daño oxidativo asociado a un amplio espectro de enfermedades, a través de diferentes mecanismos como la captura de radicales libres, el aumento de la expresión y/o la actividad de enzimas antioxidantes de fase II, la supresión de la expresión de iNOS y de transducción de señales o de la inducción génica que conduce a la apoptosis [143-152].

En este contexto se destacan los compuestos que contienen el agrupamiento nitrona, los cuales presentan una gran versatilidad en la síntesis orgánica debido a su fácil obtención, una elevada estabilidad química y son variables en cuanto a su reactividad. Las nitronas son *N*-óxidos de iminas con una fórmula general $R_1R_2C=NR_3^+O^-$. Los compuestos conteniendo el agrupamiento

nitrona son comúnmente utilizados como atrapadores de especies radicalarias en ensayos químicos y biológicos. Los efectos terapéuticos de las nitronas de proteger a los sistemas biológicos y particularmente al cerebro contra el daño oxidativo, se han empleado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y el cáncer [153,154]. Su capacidad antioxidante es debida al doble enlace entre el carbono y el nitrógeno de la nitrona que reacciona muy rápidamente con radicales centrados en el átomo de carbono o en el de nitrógeno, generando así radicales de nitróxido que son más estables y bioquímicamente menos dañinas que el radical original (Figura 7).

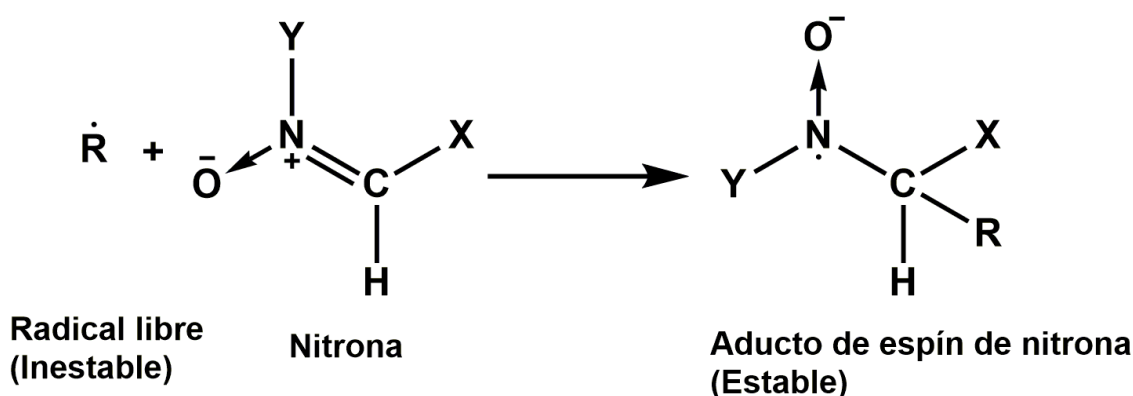


Figura 7. Reacción de generación de especies radicalarias por atrapamiento de radicales de derivados de nitronas.

Las nitronas comerciales más comúnmente utilizadas son el PBN (α -fenil-*N-tert*-butil-nitrona) y DMPO (*N*-óxido de 5,5-dimetil-pirrolina) (Figura 8).

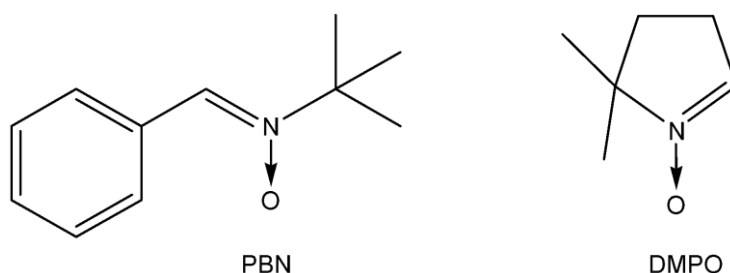
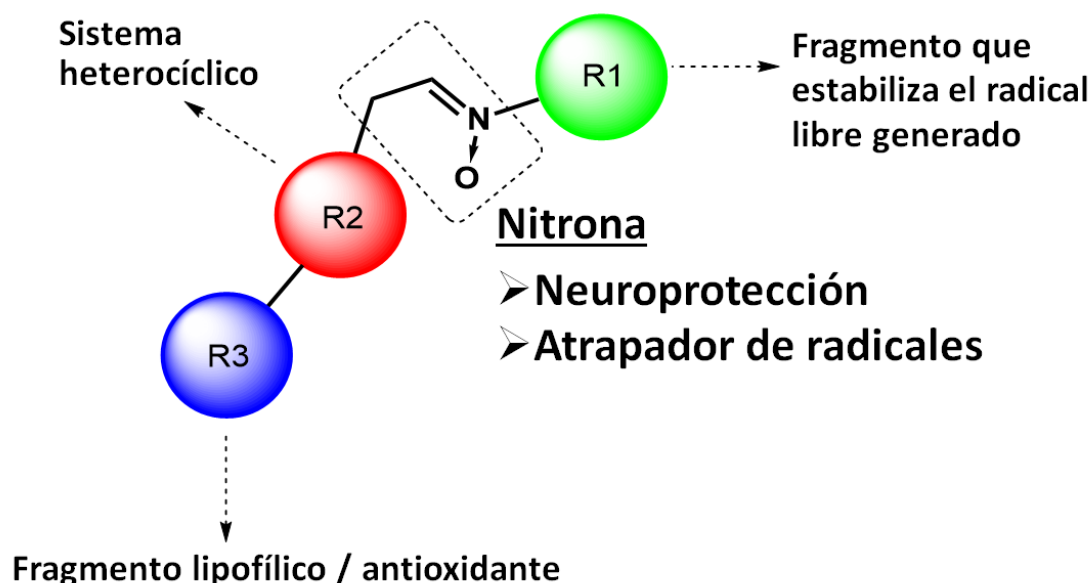


Figura 8. Estructura química de nitronas comerciales. A la izquierda nitrona lineal, α -fenil-*N-tert*-butilnitrona (PBN). A la derecha nitrona cíclica, *N*-óxido de 5,5-dimetil-pirrolina (DMPO).

El PBN y derivados de éste han sido evaluados como potenciales candidatos a convertirse en fármaco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Los estudios *in vitro* evidenciaron que el efecto neuroprotector del PBN, DMPO y otras nitronas, se debe a pesar de su poder antioxidante, a su capacidad de inducir la expresión de enzimas antioxidantes de fase II, de inhibir la cascada apoptótica dependiente de la mitocondria y la actividad caspasa-3 [152]. Además, estudios *in vivo* revelan su capacidad de inhibir la inducción de genes que forman

productos neurotóxicos y de modular las vías de transducción de señales vinculadas a la regulación del ciclo celular [154].

Una serie de α -aril y heteroaril *N*-alquil-*N*-bencil-nitronas con distintos sustituyentes a nivel R1 y R2 (Esquema 1) fueron sintetizadas y evaluadas como agentes antioxidantes [144-146]. Las mismas demostraron poseer una capacidad neuroprotectora mejorada respecto a PBN.



Esquema 1. Estructura común de heteroaril-nitronas. Adaptado de ref. [146].

En estos compuestos el grupo imina *N*-óxido es el que les otorga la capacidad de atrapar radicales libres mientras que el sustituyente en R1 cumple el rol de estabilizar el radical generado. El sistema heterocíclico en R2 (ej: furoxano, benzofuroxano o tiadiazol) está unido al doble enlace de la funcionalidad nitrona. Este sistema confiere ciertas ventajas respecto a las aril-nitronas, ya que presentan mayor eficiencia para atrapar radicales libres y mayor estabilidad en los aductos de espín que se generan. Las moléculas que contienen este tipo de heterociclos presentan gran versatilidad en su actividad biológica, como ser antimicrobiana, antiparasitaria, inmunosupresora, anticancerígena, antiinflamatoria, vasodilatadora y antiagregante plaquetario, entre otras [155,156], lo que les otorga un amplio espectro de posibilidades de aplicación en química medicinal.

La lipofilicidad y solubilidad de las nitronas es modulada por el anillo heterocíclico R2 que puede variar de acuerdo a la naturaleza del sustituyente en R3 adquiriendo así la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) [157].

1.3.2. Propiedades farmacológicas y aplicaciones en química medicinal de derivados de tiadiazoles y tiazoles.

Durante la última década, se han explorado varias aplicaciones terapéuticas relacionadas con el sistema farmacofórico 1,2,4-tiadiazol. Los derivados de tiadiazol han sido descritos como potenciales fármacos para el tratamiento de la EA mediante la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa y de la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β) [156-158] (Figura 9).

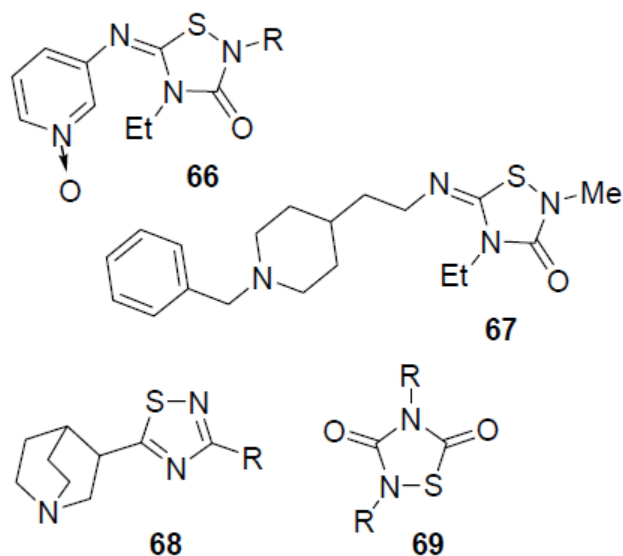


Figura 9. Derivados 1,2,4-tiadiazol con actividad en el sistema nervioso central [156].

Asimismo, el heterociclo tiazol está presente en una variedad de fármacos que se utilizan para el tratamiento de enfermedades neurológicas y en ensayos clínicos. Algunos ejemplos son inhibidores de la acetilcolinesterasa y biomarcadores para la detección de agregados A β en Alzheimer (Figura 10), agonistas de los receptores de dopamina y antagonistas de receptores de adenosina para el tratamiento del Parkinson, inhibidores de la iNOS, ligandos de los receptores de serotonina, ligandos de los receptores de glutamato incluyendo el subtipo AMPA y NMDA, todos estos, blancos moleculares de varias neuropatologías [159].

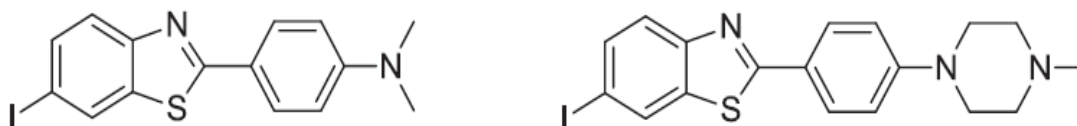


Figura 10. Potenciales fármacos derivados de tiazol para el tratamiento del Alzheimer [159].

1.4. Antecedentes.

Nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la identificación a nivel molecular de los motivos estructurales más relevantes para la inhibición selectiva de caspasa-3, y en el diseño racional de nuevos inhibidores selectivos y reversibles de caspasa-3. Inicialmente estudios de *docking*, dinámica molecular y estudios cuánticos a nivel DFT de inhibidores no covalentes de caspasa-3 y -7 derivados de 2-(1,4-benzodioxan)-1,3-tiazol descritos en la literatura [142], dieron lugar al diseño y síntesis de nuevas moléculas conteniendo el agrupamiento 4-fenil-1,3-tiazol con distintos sustituyentes en posición -4 del fenilo y en posición -2 del anillo tiazólico [92]. Asimismo, logramos obtener a las caspasas -3 y -7 activas recombinantes para evaluar los nuevos derivados sintetizados, donde dos de ellos presentaron un buen perfil inhibitorio y una selectividad parcial por caspasa-3 que se correlaciona con estudios teóricos de estas moléculas y las enzimas estudiadas (Figura 11) [92,160,161].

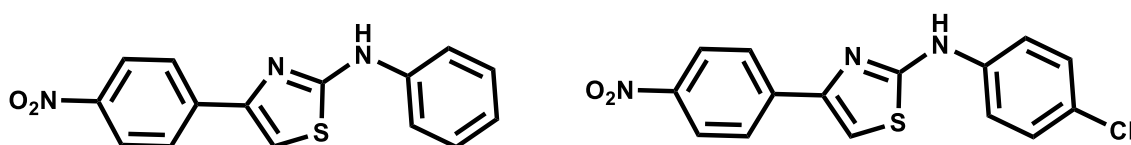
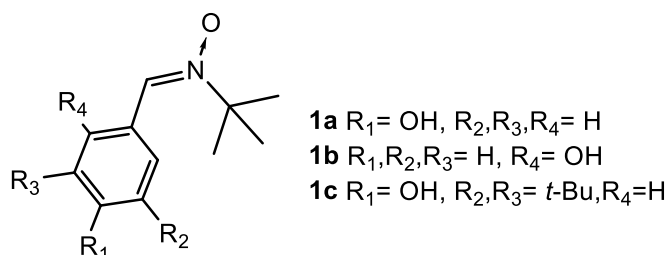


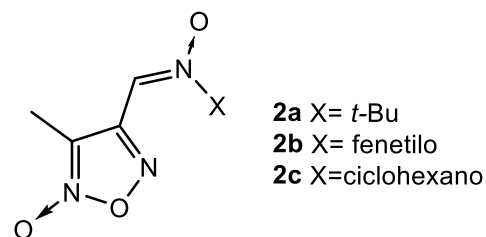
Figura 11. Estructura y valores de IC_{50} frente a caspasa-3 de dos de los derivados más activos sintetizados en nuestro grupo.

Además, en el marco de mi Tesina de Grado [162] y de estudios posteriores realizados por nuestro grupo, evaluamos la citotoxicidad, la capacidad antioxidante, antiapoptótica y de inhibir la actividad caspasa-3 de una serie de α -aril y heteroaril *N*-alquil o *N*-bencil-nitronas mencionadas anteriormente (esquema 2, amablemente cedidas por el Dr. Williams Porcal) en la línea celular neuronal derivada de hipocampo de ratón HT22 [111].

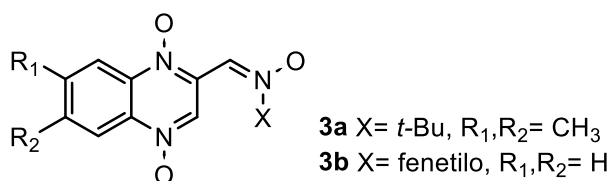
Serie 1: Derivados fenólicos



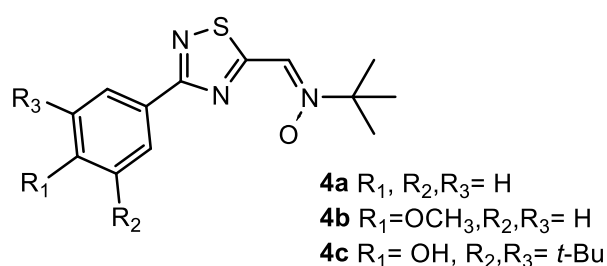
Serie 2: Derivados de furoxano



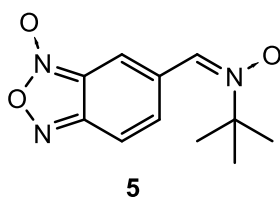
Serie 3: Derivados de quinoxalina



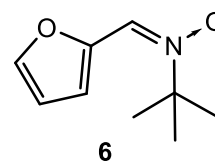
Serie 4: Derivados de tiadiazol



Serie 5: Derivados de benzofuroxano



Serie 6: Derivados de furano



Esquema 2. Estructura química de α -aril y heteroaril *N*-alquil o *N*-bencil-nitronas.

Nuestros estudios indicaron que las nitronas **1a**, **4b**, **4c**, **5** y **6** no presentaron citotoxicidad hasta una concentración 100 μ M y mostraron una gran capacidad antioxidante y antiapoptótica mediante la reducción de los niveles de caspasa-3 activa intracelular (Figura 12) [111,162]. Además, en ensayos de la actividad enzimática de caspasa-3 recombinante las nitronas **4b** y **5** mostraron porcentajes de inhibición de 78 % y 74 %, respectivamente.

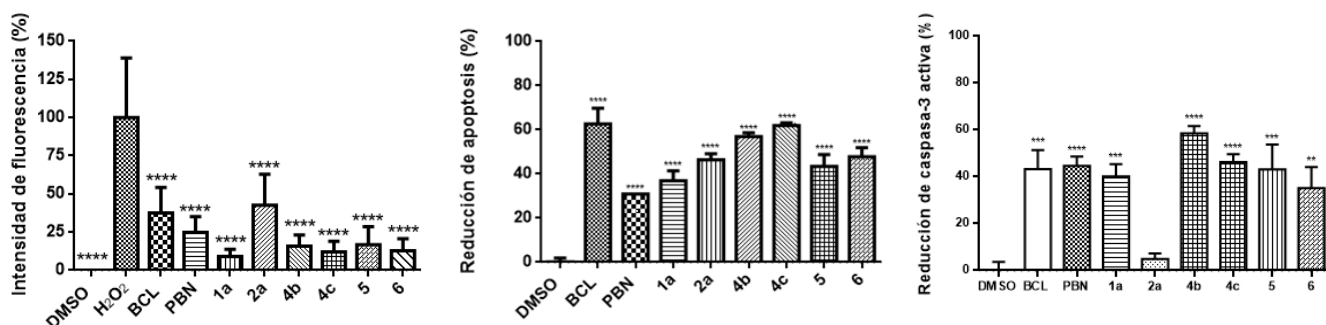


Figura 12. Efecto neuroprotector de nitronas en la línea celular HT22. (A) Actividad antioxidante; (B) Inhibición de la apoptosis (C) Inhibición de caspasa-3 activa. Resultados normalizados contra H₂O₂ y CPT, y expresados como el promedio $\pm$ SD de un ensayo por triplicado, * $p \leq 0.1$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$ one-way Anova, test de multicomparaciones de Dunnet respecto a H₂O₂.

Asimismo, los estudios de *docking* y dinámica molecular de los derivados **4b** y **4c** en caspasa-3 demostraron que la unión de ambos compuestos a la enzima altera de forma dramática tanto la conformación como el potencial electrostático de la macromolécula [111]. Estos resultados teóricos sugieren que la unión reversible de estos compuestos a la enzima podría impedir el reconocimiento molecular y correcto posicionamiento del sustrato en el sitio activo para la catálisis.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de las α -aril y heteroaril *N*-alquil o *N*-bencil nitronas (esquema 2) de inhibir el procesamiento de APP en células de neuroglioma humano H4 en el marco de una pasantía en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Dra. Patricia Burgos, en la Universidad Austral de Chile. Para esto células H4 C99 F/P D/A EGFP o H4 APP D/A F/P EGFP fueron no tratadas o tratadas por 16 hs ya sea con 2 μ M de DAPT (inhibidor específico de γ -secretasa), 100 μ M de las nitronas o en combinación de ambos. Los extractos celulares fueron analizados por inmunoblot con anticuerpos anti-GFP y revelados con el sustrato quimioluminiscente West Pico. Las posiciones de los marcadores de peso molecular están indicados a la izquierda en KDa. En la figura 13.A se aprecia como el DAPT utilizado como control positivo, concentra la muestra de C99 y hace desaparecer el fragmento AICD. Las figuras 13.B y 13.C muestran que la nitrona **1b** disminuye considerablemente el fragmento AICD mientras que las nitronas **4b** y **4c** concentran el APP y disminuyen el C99 y el AICD notoriamente. Estos resultados sugieren que estas nitronas podrían estar actuando como inhibidores parciales de la γ -secretasa implicada en el clivaje proteolítico del APP.

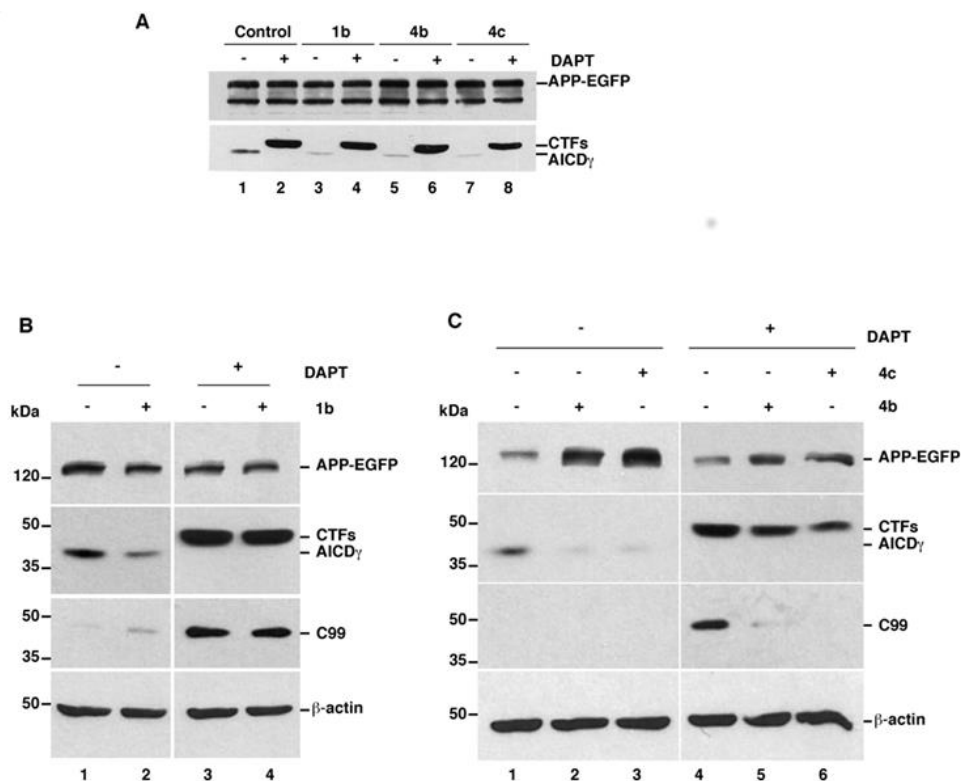


Figura 13. Western Blot para la identificación de la proteína APP y los fragmentos C99 y AICD que resultan de su clivaje proteolítico por β y γ -secretasas en células (A) H4 APP D/A F/P EGFP o (B, C) H4 C99 F/P D/A EGFP. Células control no tratadas o tratadas con 2 μ M de DAPT, 100 μ M de las nitronas **1b**, **4b** y **4c** o en combinación de ambos. (A) Carril 1 control s/DAPT, carril 2 control c/DAPT, carril 3 nitrona 1b, carril 4 nitrona 1b+DAPT, carril 5 nitrona 4b, carril 6 nitrona 4b+DAPT, carril 7 nitrona 4c, carril 8 nitrona 4c+DAPT. (B) Carril 1 control s/DAPT, carril 2 nitrona 1b, carril 3 DAPT, carril 4 nitrona 1b+DAPT. (C) Carril 1 control s/DAPT, carril 2 nitrona 4b, carril 3 nitrona 4c, carril 4 DAPT, carril 5 nitrona 4b+DAPT, carril 6 nitrona 4c+DAPT.

Cabe destacar que, si bien los compuestos híbridos derivados de tiadiazol conteniendo la funcionalidad nitrona resultaron moléculas ampliamente prometedoras desde el punto de vista farmacológico, y en el plan de tesis original se propuso profundizar en su mecanismo de acción, la síntesis del sistema 1,2,4-tiadiazol es compleja y requiere reactivos que no son enviados a nuestro país [146]. Por lo tanto, fue necesario reformular la propuesta inicial del plan de tesis original y proponer nuevos compuestos híbridos que fuesen factibles de sintetizar.

En la actualidad los enfoques terapéuticos sugieren que los fármacos que actúan sobre un único mecanismo molecular pueden no ser suficientes para el tratamiento o prevención de enfermedades multifactoriales caracterizadas por la suma de múltiples etiopatologías. Esto

hace poco probable que una única acción farmacológica brinde una solución efectiva y completa a pacientes con enfermedades neurodegenerativas, lo que vuelve necesario el desarrollo de compuestos híbridos conteniendo al menos dos farmacóforos combinados en una misma molécula, confiriéndoles la capacidad de actuar sobre diferentes blancos moleculares y obtener así una actividad farmacológica sinérgica.

En base a los antecedentes planteados y la necesidad de continuar la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos para la EA, los derivados híbridos de nitrona y tiazol emergen como nuevos hits moleculares por contener farmacóforos con capacidad antioxidante, antiapoptótica e inhibitoria de caspasa-3-activa.

Teniendo en cuenta lo anterior, y en base a la experiencia del grupo en la síntesis de compuestos tiazólicos y su fácil obtención con buenos rendimientos, así como nuestra experiencia en la síntesis de nitronas, se decidió desarrollar nitronas derivadas del heterociclo 1,3-tiazol, a fin de generar moléculas híbridas con una actividad farmacológica potenciada.

1.5. Hipótesis.

Nuestra hipótesis de trabajo establece que la generación de una nueva familia de moléculas híbridas que combine la funcionalidad nitrona y el heterociclo 1,3-tiazol, contará con una actividad neuroprotectora mejorada mediante la capacidad de inhibir de manera reversible y selectiva la sobreactivación de caspasa-3, para su uso como potenciales fármacos para el tratamiento de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas.

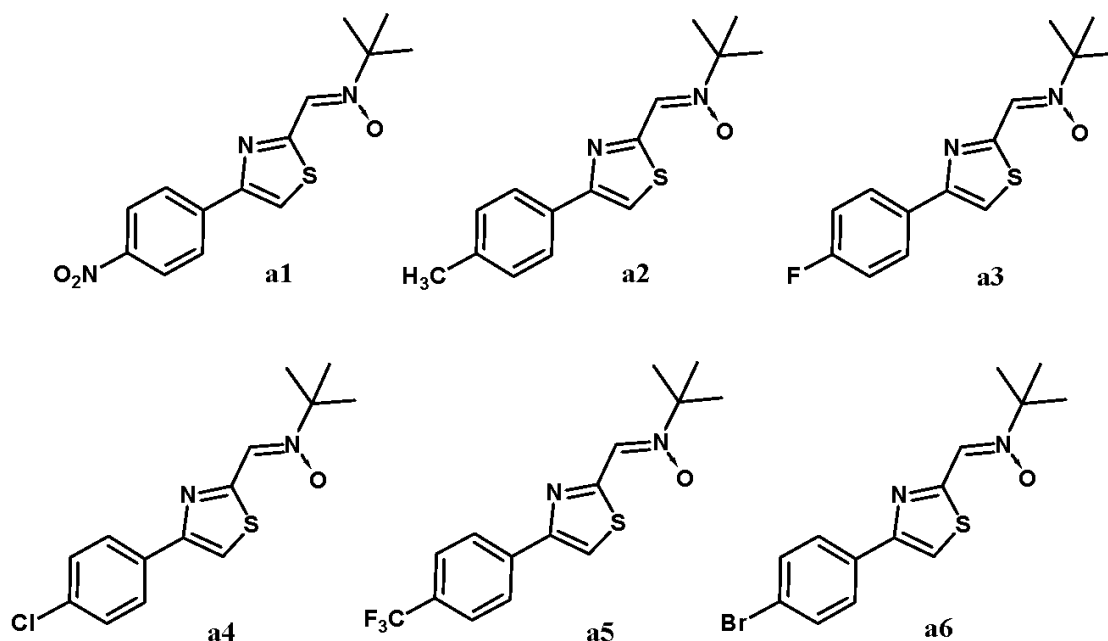
2. Objetivos

2.1. Objetivo general.

El objetivo general de esta tesis es la síntesis química de moléculas híbridas que combinan la función nitrona y el sistema heterocíclico 1,3-tiazol, y su evaluación *in vitro* e *in silico* del efecto neuroprotector e inhibidor de caspasa-3 y caspasa-7, como potenciales fármacos para el tratamiento de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas.

2.2. Objetivos específicos.

1) Sintetizar compuestos híbridos combinando la funcionalidad nitrona y 1,3-tiazol (Esquema 3).



Esquema 3. Estructura química de compuestos híbridos combinando agrupamientos nitrona y 1,3- tiazol propuestos para ser sintetizados.

- 2) Estudiar la citotoxicidad de los compuestos sintetizados.
- 3) Determinar la actividad antioxidante de los compuestos sintetizados en cultivos de células HT22.
- 4) Evaluar el efecto antiapoptótico de los compuestos sintetizados.
- 5) Estudiar la inhibición de la actividad enzimática de los compuestos sintetizados en caspasa-3 y caspasa-7.
- 6) Determinar la capacidad de traspasar la barrera hematoencefálica a partir del ensayo *in vitro* PAMPA.
- 7) Realizar estudios de modelado molecular del modo de unión de la familia de compuestos híbridos frente a caspasa-3 y caspasa- 7.

3. Materiales y Métodos

3.1. QUÍMICA

3.1.1. Consideraciones generales.

Se utilizaron reactivos comerciales de Aldrich, Merk y Fluka sin purificación adicional. Los disolventes se destilaron previo a su uso. El monitoreo del avance de las reacciones y la pureza de los productos obtenidos se examinó por cromatografía en capa fina (CCF) con placas de sílicagel con indicador fluorescente en placas de poliéster o de aluminio disponibles en el mercado. Los cromatogramas se revelaron por alguno de los siguientes métodos: exposición a la luz ultravioleta (254 nm), vapores de yodo, por asperjado con reactivo de Brady (1g 2,4-dinitrofenilhidrazina, 5.0 mL H₂SO₄ conc., 6.5 mL H₂O dest., 23.0 mL EtOH 95%) o con solución de anisaldehído (95 mL EtOH 95%, 4.0 mL H₂SO₄, 1 mL 4-metoxibenzaldehído) y posterior quemado. Para las cromatografías en columna (CC) se utilizó sílicagel (SiO₂, 35-70 µm, Merk).

Los derivados obtenidos en cada paso de la ruta sintética fueron purificados por extracción líquido-líquido, filtración en sílica en embudo con fritas y/o columna cromatográfica cuando correspondió y fueron caracterizados espectroscópicamente por RMN de ¹H y ¹³C, mediante HSQC y HMBC y espectroscopia de masa.

Los espectros ¹H RMN, ¹³C RMN, HSQC y HMBC se registraron en equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz) utilizando disolventes deuterados como acetona, metanol o dimetilsulfóxido. Los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm) usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y las constantes de acoplamiento se expresaron en Hz. Las multiplicidades de las señales se indicaron como s (singulete), d (doblete), t (triplete), y m (multiplete). Los espectros de masa (EM) fueron registrados en un espectrómetro de masas SHIMADZU GC-MS QP2010 SE. Se realizaron ionizaciones de la muestra por impacto electrónico a 20 y 70 eV. Los puntos de fusión se realizaron con un equipo Electrothermal 9100 y no se corrigieron.

3.1.2. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol.

Se disolvió el derivado de 2-bromoacetofenona correspondiente (1.2 mmol, 1 equiv) y etiltioxamato (1.4 mmol, 1,2 equiv) en EtOH absoluto (15 mL) y se calentó a reflujo con agitación constante durante 6 horas. Una vez consumidos los reactivos se agregó agua y se realizó una extracción con AcOEt (3 x 5 mL), se lavó con NaHCO₃ 1N (3 x 5 mL) y brine (2 x 5 mL). La capa orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida. Los productos deseados se obtienen como un sólido (**I.1 – I.6**) [163].

3.1.3. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol.

Al derivado de 4-Aril-2-etoxycarbonil-1,3-tiazol (**I.1 -I.6**) correspondiente obtenido como sólido (0.6 mmol, 1 equiv) se le agregó NaBH₄ (1.8 mmol 3 equiv) en THF/MeOH 20:1 (9.5 mL/0.5 mL) y se calentó a reflujo con agitación durante 1 hora. Completada la reacción se agregó agua y se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL), se combinaron las fracciones orgánicas y se lavó con brine (2 x 5 mL) antes de secar con MgSO₄ anhidro. Luego se filtró y se destiló el disolvente a presión reducida. El cristal obtenido (**II.1 – II.6**) fue utilizado en el siguiente paso sin ningún otro paso de purificación [163].

3.1.4. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-formil-1,3-tiazol.

Al derivado de 4-Aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol (**II.1 – II.6**) (0.5 mmol, 1 equiv) correspondiente se le agregó [Cu(MeCN)₄](OTf) 1:20 (0.025 mmol, 0.05 equiv) y MeCN (5 mL) y se adicionó la solución catalítica [2,2'-bipiridina (0.5 mmol/0.05 equiv) /TEMPO (0.5 mmol/0.05 equiv) /N-metilimidazol (1.0 mmol/0.1 equiv) 1:2:2] resultando en una solución de color marrón rojizo. La reacción se agitó a temperatura ambiente en atmósfera abierta durante 2-24 hs. La reacción se controló por TLC hasta observarse ausencia del reactivo de partida. El producto obtenido (**III.1 – III.6**) se aisló por filtración a vacío utilizando un embudo con un centímetro y medio de sílicagel, se lavó con AcOEt (30 mL) y se destiló el disolvente a presión reducida [164]. El cristal obtenido fue utilizado en el último paso de la ruta sin ningún otro paso de purificación [165].

3.1.5. Síntesis de derivados de α -(4-aril-1,3-tiazol-2-il)-N-tert-butilnitrona.

Previo a comenzar la reacción se activó la *tert*-butil-hidroxilamina (0.52 mmol, 1.3 equiv.) con dos veces y media el equivalente de Et₃N (1.3 mmol, 181 μ L). Se agregaron 5 mL de agua y se realizaron extracciones con CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). Se destiló el disolvente a presión reducida, la *tert*-butil-hidroxilamina desprotonada se disolvió en 5 mL de CH₂Cl₂ y se pasó al balón conteniendo el derivado de 4-Aril-2-formil-1,3-tiazol (**III.1 – III.6**) (0.4 mmol, 1 equiv.). Se agregó MgSO₄ (1.2 mmol, 3 equiv.) y se colocó a reaccionar con agitación a temperatura ambiente durante 6-7 hs. La reacción se siguió por TLC y posteriormente, se filtró y destiló a vacío el disolvente. El derivado de α -(4-aril-1,3-tiazol-2-il)-N-*tert*-butilnitrona (**a1-a6**) se purificó mediante cromatografía en columna utilizando sílicagel como fase estacionaria y Hexano:AcOEt 80:20 como fase móvil [166].

3.2. BIOLOGÍA

3.2.1. Aspectos generales.

Los ensayos biológicos se llevaron a cabo en cabinas de bioseguridad de clase II. Previo al uso del material este fue esterilizado durante 20 min en autoclave a 121 °C o se utilizó esterilizado por el fabricante. Para el recuento de células se utilizó cámara de Neubauer en microscopio óptico. Se realizó el conteo de células a través de tinción con Azul de Trypan (0.5%).

3.2.2. Cultivo celular.

La línea celular HT22 es una sub-línea derivada de células HT4 que fueron originalmente inmortalizadas de un cultivo primario de neuronas derivadas de hipocampo de ratón (Figura 14) [167]. Estas células son un modelo *in vitro* para estudiar condiciones que conllevan a la producción endógena de ROS como ser citotoxicidad a niveles elevados de glutamato en enfermedades neurodegenerativas [168].

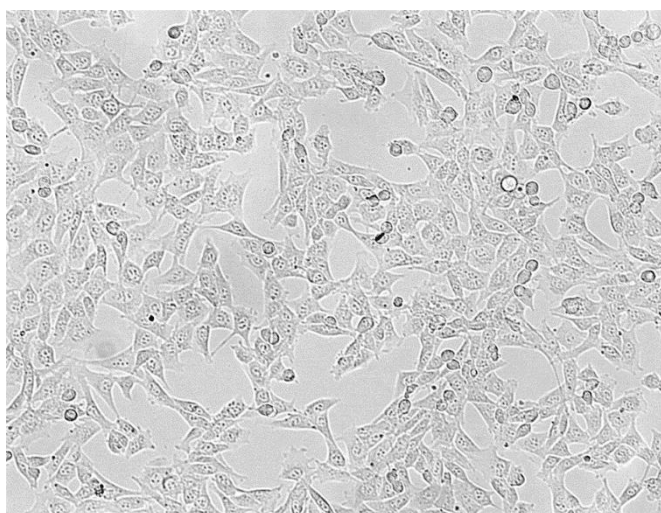


Figura 14. Cultivo de la línea celular HT22

Las células HT22 fueron crecidas en medio de cultivo DMEM high glucose (Gibco), suplementado con 10% SFB (PAA) y mantenidas en incubadora a 37 °C y 5% CO₂ en botellas de cultivo celular de 25 cm². Para los ensayos biológicos, se partió de un cultivo de células HT22 en fase exponencial. Las células fueron resuspendidas empleando tripsina-EDTA 0.05% y se realizó el recuento celular para sembrar la cantidad necesaria por pocillo según el ensayo biológico.

3.2.3. Estudio de la viabilidad celular.

Se determinó la citotoxicidad de los derivados de nitrona y 1,3 tiazol utilizando el ensayo colorimétrico de MTT [169] en células HT22. Este ensayo permite cuantificar espectrofotométricamente las células viables metabólicamente activas que sean capaces de reducir por la acción enzimática de reductasas celulares el bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo en formazán de color violeta.

Para esto, se realizó el sembrando de 100 µL de una suspensión celular (5×10^4 células/mL) en una placa de 96 pocillos y se incubó durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Se adicionaron los compuestos disueltos en DMSO (<1%) a distintas concentraciones (0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 µM) por triplicado. Como controles se incluyeron células con medio de cultivo completo y medio de cultivo completo con 1% de DMSO. A continuación, la placa se incubó durante 20hs a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente se agregó 10 µL de una solución de MTT (5 mg/mL) (Cat. No: M2128, Sigma Aldrich) en PBS estéril y se incubó durante 4 h a 37 °C y 5% de CO₂. La solución se removió y los cristales de formazán se disolvieron con una mezcla DMSO:isopropanol 1:1. Por último, se analizó el porcentaje de viabilidad mediante la medida de la absorbancia a 570 nm utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = (\text{absorbancia muestra} / \text{absorbancia control}) \times 100$$

A partir del estudio de la viabilidad celular, se determinó la máxima concentración no citotóxica de los compuestos sintetizados para los ensayos biológicos posteriores.

3.2.4. Determinación de la actividad antioxidante.

3.2.4.1. Determinación de la viabilidad celular en presencia de H₂O₂.

Previo a ensayar la capacidad antioxidante de los nuevos derivados de nitrona se determinó la citotoxicidad del H₂O₂ mediante MTT según se describió anteriormente. Para esto, se realizó el sembrando de 100 µL de una suspensión celular (5×10^4 células/mL) en una placa de 96 pocillos y se incubó durante 24 h a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, el medio de cultivo fue removido, se adicionó medio de cultivo sin SFB y las células fueron incubadas por 2 hs previo al tratamiento con H₂O₂. A continuación se adicionó el H₂O₂ a distintas concentraciones (100, 250, 500 y 1000 µM) en medio de cultivo sin SFB y se incubó durante 1 hora.

3.2.4.2. Determinación del efecto antioxidante.

Previo a evaluar el efecto neuroprotector de las moléculas sintetizadas se ensayaron distintas concentraciones de H_2O_2 para inducir la generación de ROS intracelular. A partir de este ensayo, se determinó la concentración de H_2O_2 óptima para realizar los ensayos de neuroprotección frente al ROS, mediante un balance entre su efecto en la viabilidad celular y la generación de ROS intracelular.

Este ensayo consiste en utilizar el compuesto hidrofóbico no fluorescente 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) [170] capaz de atravesar la membrana celular, llegando al interior de la célula donde es enzimáticamente hidrolizado por esterasas a 2,7-diclorofluoresceína (DCFH) no fluorescente, el cual es retenido dentro de las células. En presencia de ROS el DCFH es oxidado rápidamente formando el compuesto altamente fluorescente diclorodihidrofluoresceína (DCF). La producción de DCF se puede cuantificar por fluorescencia a $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$. La fluorescencia emitida es directamente proporcional a la concentración de ROS dentro de la célula.

Como control positivo se utilizó la Baicaleína (BCL) un flavonoide citoprotector, antiinflamatorio, atrapador de radicales y antioxidante [171] y como control negativo medio de cultivo con DMSO 0.5%

Se sembraron 300.000 células en placas de 35 mm en 2 mL de medio de cultivo completo y se incubaron 24 hs en estufa a 37°C , 5% CO_2 . Luego, las células se lavaron con PBS y fueron pre-tratadas con DMSO, BCL 50 μM (Cat. No: 465119, Sigma-Aldrich) o el derivado de nitrona 25 μM (concentración no tóxica determinada previamente) en 2 mL de medio de cultivo solo. Luego de 2hs, las células se trataron con 250 μM de H_2O_2 durante 1 hora. A continuación, se lavó con PBS, se adicionó 10 μM de la sonda DCFH-DA (Cat. No: D6883, Sigma) en medio de cultivo y se incubó durante 10 minutos a 37°C . Pasado este tiempo se lavó con PBS y se agregó PBS para la visualización en microscopio confocal Zeiss LSM800 con el objetivo 20X Plan Apo NA 0.5. Se cuantificó la fluorescencia de 250 células por condición usando el programa ImageJ (<https://imagej.net/ImageJ>). El análisis estadístico se realizó mediante el test one-way Anova, seguido del test de multicomparaciones de Dunnet utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00.

3.2.5. Inhibición de la apoptosis.

Una característica importante de la apoptosis, es la exposición de fosfolípidos fosfatidilserina (PS) en la membrana celular dependiente de caspasa en respuesta a estímulos proapoptóticos en células sanas. Por lo tanto, una proteína de unión a PS es útil experimentalmente para detectar su exposición. La Anexina V (AV) es una proteína que se une a fosfolípidos en presencia del ion Ca^{2+} presentando una elevada afinidad por la PS [172]. Al usarse habitualmente acoplada a FITC, sirve como marcador para el análisis de aquellas poblaciones celulares que han iniciado el proceso de apoptosis. Además, en combinación con colorantes impermeables a las células, como ser el ioduro de propidio (IP), se pueden diferenciar células que se encuentran en apoptosis temprana de aquellas que ya están en apoptosis tardía o necrosis.

Como inductor de apoptosis se utilizó la Camptotecina (CPT), inductor de caspasa-3 e inhibidor de Topoisomerasa I que induce daño en el ADN y apoptosis via p53 y ciclinas dependientes de quinasas, ampliamente descrito en la literatura y comúnmente utilizado [173].

Se sembraron las células HT22 (1.2×10^5 células/mL) en una placa de 12 pocillos en medio de cultivo DMEM, 10% SFB, y se incubó durante 24 horas 37°C , 5% de CO_2 . Las células fueron pre-incubadas durante 2 horas con las nitronas disueltos en DMSO a una concentración $25 \mu\text{M}$ determinada a través del estudio de citotoxicidad. La concentración final de DMSO en las células fue 0.5%. Como control positivo se utilizó BCL $50 \mu\text{M}$ y como control negativo medio de cultivo con DMSO 0.5%. Posteriormente se realizó la inducción pro-apoptótica con CPT $5 \mu\text{M}$ (Cat. No: C9911, Sigma) y se incubó durante 15 horas a 37°C , 5% de CO_2 . Las células se levantaron de la placa con una solución de Tripsina-EDTA, se lavaron con PBS y se resuspendieron en buffer anexina (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl_2 2.5 mM, pH 7.4). Luego se adicionó $2 \mu\text{L}$ de AV-FITC (Cat. No: 556419, BD Pharmingen) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Las células se lavaron y resuspendieron con buffer anexina. Previo a realizar la adquisición y el análisis se les agregó $2 \mu\text{L}$ de IP a cada una de las muestras. La adquisición y el análisis se realizó en citómetro de flujo FACS Calibur con un láser de excitación de 488 nm colectando 10.000 eventos por muestra. Los parámetros de tamaño y granularidad celular se detectan mediante el Forward Scatter y el Side Scatter (FS vs SS). Se analizaron los porcentajes de células apoptóticas. Para la comparación de los resultados, el porcentaje de células apoptóticas que se corresponde con la población de células AV positivas fue normalizado contra el porcentaje de células AV positivas obtenidas con el control CPT. El porcentaje de reducción apoptótica de las muestras en comparación con CPT se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ reducción apoptosis} = [(\text{PROMEDIO CPT- MUESTRA}) / (\text{PROMEDIO CPT} - \text{PROMEDIO DMSO})] * 100$$

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el test one-way Anova, seguido del test de multicomparaciones de Dunnet utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00.

3.3. Producción y caracterización de caspasa-3 y caspasa-7 recombinantes.

3.3.1. Consideraciones generales.

Con el fin de determinar si la disminución de la apoptosis en la línea celular HT22 está vinculada a un mecanismo de acción de los compuestos nitrona derivados de 1,3-tiazol que implique la inhibición de la caspasa-3 por medio de la interacción directa con esta enzima, se determinó la inhibición de la actividad enzimática *in vitro* de caspasa-3.

Debido a la gran homología que presenta caspasa-3 con caspasa-7, y que ambas enzimas participan como ejecutoras de la apoptosis, este ensayo fue realizado en las mismas condiciones frente a caspasa-7, con el objetivo de evaluar la selectividad de los compuestos.

Las enzimas humanas recombinantes caspasa-3 y caspasa-7 fueron producidas por el grupo de la Dra. Ileana Corbo del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Moléculas Bioactivas del Polo de Desarrollo Universitario de Paysandú, en el marco de dos proyectos CSIC I+D donde la Dra. Alicia Merlino fue la responsable.

Previo a la realización de los ensayos de actividad enzimática se estimó la concentración de los stocks de caspasas y se determinaron los parámetros cinéticos (K_{cat} , K_m y V_{max}). Posteriormente se llevaron a cabo estudios de actividad caspasa para completar su caracterización y se realizaron ensayos de interferencia de la fluorescencia por parte de los nuevos derivados de nitrona. Finalmente se ensayó la actividad enzimática co-incubando la caspasa-3 y caspasa-7 con los compuestos en estudio con el objetivo de determinar su capacidad inhibitoria y su selectividad.

3.3.2. Obtención de enzimas recombinantes.

La puesta a punto de la producción de caspasas -3 y -7 humanas recombinantes activas fue realizada siguiendo el protocolo descrito por Denault & Salvesen, 2002 [174]. Para esto utilizaron los plásmidos pET23b-casp3-His y pET23b-casp7-His, respectivamente, que fueron adquiridos comercialmente del repositorio Addgene (www.addgene.org). Para su expresión, transformaron la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLys mediante el método de shock térmico. Utilizaron esta cepa debido a que tiene mínima expresión basal, dado que las caspasas son tóxicas para *E. coli*. Posteriormente seleccionó una colonia para la expresión de cada una de las enzimas recombinantes mediante la inducción con IPTG. La fracción soluble conteniendo 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 caspasas-3 y -7 recombinantes realizaron un gradiente de imidazol de 0 a 250 mM. Las fracciones de la purificación fueron analizadas midiendo absorbancia a 280 nm y mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE y Western Blot con anticuerpo Anti-Histag. Estas enzimas se expresan inicialmente como zimógenos y son tetrameros formados por 2 subunidades mayores de 17 kDa y 2 menores de 13 kDa, codificadas ambas por un mismo gen. La inducción con IPTG durante media hora permite obtener el zimógeno, mientras que a las 4 horas se obtiene la enzima activa, ya que las subunidades se autoprocenan y se ensamblan espontáneamente. Para confirmarlo realizaron mediciones de la actividad enzimática mediante fluorimetría utilizando como sustrato el péptido sintético Asp-Glu-Val-Asp-AMC. Las enzimas recombinantes fueron alicuotadas en el amortiguador de elución de la cromatografía y almacenadas en freezer a -80 °C en presencia de imidazol.

3.3.3. Estimación de la concentración enzimática.

Con el propósito de estimar la concentración en los stocks de enzima caspasa-3 y caspasa-7 adquiridos a partir de la producción recombinante, se llevó a cabo un espectro de absorbancia a 280 nm en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, imidazol 200 mM. Empleando la Ley de Lambert-Beer y el valor del coeficiente de extinción molar de cada enzima (obtenido a partir de la secuencia primaria con el programa Expasy)[175] se determinó un valor de concentración aplicando la siguiente ecuación:

$$A = C b \epsilon_{280} \quad Ec. 1$$

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

de la enzima.

Es relevante mencionar que la cola de histidina no fue tomada en cuenta para el cálculo de ϵ_{280} debido a que su contribución a la absorbancia es considerada despreciable.

3.3.4. Actividad enzimática.

La actividad catalítica de una enzima se determinó midiendo la velocidad inicial de reacción, que es la pendiente de la curva de producto formado en el tiempo cero. La teoría de Michaelis-Menden [176] postula que bajo las condiciones de estado estacionario (la cantidad de complejo enzima-sustrato se mantiene constante) la velocidad del proceso se mantiene constante en los primeros estadios de la reacción y coincide con la velocidad inicial (V_0). Así inicialmente, las reacciones transcurren linealmente, pudiéndose tomar la pendiente de esta recta como velocidad inicial.

El ensayo de actividad enzimática se realizó utilizando el sustrato artificial fluorogénico de caspasa-3 y caspasa-7, N-acetil-L- α -aspartil-L- α -glutamil-L- α -valil-L- α -aspartil-7-amino-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) [174], el cual al ser clivado por caspasa libera el fluoróforo AMC y por lo tanto el aumento en la fluorescencia en función del tiempo es proporcional a la actividad caspasa.

Para determinar V_0 se incubó la enzima por 15 minutos a 37 °C en un buffer de actividad compuesto por pipes 20 mM, pH 7.2, chaps 0.1 %, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 10 % y DTT 10 mM [174], que promueve la reducción de residuos de Cys esenciales para la actividad catalítica. Seguido de una hora adicional de incubación con el fin de igualar las condiciones del ensayo en presencia de inhibidores.

Posteriormente, se agregó el sustrato de caspasa Ac-DEVD-AMC a una concentración final de 6.6 μ M, a partir de una dilución 3 mM en DMSO del stock, en un volumen final de 200 μ L. A continuación, se siguió el progreso en la formación del producto de hidrólisis 7-amino-4-metilcumarina (AMC) fluorescente de la reacción mediante la medida de fluorescencia en función del tiempo, con un $\lambda_{excitación}$ = 380 nm y $\lambda_{emisión}$ = 440 nm, a 37 °C. La V_0 se obtuvo calculando la pendiente de la parte lineal del gráfico de la concentración de producto formado en función del tiempo. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos negras para medir fluorescencia. Los valores de fluorescencia fueron registrados en lector de placas Thermo Varioskan Flash.

3.3.5. Puesta a punto de la concentración de enzima.

Con el objetivo de determinar la concentración de enzima óptima para el ensayo, se evaluó la actividad caspasa en un rango de concentraciones de enzima (11, 21, 28, 32, 42 y 53 nM) manteniendo la concentración de sustrato Ac-DEVD-AMC fija (6.6 μ M). El experimento se realizó por triplicado para cada concentración de enzima.

3.3.6. Determinación de parámetros cinéticos: K_M y V_{max} .

A medida que la concentración inicial de sustrato aumenta desplazando el equilibrio hacia la formación de complejo enzima-sustrato, V_o también lo hace hasta alcanzar un valor constante. Este valor final se denomina velocidad máxima (V_{max}). En condiciones de saturación de la enzima por el sustrato la concentración del complejo enzima-sustrato es igual a la concentración de enzima total $[E_t]$. De esta manera, se puede definir que $V_{max} = k_{cat} \cdot [E_t]$, donde k_{cat} se define como una constante de velocidad de primer orden denominada número de recambio [176].

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 μ M). El ensayo de actividad se realizó de la misma forma que fue descrito anteriormente. En paralelo se realizó una curva de calibración con el producto de la reacción enzimática catalizada por caspasa-3 y -7, en un rango de concentraciones crecientes de AMC (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 6.0 μ M) por duplicado, 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).

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad Ec. 2$$

Donde K_m es la constante de Michaelis-Menten, V_{max} la velocidad máxima de la enzima y $[S]$ la concentración del sustrato.

3.4. Ensayos de interferencia de los compuestos e inhibición de la actividad enzimática.

3.4.1. Efecto de apagamiento de la fluorescencia.

Previo a la evaluación de la inhibición enzimática de los compuestos se evaluó su capacidad de interferir en la emisión de la fluorescencia del AMC mediante la determinación de su efecto de apagamiento (*quenching*). Para esto se llevó a cabo una curva de AMC con cinco concentraciones

(0, 0.5, 1, 2 y 4 μM) por duplicado, y se les agregó cada uno de los compuestos a la concentración que posteriormente se ensayaron en caspasa-3 y caspasa-7 (100 μM). Se realizó una curva de AMC por compuesto. La relación entre la pendiente del ensayo de actividad enzimática ($\text{RFU}/\Delta t$) y la pendiente de la curva de AMC ($\text{RFU}/[\text{AMC}] \mu\text{M}$) corresponde a la velocidad de formación de producto (AMC) en $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$. El valor de *quenching* del compuesto al AMC se obtiene realizando una regla de tres en donde la velocidad de formación de producto en los ensayos sin compuesto equivale al 100% y la velocidad de formación de producto en los ensayos con compuesto equivale a X, siendo X el porcentaje de *quenching* del compuesto. Si la velocidad de formación del AMC es igual con y sin compuesto entonces, el compuesto no afecta la fluorescencia del AMC. A los ensayos de inhibición de actividad caspasa se les debe restar el valor de *quenching* de cada uno de los compuestos para así tener el porcentaje de inhibición real.

Además, se realizó un espectro de fluorescencia de cada uno de los compuestos para determinar si estos presentan fluorescencia intrínseca a las longitudes de onda medidas, y por ende podrían tener un efecto de interferencia en el ensayo enzimático.

3.4.2. Inhibición de la actividad enzimática.

Con el fin de determinar el potencial inhibitorio de los compuestos híbridos sintetizados se procedió a realizar el ensayo fluorogénico de detección de la actividad enzimática previamente descrito. Para esto se utilizó una concentración 28 nM de enzima y 100 μM de compuesto en un volumen final de 200 μL en microplacas de 96 pocillos negras para medir fluorescencia. Inicialmente se procedió a activar la enzima incubándola 15 minutos a 37 °C en el buffer de actividad conteniendo pipes 20 mM (pH 7.2), chaps 0.1%, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, sacarosa 10%, DTT 10 Mm, seguido del agregado de los derivados a ensayar disueltos en DMSO, y posterior incubación de 1 hora a 37 °C previo al agregado del sustrato de caspasa-3 y -7 Ac-DEVD-AMC fluorogénico a una concentración final 6,6 μM . El control negativo (100% de actividad enzimática) contiene DMSO sin compuesto. Para el control positivo se utilizó un inhibidor covalente peptídico y 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) disuelto en DMSO. El volumen final de DMSO utilizado fue del 1% en todos los casos.

La acumulación del fluoróforo AMC se siguió midiendo el aumento de la fluorescencia (excitación 360 nm y emisión 460 nm) a 37 °C en un espectrofotómetro y espectrofluorímetro Varioskan (Thermo, Waltham, MA) [177]. Se graficaron las unidades arbitrarias de fluorescencia (RFU) en función del tiempo y se determinaron las pendientes iniciales. Los porcentajes de

inhibición se calcularon utilizando la ecuación 3, donde $pINH$ es la pendiente del gráfico en presencia de inhibidor y $pCASP$ es la pendiente en ausencia de inhibidor.

$$\% inh = 100 - \frac{pINH}{pCASP} * 100 \quad Ec. 3$$

El error se estimó como:

$$error = \frac{std\ pINH}{pCASP} * 100 \quad Ec. 4$$

Donde $std\ pINH$ es la desviación estándar del $pINH$.

3.5. Estudios fisicoquímicos: *in vitro* e *in silico*.

3.5.1. Aproximación a la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica (PAMPA).

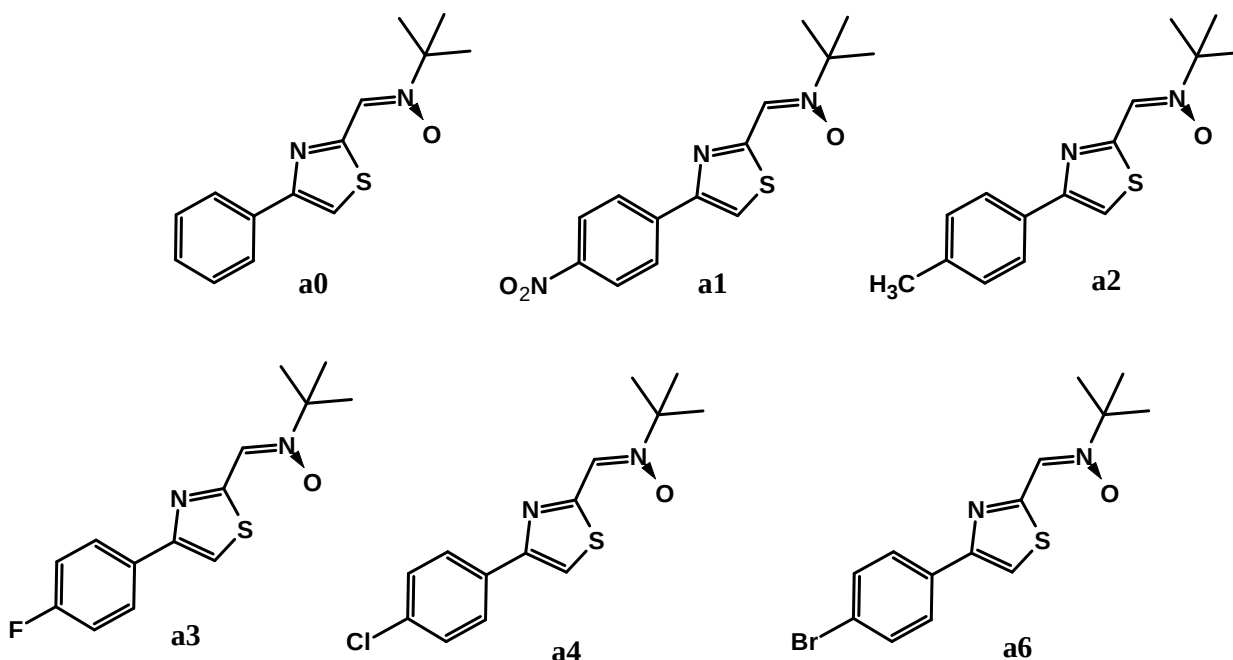
Este ensayo permite simular el pasaje de compuestos a través de una membrana en base a su composición lipídica, pudiendo así determinar la difusión pasiva de moléculas a través de una membrana artificial desde un compartimento dador, que contiene el compuesto de interés, a uno aceptor, en el que no está presente el compuesto al inicio del ensayo [178]. La membrana artificial utilizada se generó a partir de lípidos polares de cerebro porcino (PBLs) conteniendo fosfatidilcolina 49 %, fosfatidilinositol 6%, fosfatidiletanolamina 28.1 %, fosfatidilserina 9 %, esfingomielina 5.9 % y cerebrósidos 30.9 %. El ensayo se realizó utilizando dos microplacas de 96 pocillos acopladas en forma de “sándwich”. La microplaca aceptor se posicionó en la parte superior del sándwich, su fondo presenta un microfiltro hidrofóbico sobre el cual se depositó la combinación de lípidos disueltos en un solvente orgánico (n-dodecano) a una concentración de 2 % m/v [178]. Ambos compartimentos dador y aceptor se llenaron con la solución amortiguadora a utilizar, al compartimento dador también se le agregó el compuesto de interés. Para determinar el pasaje a través de la membrana artificial fue necesario calcular la permeabilidad aparente (P_{app}). Para esto se incluyeron en el ensayo pocillos control a una concentración de equilibrio del compuesto a evaluar, esto representa la concentración máxima de compuesto en el pocillo aceptor, sino hubiera barrera entre los pocillos aceptor y dador. Utilizando la relación obtenida de bibliografía con las concentraciones de los pocillos problema y los pocillos control, fue posible obtener la P_{app} de los compuestos [179]. Los controles de permeabilidad positivos y negativos (verapamilo y teofilina, respectivamente) se evaluaron a

una concentración de 500 μM mientras que los derivados de nitrona a se evaluaron a una concentración de 100 μM , por problemas de solubilidad en el medio de trabajo. La proporción de DMSO no superó el 5%. Luego del llenado y ensamble de los pocillos en forma de sándwich, se incubó con agitación orbital durante 18 h. Posteriormente se realizaron los espectros UV-vis en cada pocillo [179].

3.6. Modelado Molecular.

3.6.1. Consideraciones generales.

Los estudios de modelado molecular fueron realizados durante una estancia de tres meses en el grupo de Quimioinformática de la Dra. Nuria Campillo del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC de Madrid, bajo su orientación y la del Dr. Carlos Roca. Durante esta estancia fue posible realizar la mayor parte de los estudios que se describen a continuación para los ligandos sintetizados **a1**, **a2**, **a3**, **a4**, y **a6**. Además, se incorporó a la serie el ligando **a0** que presenta un hidrógeno como sustituyente del fenilo (Esquema 4). Los estudios que quedaron pendientes fueron realizados por el Dr. Carlos Roca luego de terminada mi estancia. Actualmente se está llevando a cabo el modelado molecular del compuesto **a5**, el cual no aparece en los resultados de esta sección.



Esquema 4. Estructura química de compuestos híbridos combinando agrupamientos nitrona y 1,3- tiazol modelados.

3.6.2. Búsqueda de bolsillos de unión a ligando.

Con el fin de determinar los posibles bolsillos de unión a ligando en las enzimas caspasa-3 y caspasa-7 se utilizó el software de libre acceso Fpocket [180] (<http://www.sourceforge.net/projects/fpocket>), basado en parámetros geométricos de la estructura rígida de la proteína. El mismo se basa en la detección de α -esferas, que son esferas que conectan cuatro átomos en los bordes y no contienen ninguno en su interior. Los surcos y cavidades corresponden a esferas de radio medio [181]. Este software determina una colección de esferas, las agrupa en regiones comunes y calcula propiedades de cada bolsillo para luego clasificarlos mediante una función de puntuación. Para esta etapa se utilizaron ocho estructuras cristalográficas de caspasa-3 (PDB ID: 1NMQ, 1RHM, 1RHQ, 2H5J, 2XZD, 3DEH, 3DEJ, 3GJQ) y nueve de caspasa-7 (PDB ID: 1I51, 1K86, 2QL5, 3EDR, 3IBC, 3IBF, 5IC6, 4FEA, 5V6Z) obtenidas del Protein Data Bank (www.pdb.org). Las mismas fueron preparadas usando la herramienta Protein Preparation Wizard [182] contenida en el programa Maestro [183] donde se eliminaron las moléculas de agua y ligandos en caso de haberlos, se agregaron los átomos de hidrógeno y se modelaron los residuos que por alguna razón cristalográfica se encontraban incompletos. Los residuos de las proteínas fueron ionizados a pH 7.2. Una vez preparadas las proteínas, fueron calculados los bolsillos por fpocket, analizándose visualmente las estructuras para identificar los bolsillos con mejor puntuación posible que se encuentran conservados en la mayor parte de las estructuras.

3.6.3. Análisis hotspot.

Para el análisis hotspot con el software Fragment Hostspot Maps [184] se utilizaron las mismas estructuras de caspasa-3 y caspasa-7 que fueron utilizadas para el cálculo de Fpocket, previamente preparadas usando la herramienta Protein Preparation Wizard, implementada en el programa Maestro, como se describió en el apartado anterior **3.6.2**. Los mapas hotspot fueron visualizados usando el software Pymol [185] con el fin de identificar los residuos que podrían estar implicados en la interacción entre ligando y proteína. Esta información fue posteriormente utilizada en los estudios de docking con el fin de asegurarnos de que las interacciones potencialmente importantes estuvieran contempladas en el modelo del complejo proteína-ligando.

3.6.4. *Docking molecular.*

La predicción del modo de unión de las nitronas con caspasa-3 se realizó mediante *docking* molecular.

3.6.4.1. Preparación de las dianas para *docking*.

Las estructuras cristalográficas de caspasa-3 humana (PDB ID: 1RHM) a la cual se le extrajo el ligando y la estructura de apo-caspasa-7 humana (PDB ID: 3IBF) fueron utilizadas para realizar el *docking* molecular de los ligandos. Previo al *docking* estas estructuras fueron sometidas a simulaciones de dinámica molecular convencional con el objetivo de que las cadenas laterales de los residuos se acomodaran y tener una estructura más representativa. La parametrización de las estructuras, y sus simulaciones se realizaron mediante el empleo de las herramientas del programa AMBER 14 [186]. Para las proteínas se utilizó el campo de fuerza *ff14SB* [187]. Se agregaron contraiones para neutralizar la carga de cada sistema y moléculas de agua mediante una caja octaédrica truncada de aguas TIP3P extendiéndose 12 Å desde los bordes de la proteína en todas las direcciones. Los residuos catalíticos de cisteína e histidina se consideraron neutros dado que de acuerdo al mecanismo de acción actualmente propuesto la cisteína se desprotona durante el ataque nucleofílico al sustrato [188,189].

3.6.4.2. *Docking molecular.*

En primer lugar, se preparó la librería de ligandos empleando el módulo Ligprep wizard de Maestro (Schrodinger® Software Modules) el cual permite añadir hidrógenos, neutralizar grupos cargados y generar estados de ionización de los compuestos para finalmente obtener la estructura tridimensional. Para el cálculo de *docking* molecular se utilizó el programa Autodock 4.2 [190] y se seleccionaron cargas Gasteiger. Para el cálculo del *docking* se necesita definir una grilla donde se delimita el espacio de búsqueda ligando-receptor. La grilla fue centrada en las coordenadas $x=45.66$, $y=30.59$, $z=59.80$ en caspasa-3 y $x=31.87$, $y=24.37$, $z=32.35$ en caspasa-7. Las dimensiones de la grilla fueron definidas a 126 Å en las tres dimensiones, con un espaciado de 0.375 Å. Este tamaño de grilla es suficientemente grande para contener los bolsillos encontrados en fpocket y hotspot. Mediante el uso de estas grillas se realizó el *docking* con el algoritmo Genético Lamarckiano [191], utilizando los parámetros por defecto del programa y un total de 250 corridas. Las conformaciones con una diferencia menor a 2.0 Å se agruparon en el mismo *cluster*. Para obtener los complejos ligando-proteína en cada caso se seleccionó la conformación con menor energía de unión correspondiente al *cluster* más poblado.

3.6.5. Optimización de la estructura tridimensional de moléculas orgánicas.

Como punto de partida a las dinámicas moleculares se necesitan calcular las cargas atómicas para parametrizar los ligandos. En primer lugar, optimizamos la estructura y luego realizamos cálculos de energía. Para esto utilizamos el modelo continuo IEF-PCM [192] y métodos cuánticos a nivel DFT (*Density Functional Theory*), empleando el funcional híbrido ω B97XD [193] y el conjunto de base 6-31+G** [194], utilizando radios de Bondi para la construcción de la cavidad. Con el fin de comprobar que la estructura ha convergido en un mínimo absoluto y no un mínimo local se realizaron cálculos *single-point* de frecuencia al mismo nivel de cálculo, para determinar los modos normales de vibración y corroborar que todos los valores propios del Hessiano exacto fueran positivos. Los cálculos se llevaron a cabo con el paquete Gaussian 09 [195]. En segundo lugar, calculamos las cargas atómicas resp mediante el módulo Antechamber [196] de AMBER y el resto de los parámetros se obtuvieron del campo de fuerza GAFF (Generalized Amber Force Field) [197].

3.6.6. Preparación de los sistemas para simulaciones de dinámica molecular.

Los complejos obtenidos por *docking* se utilizaron como archivos de entrada para simulaciones de dinámica molecular convencional (cMD), así como también las estructuras de caspasa-3 (PDB ID: 1RHM) y la de caspasa-7 (PDB ID: 3IBF) en ausencia de ligando, con el objetivo de comparar el comportamiento a lo largo de las trayectorias de ambas enzimas con y sin ligando. La parametrización de las estructuras, y sus simulaciones se realizaron mediante el empleo de las herramientas del programa AMBER 14. La parametrización de los ligandos, previo a la realización de las simulaciones por cMD se llevó a cabo mediante el protocolo descrito en la sección 3.6.5., utilizándose las cargas atómicas resp y parámetros del campo de fuerza GAFF. Para las proteínas se utilizó el campo de fuerza ff14SB. Se agregaron contraiones para neutralizar la carga de cada sistema y moléculas de agua mediante una caja octaédrica truncada de aguas TIP3P extendiéndose 12 Å desde los bordes de la proteína en todas las direcciones. Los residuos catalíticos de cisteína e histidina se consideraron neutros por los motivos mencionados en 3.6.4.1.

3.6.7. Simulaciones de dinámica molecular convencional.

3.6.7.1. Equilibrado.

Con el objetivo de realizar las simulación se relajar energéticamente las geometrías de los sistemas se realizan dos etapas de minimización: (1) en primer lugar se minimiza sólo el solvente manteniendo restringida la estructura proteica, con un número máximo de 5000 ciclos, los primeros 1000 ciclos usando el algoritmo *steepest descent*, y los últimos 4000 ciclos de minimización de gradiente conjugado; (2) seguido de una minimización del sistema molecular completo sin restricciones a través de 15000 ciclos, con los últimos 10000 ciclos mediante el gradiente conjugado.

Posteriormente, se realiza una etapa de calentamiento y equilibrado de los sistemas relajando las moléculas de agua y los contraiones mediante una simulación corta de 100 ps aumentando la temperatura de 0 a 300 K a presión y volumen constantes, aplicando una restricción energética constante de $20 \text{ kcal mol}^{-1} \text{Å}^{-1}$. Seguido de una segunda etapa de equilibrado de 500 ps a 300 K y 1 atm, disminuyendo la restricción energética a $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{Å}^{-1}$.

3.6.7.2. Producción de la simulación.

Finalmente, se corrieron al menos 100 ns de MD productiva en un ensamble NPT (esto es, número de átomos, presión y temperatura constantes) a 300 K y 1 atm, sin restricciones. Se utilizó el termostato de Langevin [198] y el baróstato de Monte Carlo [199] para regular la presión y temperatura de cada sistema, respectivamente. Se usó el algoritmo SHAKE [198] para restringir todas las distancias de enlace que involucran hidrógenos y se empleó un tiempo de paso de 2 fs. Para el tratamiento de las interacciones electrostáticas no enlazantes se empleó un *cutoff* de 10 Å que fue disminuyendo gradualmente hasta llegar a 8 Å en el último paso de la dinámica productiva.

3.6.8. Dinámica molecular acelerada.

Tomando como punto de partida los complejos caspasa-nitrona que se obtuvieron por cMD, se realizaron simulaciones de dinámica molecular acelerada (aMD) [200]. La base teórica de este tipo de simulaciones se cimenta sobre la reducción de la energía potencial del sistema y de otras energías como la de torsiones, ángulos de enlace y diedros, disminuyendo así los umbrales de energía y aumentando el muestreo conformacional del sistema. Esto permite realizar

simulaciones en las que en un menor tiempo se pueden observar un mayor número de conformaciones ligando-proteína o una evolución de los complejos hacia el equilibrio.

Esto se logra sumando un potencial de impulso no negativo $\Delta V(r)$ al potencial real cuando éste es menor que una energía umbral, resultando en la reducción de las barreras locales, mediante el cálculo de las siguientes ecuaciones:

$$V(r)=V(r), V(r) \geq E \quad \text{Ec.5}$$

$$V^*(r)=V(r)+\Delta V(r), V(r) < E \quad \text{Ec.6}$$

Dónde $V(r)$ es el potencial real, $V^*(r)$ el potencial modificado y E la energía umbral. La ecuación 3 describe la forma del potencial sesgado $\Delta V(r)$ cuando se utiliza el algoritmo dual-boost que aplica un impulso sobre la energía potencial total y sobre la energía de los diedros:

$$V(r) \frac{(E_{pot}-V(r))^2}{\alpha_{pot}+E_{pot}-V(r)} + \frac{(E_{died}-V_{died}(r))^2}{\alpha_{died}+E_{died}-V_{died}(r)} \quad \text{Ec.7}$$

Los términos energéticos E_{pot} y E_{died} se describen según:

$$E_{tot\ pot} = \langle E_{pot} \rangle + \alpha_{pot}, \quad \alpha_{pot} = a1 * N_{atoms} \quad \text{Ec.8}$$

$$E_{tot\ died} = \langle E_{died} \rangle + N_{resd} * b1 + \alpha_{died}, \quad \alpha_{died} = \frac{b1 * \lambda * N_{resd}}{5} \quad \text{Ec.9}$$

Dónde $\langle E_{pot} \rangle$ y $\langle E_{died} \rangle$ son las energías potencial total y de diedro promedio, obtenidas a partir de las simulaciones convencionales, N_{resd} y N_{atoms} son los números de residuos y átomos, y λ el factor de aceleración. Para este estudio se seleccionó $a1=0.2$ kcal mol⁻¹ y $b1=3.5$ kcal mol⁻¹, se realizaron simulaciones de 100 ns, utilizando como punto de partida las coordenadas finales de los 100 ns NVT de cada cMD.

Todas las simulaciones se realizaron sobre tarjetas gráficas usando el módulo *pmemd.cuda* implementado en AMBER14.

El análisis de los resultados de cMD y de aMD se realizó mediante el módulo *cpptraj* [201] incluido en el paquete *AmberTools 14*. La energía libre de unión de los sistemas ligando-proteína se obtuvo mediante el método de post-procesamiento MM-PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area) [202]. Para la visualización de las trayectorias y la generación de imágenes se utilizó el programa VMD [203] y Discovery Studio 4.5 [204]. Los gráficos de RMSD

(del inglés, *root-mean-square deviation*) y RMSF (del inglés, *root-mean-square fluctuation*) fueron visualizados con el software Xmgrace [205] y obtenidos con OriginPro 8.5 [206].

3.6.9. Análisis de los componentes principales (PCA).

Con el propósito de analizar las trayectorias de las dinámicas se realizó un análisis de componentes principales. PCA es una transformación lineal que extrae los elementos más importantes en los datos, usando una matriz de covarianza C_{ij} construida a partir de las coordenadas atómicas que describen los grados de libertad accesibles de la proteína:

$$C_{ij} = \langle (x_i - \langle x_i \rangle)(x_j - \langle x_j \rangle) \rangle \quad \text{Ec.10}$$

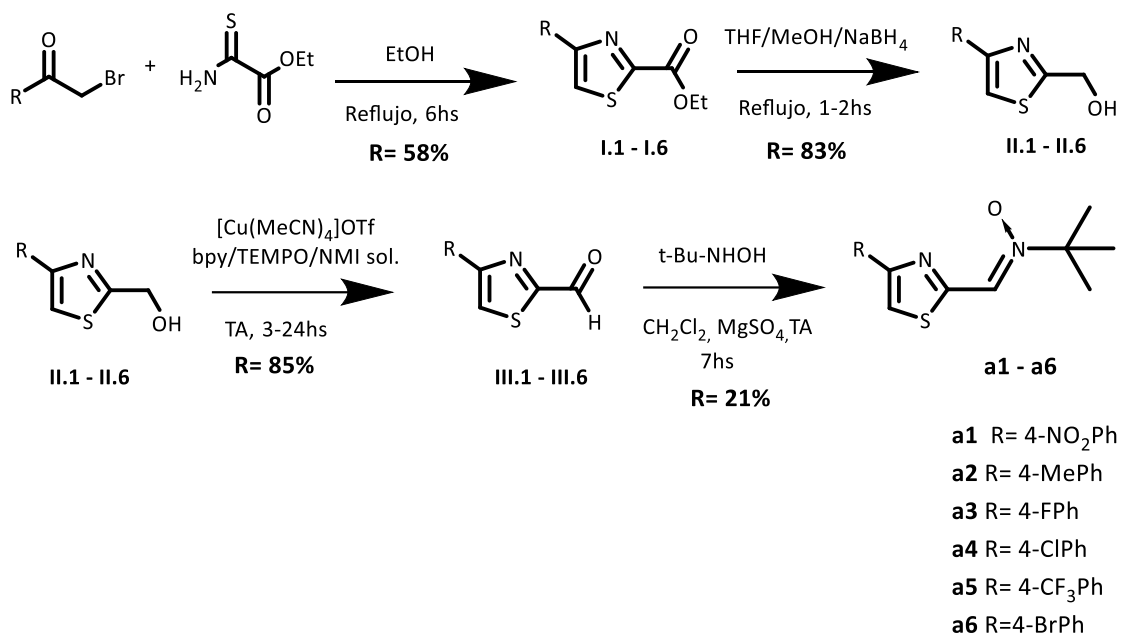
Dónde x_i , x_j representan todos los posibles pares de las $3N$ coordenadas cartesianas del sistema, siendo N el número de átomos y $\langle x_i \rangle$, $\langle x_j \rangle$ las coordenadas de la posición promedio en la trayectoria. Posterior a la diagonalización se obtiene un conjunto de vectores propios con sus valores propios, que describen los ejes de máxima varianza de la distribución de conformaciones y el porcentaje de la varianza de las fluctuaciones atómicas contenidas en cada vector. Cuando la trayectoria original centrada, es proyectada sobre un vector propio, el resultado es llamado componente principal (PC). Diferentes configuraciones del ligando, de la proteína y del complejo dan lugar a diferentes vectores. La representación de los vectores en una gráfica bidimensional y a lo largo del tiempo nos muestra la mayor presencia de unas configuraciones frente a otras a lo largo de la simulación.

Para el análisis se utilizó el módulo *cpptraj* y el programa QtiPlot [207] para realizar los gráficos *heatmap*.

4. Resultados y discusión

4.1. QUÍMICA.

La síntesis de nitronas derivadas de 1,3-tiazol se realiza en cuatro pasos (esquema 5).

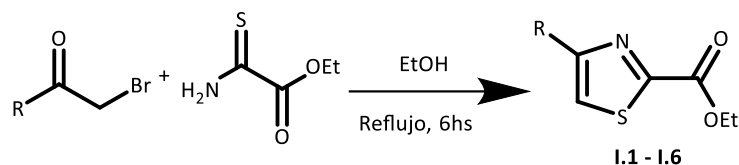
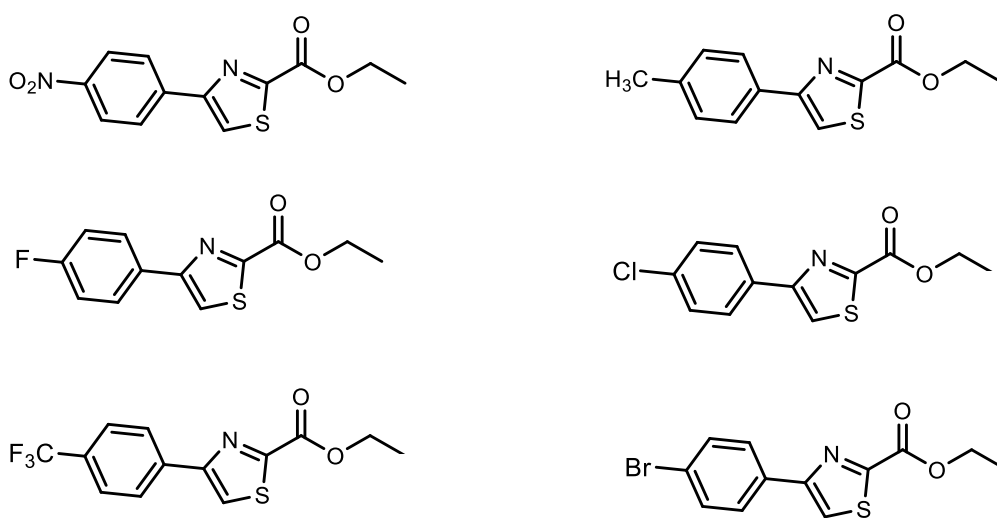


Esquema 5. Ruta sintética y condiciones para la obtención de los compuestos híbridos.

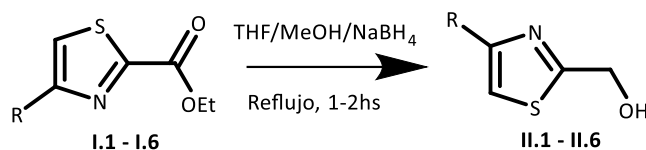
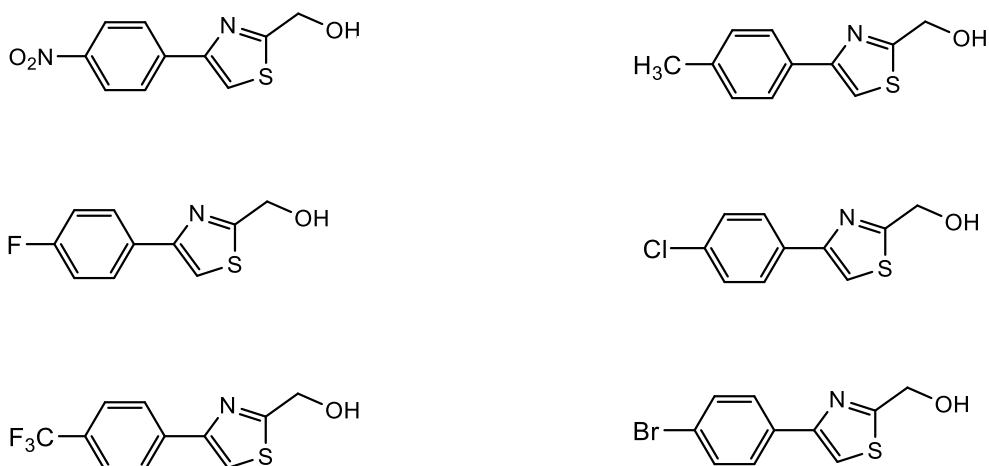
Los productos intermedios se obtuvieron con rendimientos de muy buenos a moderados, mientras que la reacción para obtener el producto final deseado dio un rendimiento menor.

4.1.1. Síntesis de derivados 4-Aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol.

Partiendo de derivados de 2-bromoacetofenona adecuadamente sustituidos en posición 4 del anillo aromático y etiltioxiato se realizó la síntesis del anillo tiazólico, según lo reportado por Li y colaboradores [163] (Esquema 6). En este primer paso ocurre un ataque nucleofílico por parte del etiltioxiato sobre el átomo de carbono metilénico de la 2-bromoacetofenona correspondiente y posterior ciclación del anillo tiazólico obteniéndose el éster deseado (I.1-I.6). Para confirmar la presencia del heterociclo tiazol en los derivados obtenidos se realizaron espectros de ¹H y ¹³C-RMN identificándose las señales correspondientes al protón del tiazol y sus tres carbonos. Los derivados de 4-Aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol de interés se obtuvieron con buenos rendimientos y se utilizaron para la siguiente etapa de reacción (Figura 15).

Esquema 6. Síntesis de derivados 4-Aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (**I.1- I.6**).**Figura 15.** Estructuras y rendimientos de obtención de los derivados 4-Aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (**I.1 – I.6**).**4.1.2. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol.**

A continuación, los correspondientes derivados de 4-Aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol (**I.1 – I.6**) obtenidos, se hacen reaccionar con borohidruro de sodio para reducir el grupo éster a alcohol y así obtener los derivados de 4-Aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol (**II.1 – II.6**) de interés (Esquema 7). Los productos de esta segunda etapa presentaron rendimientos moderados a excelentes y se utilizaron para el tercer paso de la ruta sintética (Figura 16).

Esquema 7. Síntesis de derivados 4-Aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol (**II.1- II.6**).**Figura 16.** Estructuras y rendimientos de obtención de los derivados 4-Aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol (**II.1- II.6**).**4.1.3. Síntesis de derivados de 4-Aril-2-formil-1,3-tiazol.**

Posteriormente, se siguió una ruta descrita por Steves y Sthal [164] en el área de la química verde, de oxidación catalítica del grupo alcohol para la obtención de los derivados de 4-Aril-2-formil-1,3-tiazol (**III.1 – III-6**) (Esquema 8). Esta se basa en una solución catalítica compuesta por bpy/Cu/TEMPO/NMI estable en el tiempo y a temperatura ambiente, la cual es quimiosselectiva para alcoholes primarios y en combinación con $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{OTf}$ alcanza su máximo poder oxidativo.

Cabe destacar que este sistema catalítico opera de forma eficiente a temperatura ambiente utilizando el oxígeno del aire como oxidante. El mecanismo catalítico sucede en dos etapas: (1) “oxidación catalítica” en donde el Cu^{I} y el TEMPO-H son oxidados por el O_2 vía el intermediario

binuclear Cu_2O_2 y (2) “oxidación del sustrato” mediado por Cu^{II} y el radical nitroxilo del TEMPO vía el intermediario Cu^{II} -alcóxido, obteniéndose rendimientos del orden del 90%. La alta pureza de los intermedios carbonílicos obtenidos con muy buenos rendimientos (Figura 17) permitió separarlos por filtración a vacío usando un embudo con un tapón de sílica en donde quedó retenido el cobre utilizado en la reacción, pudiendo así continuar la ruta sintética sin necesidad de purificar por cromatografía en columna y como se evidencia del espectro de RMN de protón.

Esquema 8. Síntesis de derivados 4-Aril-2-formil-1,3-tiazol (III.1- III.6).

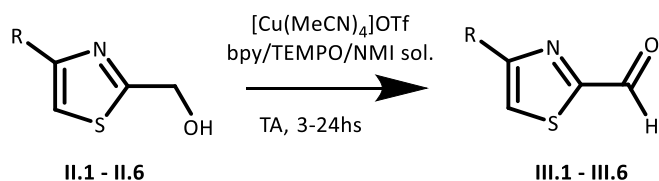
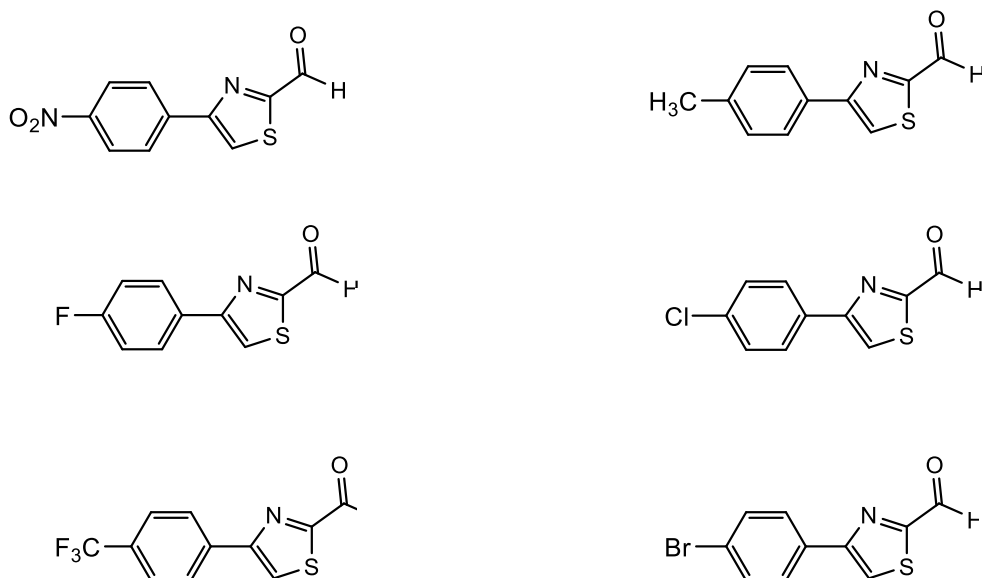


Figura 17. Estructuras y rendimientos de obtención de los derivados 4-Aril-2-formil-1,3-tiazol (III.1- III.6).



4.1.4. Síntesis de derivados de α -(4-aryl-1,3-tiazol-2-il)-*N*-*tert*-butilnitrona.

Por último, se avanzó hacia la formación de los productos finales, nitronas derivadas del sistema heterocíclico 1,3 tiazol (**a1-a6**) mediante la condensación entre el aldehído del paso previo y la

tert-butil hidroxilamina usando CH_2Cl_2 como disolvente en presencia de MgSO_4 anhidro a TA, según lo descrito por Roy y Narayan [166] (Esquema 9). En este caso el MgSO_4 actúa como agente desecante capturando las moléculas de agua que se generan como subproducto de la reacción. La serie de productos finales derivados de α -(4-aryl-1,3-tiazol-2-il)-*N-tert*-butilnitrona (**a1-a6**) se obtuvieron con rendimientos bajos a moderados (Figura 18).

Esquema 9. Síntesis de derivados α -(4-aryl-1,3-tiazol-2-il)-*N-tert*-butilnitrona (**a1- a6**).

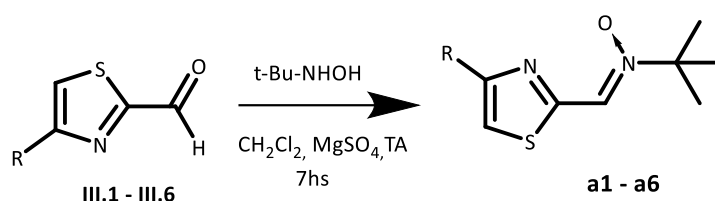
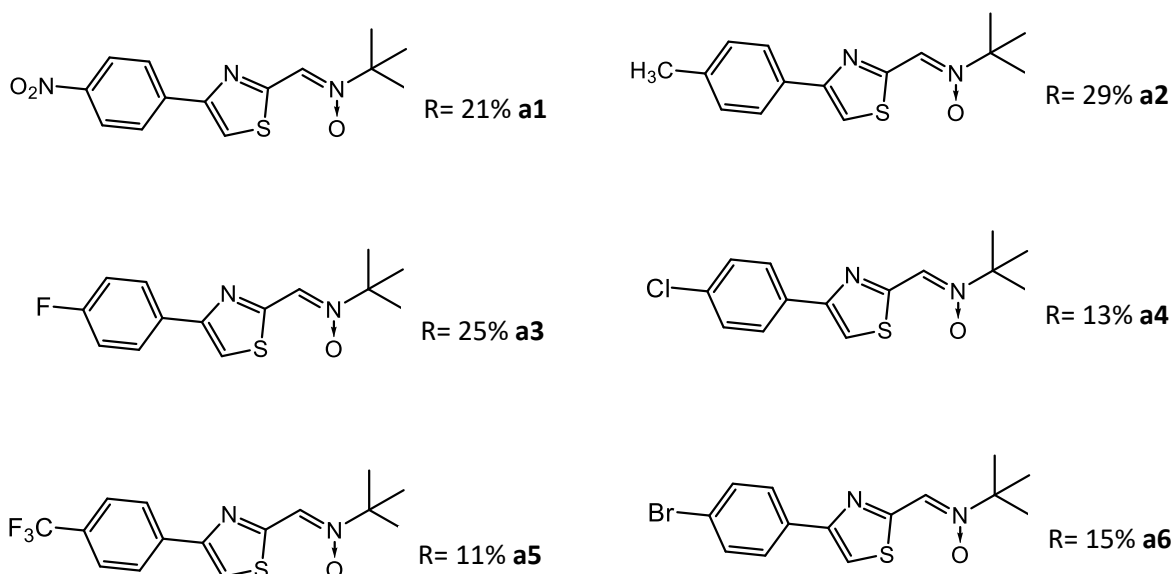
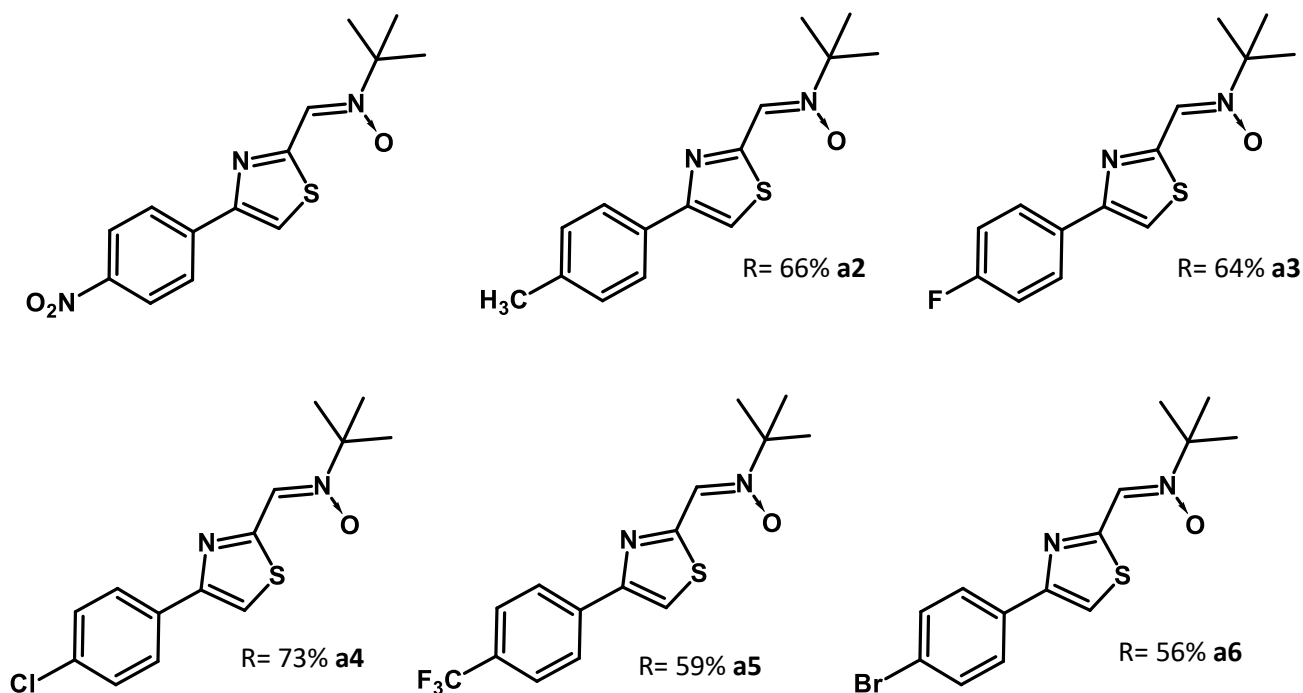


Figura 18. Estructuras y rendimientos de obtención de los productos finales derivados de α -(4-aryl-1,3-tiazol-2-il)-*N-tert*-butilnitrona (**a1- a6**).



Finalmente, siguiendo la ruta sintética aquí descrita se lograron obtener 6 compuestos híbridos que combinan la función nitrona y el sistema heterocíclico 1,3-tiazol con un rendimiento global bueno (Figura 19).

Figura 19. Estructuras y rendimientos globales de las nitronas derivadas de 1-3 tiazol obtenidas (a1 – a6).

El análisis de los espectros ^1H RMN y C^{13} RMN de los derivados **a1-a6** permitieron evidenciar las señales correspondientes al hidrógeno y carbono del grupo -CH del heterociclo tiazol a aproximadamente δ 8.5 ppm y δ 120.0 ppm respectivamente. También se indicaron las señales correspondientes al hidrógeno y carbono del grupo -CH adyacente al grupo N-óxido de la funcionalidad nitrona a δ 8.0 ppm y δ 115.0 ppm respectivamente. Con respecto a los grupos -CH₃ que conforman el *tert*-butilo unido al N-óxido de la nitrona las señales de los hidrógenos aparecen en el entorno de δ 1.6 ppm y las de los carbonos a δ 27.0 (Figuras 20 y 21).

Figura 20. Espectro ^1H RMN ampliado del compuesto **a4**. δ (ppm): 8.56 (H-3), 8.09 – 8.05 (H-11, H-15), 8.01 (H-7), 7.52 – 7.48 (H-14), 1.67 H-16, H-17, H-18.

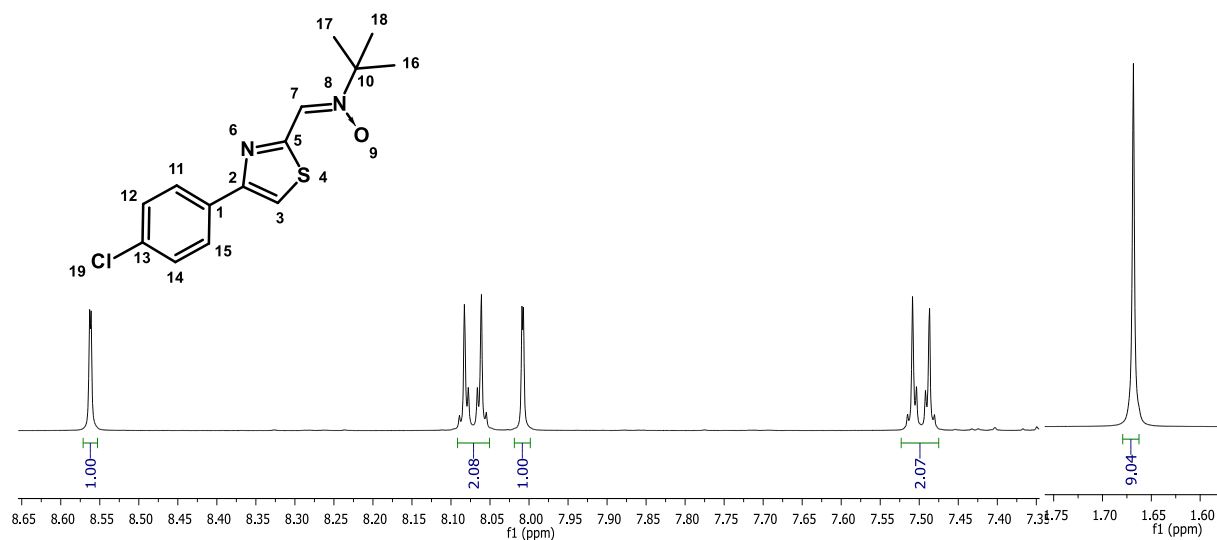
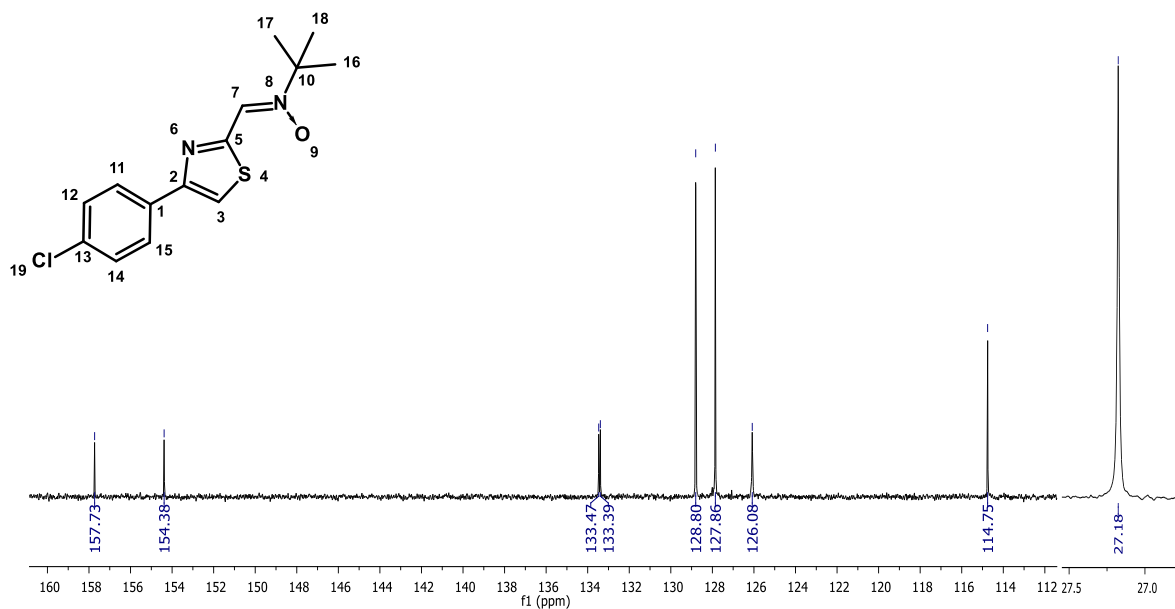


Figura 21. Espectro ^{13}C RMN ampliado de la nitrona derivada de 1,3 tiazol, **a4**. δ (ppm): 157.73 (C5), 154.38 (C2), 133.47 (C13), 133.39 (C1), 128.80 (C12, C14), 127.86 (C11, C15), 126.08 (C3), 114.75 (C7), 70.53 (C10), 27.18 (C16, C17, C18).



La confirmación de la obtención de 6 nitronas derivadas del sistema heterocíclico 1,3-tiazol con sustituyentes con distintas características estereo-electrónicas, además de aportar versatilidad a la serie de compuestos permitió retroalimentar los estudios teóricos de forma de determinar las características estructurales más relevantes asociadas a la inhibición de la enzima caspasa-3 y su actividad neuroprotectora.

4.2. BIOLOGÍA.

4.2.1. Determinación de la viabilidad celular.

Los ensayos de viabilidad celular en células HT22 permitieron determinar la máxima concentración no tóxica de los compuestos para luego realizar los posteriores ensayos biológicos. Los resultados muestran que los compuestos **a1** - **a6** no afectan la viabilidad celular a bajas concentraciones, y sostienen un porcentaje de viabilidad celular mayor al 75 % hasta una concentración máxima de 25 μ M en células HT22 tratadas por 24 horas (Figura 22).

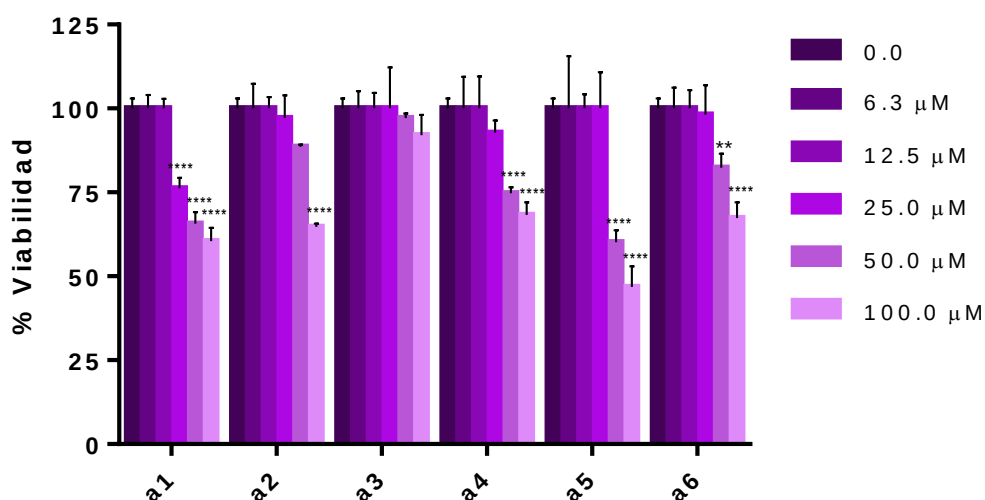


Figura 22. Efecto de nitronas derivadas de 1,3-tiazol en la viabilidad celular de la línea neuronal HT22 tratadas durante 24 horas. Resultados expresados como el promedio $\pm$ SD, **** $p \leq 0.0001$ two-way Anova seguido por el test de multicomparaciones de Bonferroni.

Teniendo en cuenta estos resultados, se definió utilizar los derivados **a1-a6** a una concentración 25 μ M para la realización de los ensayos biológicos.

4.2.2. Determinación de la actividad antioxidante.

4.2.2.1. Determinación de la viabilidad celular.

Con el fin de determinar la concentración H_2O_2 a utilizar en los ensayos de inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), se evaluó la viabilidad celular en células HT22 en presencia de H_2O_2 en un rango de concentraciones entre 100 y 1000 μM durante 1 hora por el método de MTT (Figura 23).

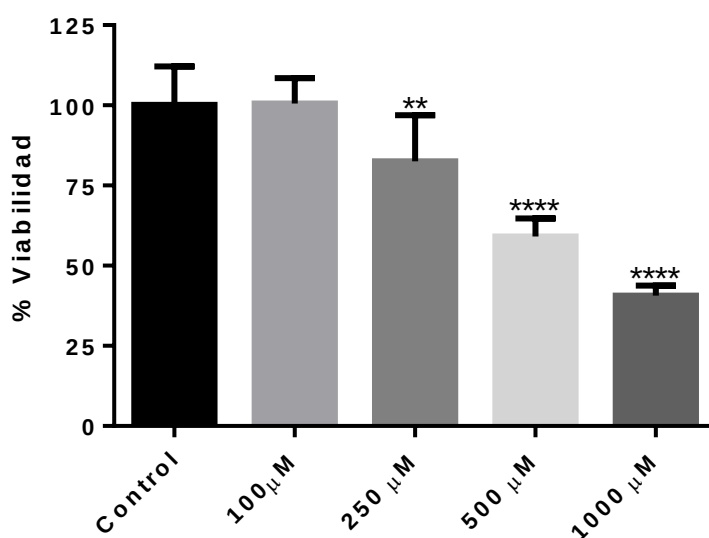


Figura 23. Efecto de H_2O_2 en la viabilidad celular de la línea celular HT22 tratadas durante 1 hora. Resultados expresados como el promedio $\pm$ SD, **** $p \leq 0.0001$ one-way Anova seguido por el test de multicomparaciones de Dunnet respecto a H_2O_2 .

Los resultados obtenidos indican que a 100 μM las células permanecen viables, a 250 μM hay una leve disminución de la viabilidad celular, mientras que a mayores concentraciones (500 y 1000 μM) existe una importante reducción de la viabilidad celular.

4.2.2.2. Determinación de la actividad antioxidante.

4.2.2.2.1. Inducción de ROS intracelular.

En primer lugar, se realizó la puesta a punto de la inducción de la formación de ROS intracelular por H_2O_2 a distintas concentraciones (0 - 500 μM) y tiempos (30 min – 24 hs) mediante la sonda fluorescente DCFH-DA.

De acuerdo a los resultados obtenidos de viabilidad celular y de producción de ROS intracelular, definimos que la mejor condición de ROS y viabilidad celular se obtuvo cuando las células fueron incubadas a 250 μM de H_2O_2 durante 1 hora.

4.2.2.2.2. Actividad antioxidante de derivados de nitrona.

Se procedió a evaluar la actividad antioxidante de la nueva serie de nitronas derivadas de 1,3-tiazol a través de la pre-incubación de los compuestos durante 2 horas y posterior tratamiento con H_2O_2 a 250 μM durante 1 hora en ausencia de SFB. Vale la pena mencionar que la estabilidad del grupo nitrona en estas condiciones en el medio de cultivo utilizado no fue ensayada quedando pendiente de realizarse. En el ensayo se incluyó un control con DMSO sin tratamiento con H_2O_2 . Las imágenes obtenidas por microscopía confocal muestran un incremento significativo en la generación de ROS en las células tratadas con H_2O_2 (Figura 24, B). Los resultados muestran que las células pre-tratadas con 25 μM de las nitronas derivadas de 1,3-tiazol previo al estímulo con H_2O_2 , presentan intensidades de fluorescencia muy bajas, disminuyendo los niveles de ROS en un 57% (**a2**), 82% (**a4**), 90% (**a1**, **a3**, **a5**) y 100% (**a6**) (Figura 24, A). Estos resultados indican que la capacidad de atrapar radicales libres de los compuestos híbridos en células de mamífero es excelente. De todas maneras, para confirmar el efecto de las nitronas en células del sistema nervioso sería interesante realizar este ensayo en un cultivo neuronal diferenciado de la línea derivada de hipocampo de ratón HT22. Los valores de intensidad de fluorescencia del DCF cuantificados para las diferentes muestras fueron normalizados contra H_2O_2 que representa el 100% de ROS intracelular.

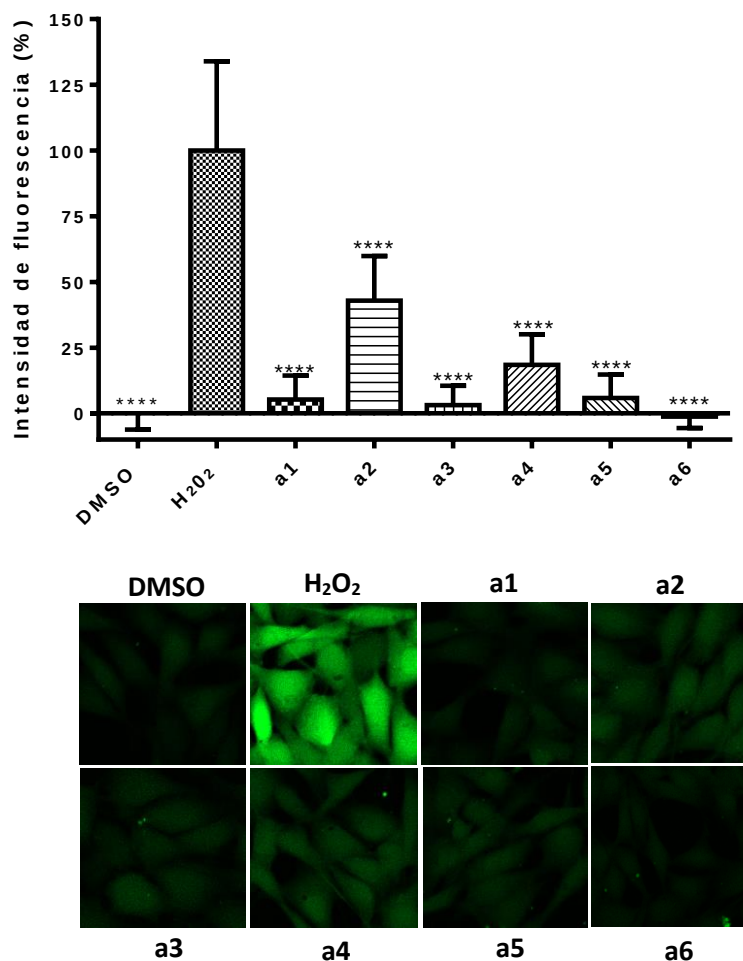
A

Figura 24. Efecto de nitronas derivadas de 1,3 tiazol en los niveles de ROS inducido por H₂O₂ en la línea celular HT22. (A) Gráfico de intensidad de fluorescencia del DCF generado a partir de la cuantificación de 250 células por condición. Resultados normalizados contra H₂O₂ y expresados como el promedio $\pm$ SD de un ensayo por triplicado, * $p \leq 0.1$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$ one-way Anova seguido por el test de multicomparaciones de Dunnet respecto a H₂O₂. **(B)** Imágenes representativas adquiridas en microscopio confocal de la fluorescencia del DCF en células HT22 tratadas con DMSO y H₂O₂ en ausencia y presencia de las nitronas.

El estudio comparativo de los resultados en base a las propiedades de los sustituyentes señala que los compuestos con sustituyentes con características de electrón aceptor por efecto inductivo (**a1, a3, a4, a5, a6**) logran alcanzar niveles de ROS similares (**a1, a3, a5**) o iguales (**a6**) al control negativo con DMSO, mientras que el compuesto con sustituyente metilo con efecto electrón dador (**a2**) reduce dos tercios del ROS total en las células. Estos resultados ponen en evidencia la importancia de los efectos electrónicos del sustituyente en *para* del anillo fenilo.

4.2.3. Determinación de la inhibición de apoptosis celular.

A continuación, se evaluó la capacidad de las nitronas derivadas de 1,3-tiazol sintetizadas de inhibir la apoptosis inducida por CPT en la línea celular neuronal HT22. Las muestras fueron marcadas con anexina-V-FITC / IP y analizadas mediante citometría de flujo.

Los resultados de citometría de flujo obtenidos indican que el tratamiento de las células con 5 μ M de CPT por 15 horas resultó en un 26.5% de células en proceso de apoptosis como muestra la marca con Anexina V/IP comparado con un 2.4% observado en las células control tratadas solo con DMSO (Figura 25). El valor obtenido en el control positivo de células pre-tratadas con 50 μ M de BCL fue de 3.2%.

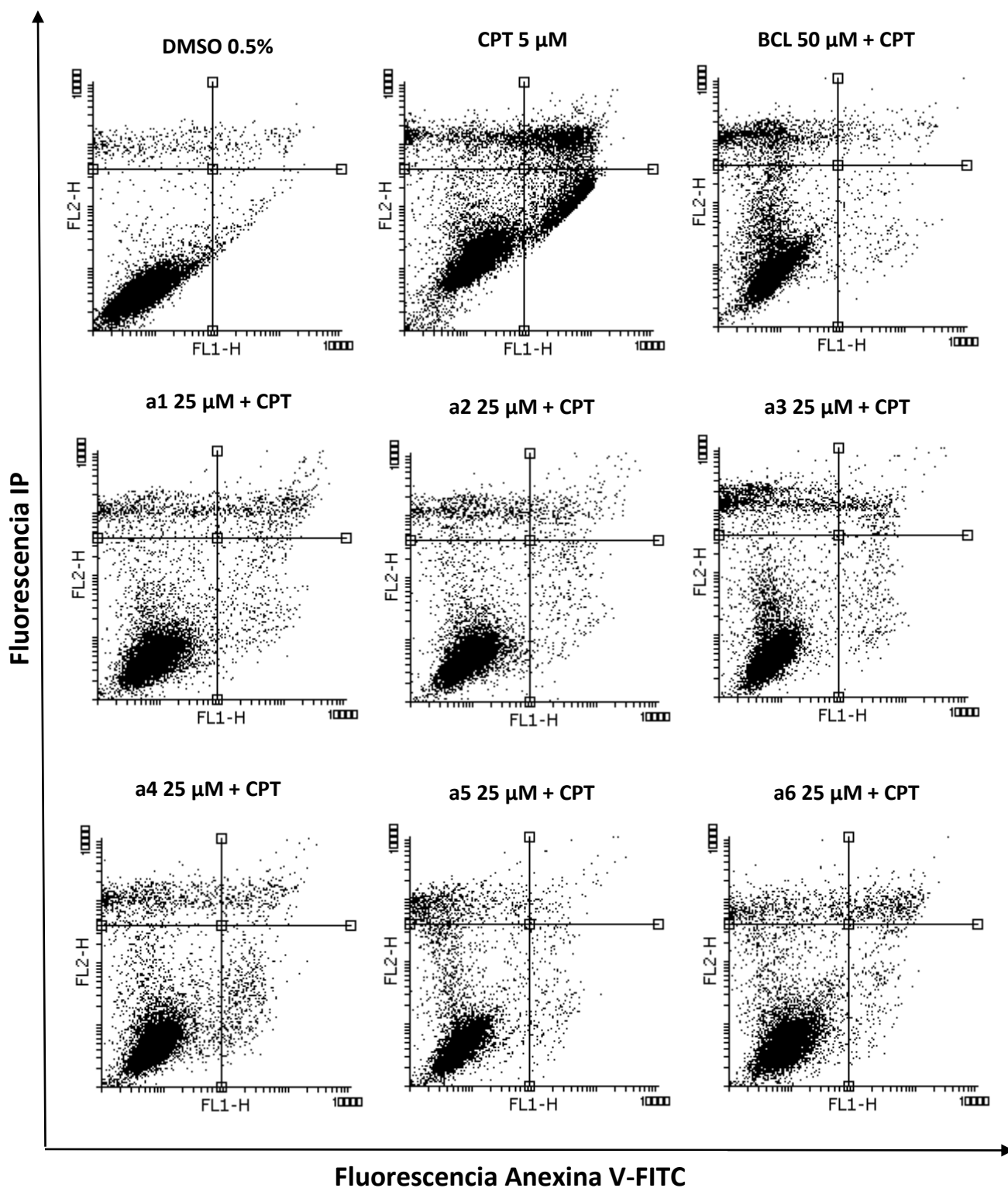


Figura 25. Análisis por citometría de flujo donde se muestra dentro del cuadrante inferior derecho las células AV (-) tratadas con Camptotecina (CPT) 5 μ M. Imagen representativa de dot-plots de Anexina-V-FITC (eje X) vs. la fluorescencia de IP (eje Y) de tres experimentos independientes.

Los datos obtenidos de células anexina V-FITC (+) normalizados contra CPT (Figura 26) de cultivos pre-tratados con 25 μ M de las nitronas derivadas de 1,3-tiazol, muestran reducciones del porcentaje de células apoptóticas del 41% (**a1**), 48% (**a2**), 63% (**a3**), 51% (**a4**), 76% (**a5**) y 38% (**a6**), siendo estos valores altamente significativos. Estos resultados revelan que todos los compuestos presentan un efecto antiapoptótico de medio a elevado donde el promedio de reducción de los niveles de células apoptóticas es mayor al 50%. Los inhibidores más potentes resultaron ser los derivados conteniendo los sustituyentes F (**a3**) y CF_3 (**a5**) mientras que los que contienen el agrupamiento NO_2 (**a1**) y Br (**a6**) son los que presentan menor efecto antiapoptótico.

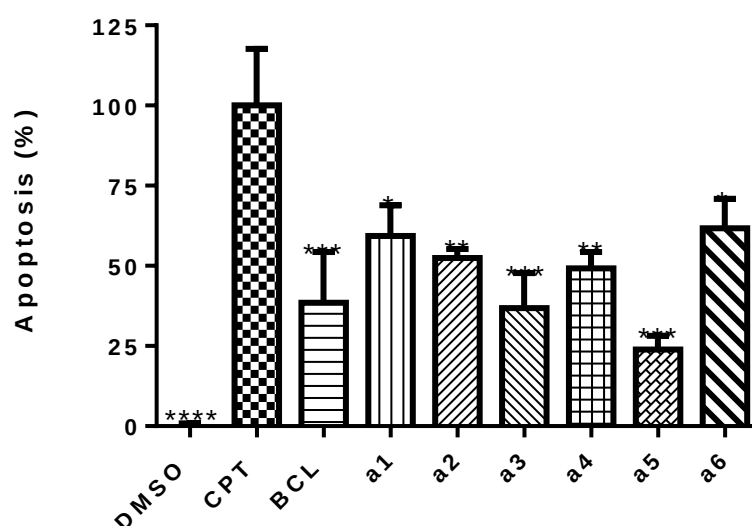


Figura 26. Efecto de nitronas en la inhibición de apoptosis inducida por CPT en células HT22. Resultados normalizados contra CPT y expresados como el promedio $\pm$ SD de tres ensayos independientes con un $n=3$, * $p \leq 0.1$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$ one-way Anova seguido por el test de multicomparaciones de Dunnet respecto a CPT.

En conclusión, los compuestos híbridos sintetizados presentan un potente efecto dual que comprende la inhibición de dos mecanismos claves en las enfermedades neurodegenerativas, el aumento de ROS intracelular y la inducción de la apoptosis. Los mecanismos de acción sobre los cuales estos compuestos actúan, podrían ser diferentes para cada una de las vías implicadas y por ende podrían tener más de un *blanco molecular* en las células. De acuerdo a los antecedentes de nuestro grupo previamente mencionados se espera que uno de estos blancos

moleculares sea la caspasa-3 y, por lo tanto, que su efecto antiapoptótico esté vinculado a la interacción directa con la enzima, y consecuente inhibición de la actividad caspasa-3 en las células. Para confirmar esta hipótesis se podría haber realizado el ensayo de detección de caspasa-3 activa en las células que se utilizó para ensayar las nitronas evaluadas durante mi tesis de grado. También se podría haber estudiado por western blot la presencia de caspasa-3 activa.

4.3. Producción y caracterización de caspasa-3 y caspasa-7 recombinantes.

4.1.2. Expresión de enzimas recombinantes.

La caspasa-3 y la caspasa-7 humanas recombinantes activas fueron expresadas en *E. coli*. La identificación de las distintas subunidades que componen estas proteasas dentro de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad se realizó mediante una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. La Figura 27 A y B muestran los geles del análisis de las fracciones eluidas de la columna de afinidad de la purificación de las caspasas-3 y -7 recombinantes respectivamente. El gel correspondiente a caspasa-3 (Figura 27 A) presenta la fracción soluble de proteínas de *E. coli* (FS) con la cual se cargó la columna de afinidad.

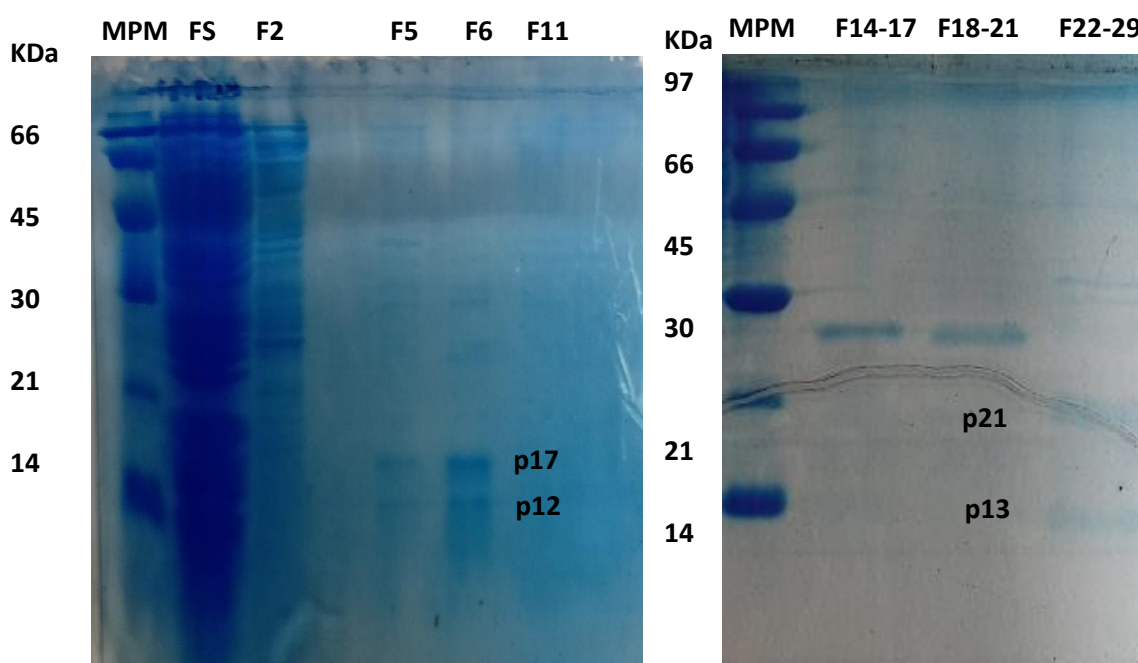


Figura 27. SDS-PAGE de la purificación por cromatografía de afinidad de caspasa-3 y -7 recombinantes. (A) producción de caspasa-3, pool de las fracciones: FS (fracción soluble de proteínas de *E. coli*), F. 2, F.5, F.6, F. 11 (número de fracciones eluidas de la columna de afinidad), **p17** corresponde a la cadena pesada

y **p12** a la cadena liviana. **(B)** producción de caspasa-7, pool de las fracciones: F.14-17, F.18-21, F.22-29 (rango de fracciones eluidas de la columna de afinidad), **p21** corresponde a la cadena pesada y **p13** a la cadena liviana. **MPM** (Marcador de peso molecular, GE Low molecular weight marker).

4.3.2. Determinación de la concentración de caspasa-3 y -7.

La concentración de caspasa-3 y -7 recombinantes fue estimada por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 280 nm. Dado que los residuos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina) absorben significativamente en la región del UV cercano (alrededor de 280 nm) y, por lo tanto, las proteínas presentan picos de absorción a esta longitud de onda siempre que posean aminoácidos aromáticos en su secuencia.

Con este objetivo se realizó un espectro de absorción UV-Vis de los preparados de caspasa-3 y -7 (Figura 28).

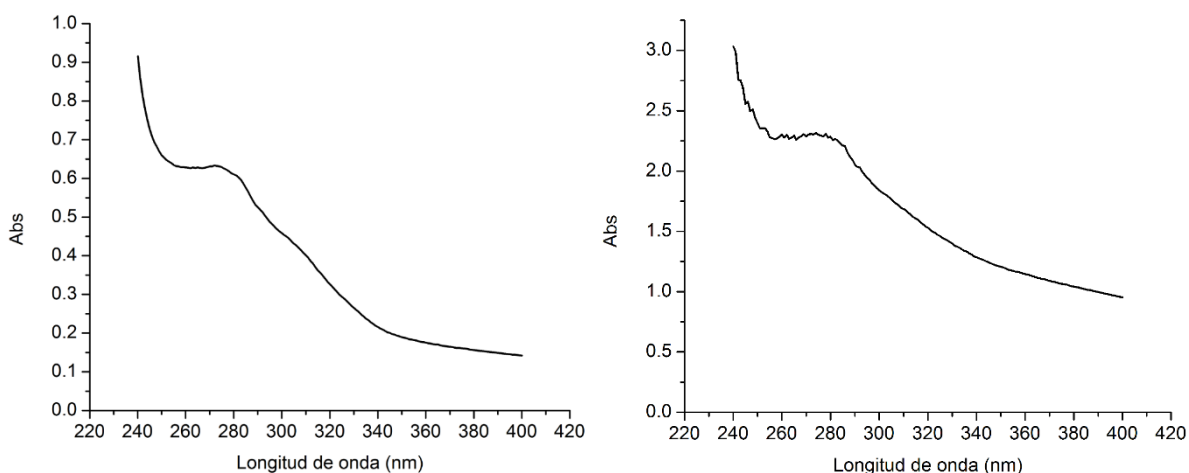


Figura 28. Espectros UV-Vis de (A) caspasa-3 y (B) caspasa-7. Espectros obtenidos en buffer de elución de la columna de afinidad.

Observando los espectros podemos apreciar que se obtuvo la caspasa-7 en mayor concentración con respecto a la caspasa-3. A continuación se determinó la concentración de ambas enzimas en el buffer de elución.

Conociendo el valor del coeficiente de absorción molar (ϵ) de ambas caspasas y aplicando la Ley de Lambert-Beer (Ec.1) se determinó la concentración de ambas enzimas:

$$[\text{caspasa-3}]_{(\epsilon_{280} = 51800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})} = 12 \mu\text{M}$$

$$[\text{caspasa-7}]_{\epsilon_{280}=45840 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} = 47 \mu\text{M}$$

Estos valores de concentración obtenidos son estimativos, si quisiéramos conocer la concentración exacta de enzima deberíamos realizar una titulación con un inhibidor covalente de alta afinidad. Sin embargo, esto no fue necesario para realizar los ensayos de inhibición enzimática dado que esperamos que los compuestos híbridos sintetizados se comporten como inhibidores competitivos clásicos. En este sentido, con el propósito de tener una concentración estimativa de trabajo, se consideró que ambas enzimas estaban totalmente puras y activas.

4.3.3. Actividad enzimática.

Una vez estimada la concentración de enzima recombinante se procedió a evaluar la actividad enzimática a través del cálculo de la velocidad inicial de la reacción catalizada por caspasa-3 a concentraciones crecientes de enzima (11, 21, 28, 32, 42 y 53 nM), con el fin de determinar la concentración óptima para los ensayos de inhibición enzimática.

Debido a que se espera que los compuestos híbridos actúen como inhibidores competitivos, es preferible que la concentración de sustrato utilizada en el ensayo sea menor al valor de K_m de la enzima reportado en la literatura, 10 μM [208], para así poder cuantificar mejor su efecto. En este sentido, se utilizó una concentración fija de 6.6 μM de sustrato específico (Ac-DEVD-AMC). Los gráficos a continuación muestran los cursos temporales de la actividad caspasa-3 para las diferentes concentraciones de enzima ensayadas (Figura 29).

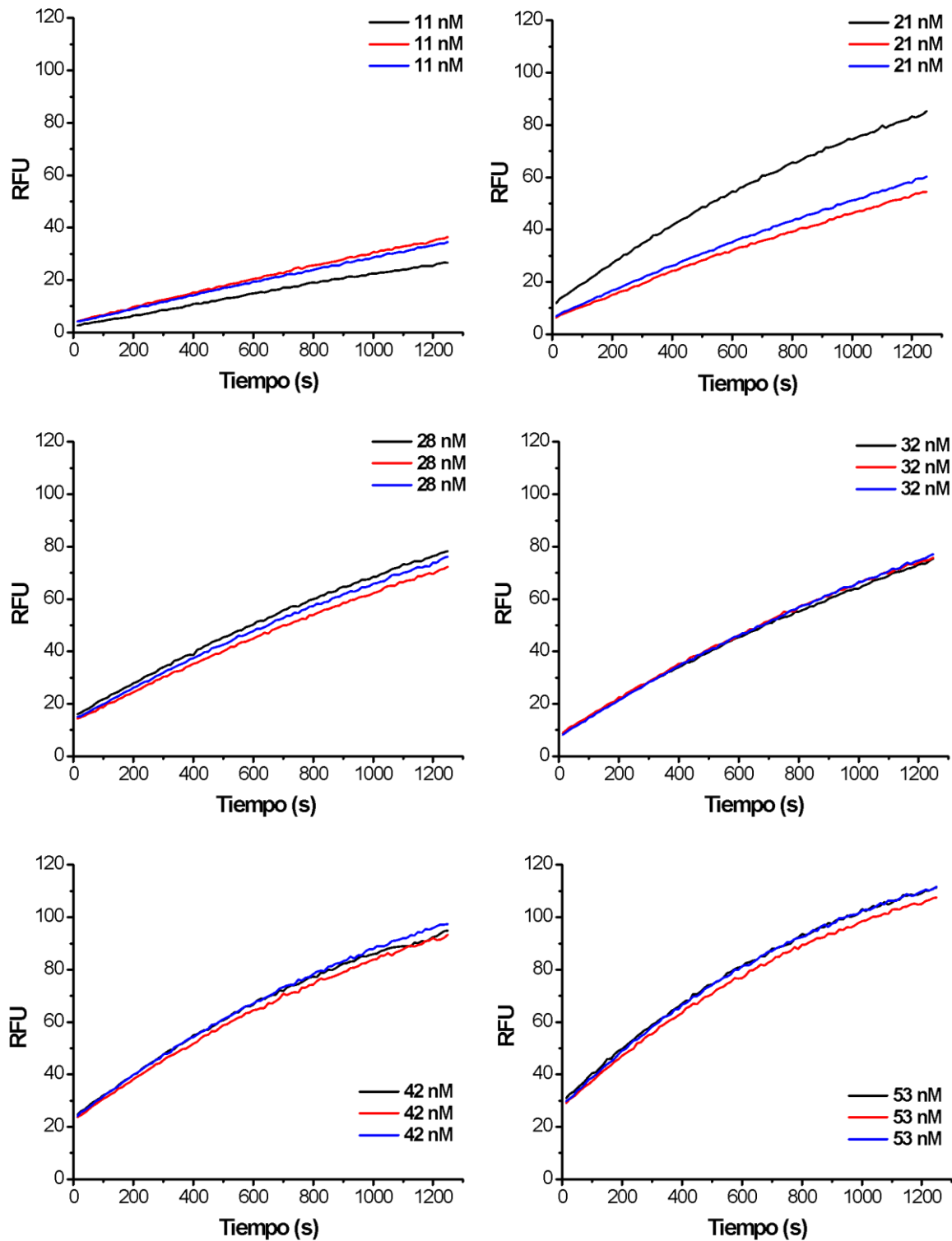


Figura 29. Cursos temporales de la actividad caspasa-3. Se ensayaron distintas concentraciones de enzima (11, 21, 28, 32, 42 y 53 nM) a una concentración fija de sustrato Ac-DEVD-AMC (6.6 μ M) por triplicado. Cada gráfico representa la medida de una única concentración ensayada por triplicado. (RFU, del inglés Relative Fluorescence Units).

Observando los gráficos de la actividad caspasa-3 se aprecia que a concentraciones de enzima mayores a 28 nM los cursos temporales tienden a curvarse pasados los 400 s, lo que indica que el sistema deja de estar en condiciones de velocidad inicial. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó una concentración 28 nM de caspasa-3 para realizar los ensayos posteriores de inhibición de la actividad enzimática.

Una vez obtenidas las pendientes de los gráficos de actividad caspasa-3 que se corresponden con la velocidad inicial de la reacción se realizó el gráfico de V_o vs. [Caspasa-3] (Figura 30). Aplicando la ecuación de Michaelis - Menten se evidencia que la velocidad inicial aumenta de manera lineal con la concentración de enzima a una concentración fija de sustrato, lo cual se correlaciona con lo esperado. Los resultados sugieren que no hay hidrólisis espontánea del sustrato, ya que en ausencia de enzima el valor de V_o es cercano a cero.

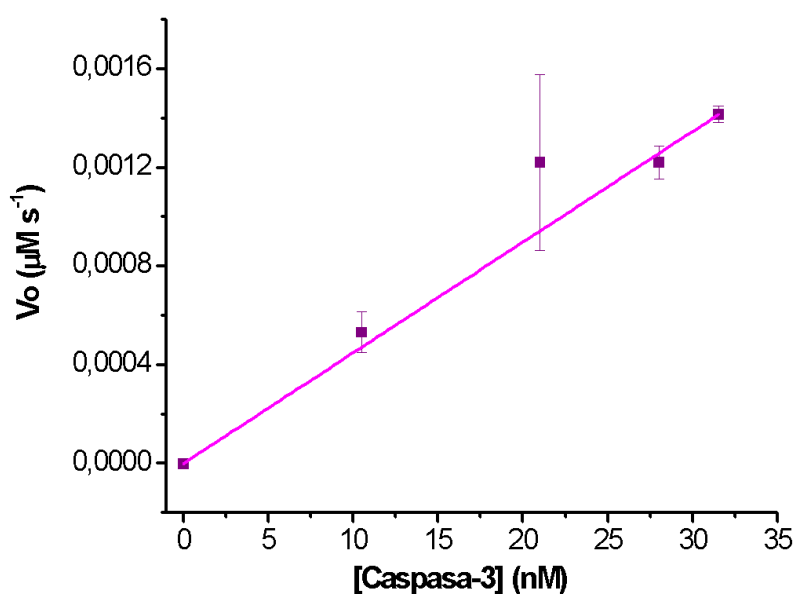


Figura 30. Efecto de la concentración de caspasa-3 sobre la velocidad inicial. Los puntos corresponden al promedio de los triplicados realizados con su correspondiente desviación estándar.

4.3.4. Determinación de parámetros cinéticos: K_M y V_{max} .

La constante de Michaelis Menten (K_M) es un parámetro cinético definido como la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima [209]. Para el objetivo de este trabajo que es evaluar la capacidad de inhibir la actividad enzimática de

compuestos con carácter potencialmente competitivo, es de gran importancia conocer la K_M y trabajar con una concentración de sustrato menor a este valor. Esto se debe a que si $[S]_i \gg K_M$, la velocidad será insensible a pequeñas diferencias de $[S]_i$, y por lo tanto no será posible detectar la inhibición de la actividad enzimática por parte de los compuestos. En cambio si $[S]_i \ll K_M$, la velocidad será muy sensible a cambios de $[S]_i$, permaneciendo siempre menor que V_{max} , y podremos evaluar el efecto de los compuestos en la actividad enzimática.

Para el cálculo de K_M y V_{max} de caspasa-3 y caspasa-7, se necesitó medir la velocidad inicial de la reacción a distintas concentraciones de sustrato específico Ac-DEVD-AMC (2.5; 5.0; 10.0; 25.0; 50.0 y 100.0 μM), utilizando una concentración constante y adecuada de enzima (28 nM).

Para esto se llevó a cabo una curva de calibración con soluciones de AMC de concentración conocida (Figura 31), con el propósito de correlacionar el valor de intensidad de fluorescencia con la concentración de producto formado necesario para el cálculo de la velocidad.

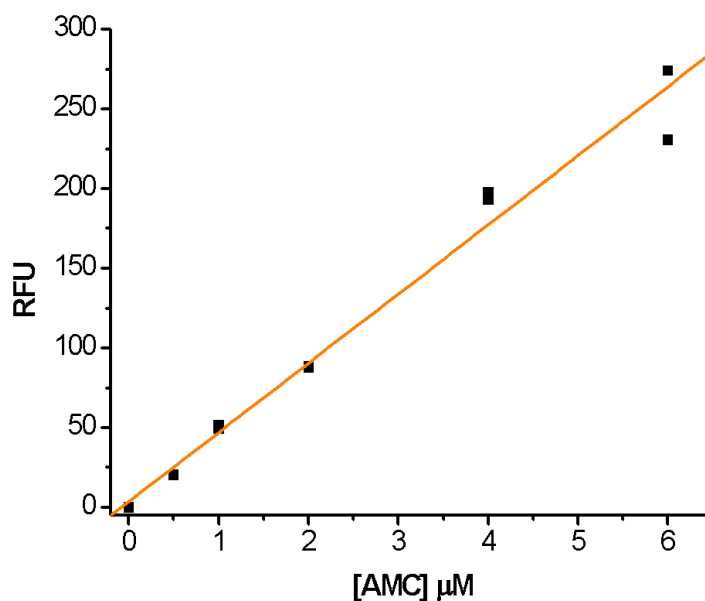


Figura 31. Curva de calibración de AMC. Las diluciones de AMC se realizan en buffer de actividad a una concentración final de (0.0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 y 6.0 μM). Su comportamiento responde a la ecuación de la recta: $\text{RFU} = 40.4 [\text{AMC}] - 1.28$. **RFU** (del inglés, Relative Fluorescence Units), **AMC** (7-amino-4-metilcumarina).

Una vez evaluada la cinética de la reacción de formación de producto (AMC) a distintas concentraciones de sustrato (Ac-DEVD-AMC) para ambas caspasas, y realizada la curva de

calibración de AMC, determinamos la velocidad de caspasa-3 y -7 a cada concentración de sustrato (Figura 32).

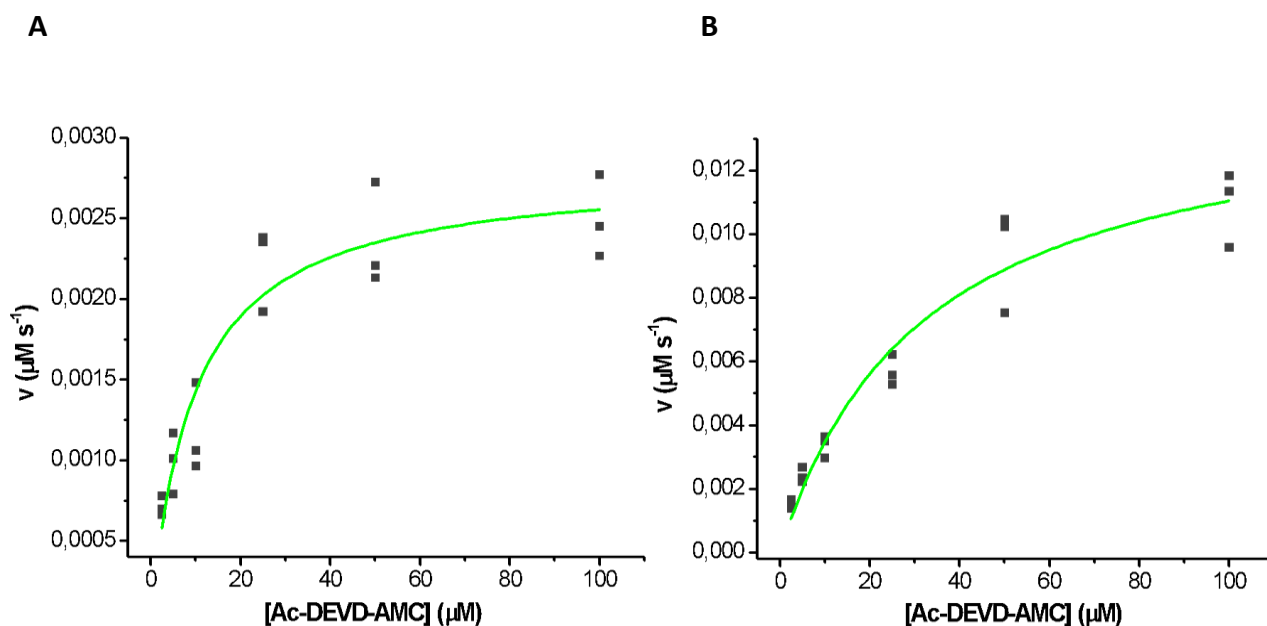


Figura 32. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción. Reacción catalizada por (A) caspasa-3 (B) caspasa-7. Se evalúa un rango de concentraciones de sustrato Ac-DEVD-AMC (2.5; 5.0; 10.0; 25.0; 50.0 y 100.0 μM) manteniendo la concentración de enzima fija (28 nM).

La curva hiperbólica que se observa en ambos gráficos nos confirma que ambas enzimas siguen una cinética Michaelis-Mendel (ecuación 2, Materiales y Métodos):

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ec. 2}$$

Ajustando la ecuación 2 con el programa Origin 8.5 se obtuvo para caspasa-3:

$$K_M = 10 \pm 2 \mu\text{M}$$

$$V_{max} = 0.0028 \pm 0.0002 \mu\text{M s}^{-1}$$

Y para caspasa-7:

$$K_M = 32 \pm 6 \mu\text{M}$$

$$V_{max} = 0.015 \pm 0.001 \mu\text{M s}^{-1}$$

Considerando que $V_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E_t]$, y que se utilizó una concentración 28 nM de enzima en ambos casos, se determinó para caspasa-3:

$$k_{\text{cat}} = 0.100 \pm 0.007 \text{ s}^{-1}$$

Y en el caso de caspasa-7:

$$k_{\text{cat}} = 0.530 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$$

Con el objetivo de confirmar los valores obtenidos de K_M y $V_{\max}$ y probar la ausencia de desviaciones de la cinética Michaeliana se realizó el diagrama de Hanes-Woolf, en donde se representa la relación $[S]/\text{velocidad de reacción}$ frente a la $[S]$ (Figura 33). Esta es una forma de linealizar la ecuación de Michaelis-Menden en donde la ecuación de la recta se define como:

$$[\text{Ac-DEVD-AMC}]/v = 1/V_{\max} [\text{Ac-DEVD-AMC}] + K_M/V_{\max} \quad \text{Ec.11}$$

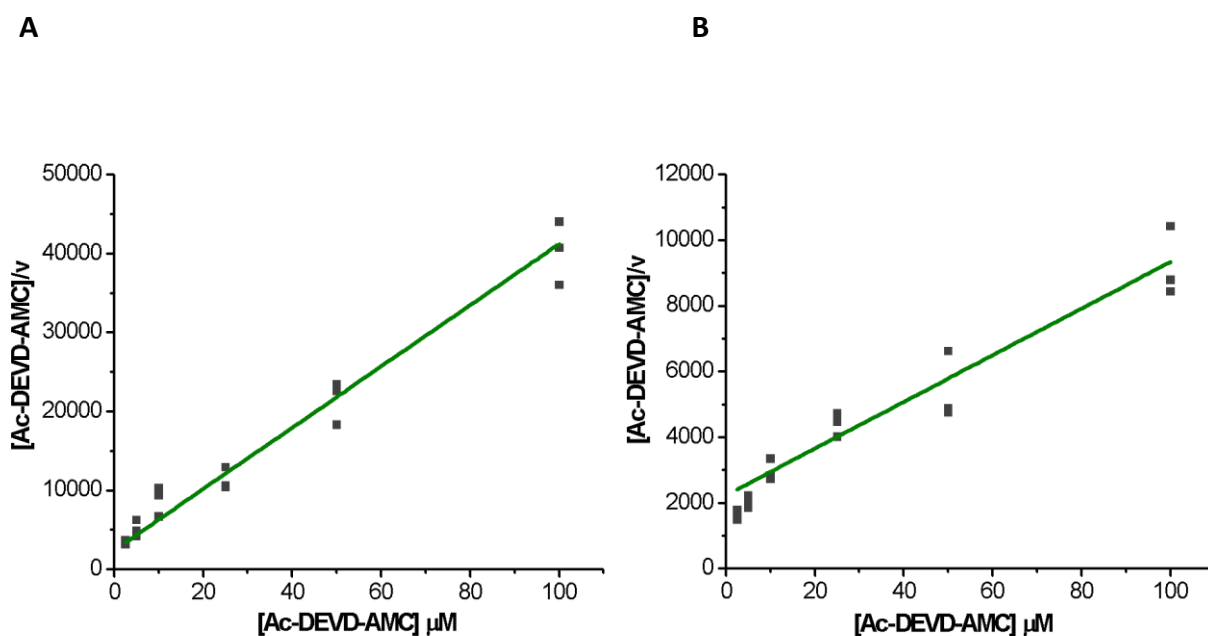


Figura 33. Gráfico de Hanes-Woolf para calcular el valor de K_M . (A) Caspasa-3, Se obtuvo una ecuación de la recta igual a $([\text{Ac-DEVD-AMC}]/v = 388 [\text{Ac-DEVD-AMC}] + 2443$ (B) Caspasa-7, se obtuvo una ecuación de la recta igual a $([\text{Ac-DEVD-AMC}]/v = 71 [\text{Ac-DEVD-AMC}] + 2238$.

El cálculo de los parámetros K_M y V_{max} utilizando la ecuación 5 son los siguientes para caspasa-3:

$$K_M = 6 \pm 4 \mu M$$

$$V_{max} = 0.0026 \pm 0.0009 \mu M s^{-1}$$

$$\text{Recalculando: } k_{cat} = 0.09 \pm 0.03 s^{-1}$$

Y para caspasa-7:

$$K_M = 31 \pm 9 \mu M$$

$$V_{max} = 0.014 \pm 0.002 \mu M s^{-1}$$

$$\text{Recalculando: } k_{cat} = 0.50 \pm 0.07 s^{-1}$$

Los valores de los parámetros cinéticos de ambas enzimas obtenidos a partir del gráfico de Hanes-Woolf se mantienen del orden de los obtenidos mediante el ajuste directo a la ecuación de Michaelis-Menten. Debido a la linealidad del gráfico se descarta la presencia de cooperativismo u otro tipo de desviaciones al comportamiento Michaeliano.

Los valores de K_M y k_{cat} reportados en la literatura son $K_M = 10 \mu M$ y k_{cat} varía entre $0.75 - 9.1 s^{-1}$ en caspasa-3, mientras que en caspasa-7 $K_M = 15 \mu M$ y $k_{cat} = 5.5 s^{-1}$ [209-211]. Estos valores son comparables con los obtenidos en los ensayos enzimáticos.

4.4. Ensayos de interferencia de los compuestos e inhibición de la actividad enzimática.

4.1.2. Efecto de apagamiento de la fluorescencia.

El efecto de apagamiento de la fluorescencia “*quenching*” es un fenómeno de desactivación, que conlleva a que el fluoróforo en el estado excitado “viva” poco tiempo, y emita menos energía de lo que debería. El mismo puede ser estático o dinámico (colisional) dependiendo de si forma complejos o es resultado de choques entre la molécula fluorescente y el *quencher*, respectivamente.

En este sentido, con el propósito de obtener los valores de inhibición de la actividad caspasa-3 y caspasa-7 de los derivados de nitrona y 1,3 tiazol corregidos por su capacidad de interferencia, se evaluó su capacidad de apagar la fluorescencia de emisión del producto de la reacción enzimática que catalizan caspasa-3 y -7, AMC; al mismo tiempo que se ensayó su capacidad

inhibitoria en dichas enzimas. Para cumplir con este objetivo se realizaron curvas de calibración de AMC en presencia de cada uno de los derivados, utilizando soluciones de concentración conocida de AMC (0.0; 0.5; 1.0; 2.0 y 4.0 μM) y una concentración 100 μM de los compuestos (Figura 34).

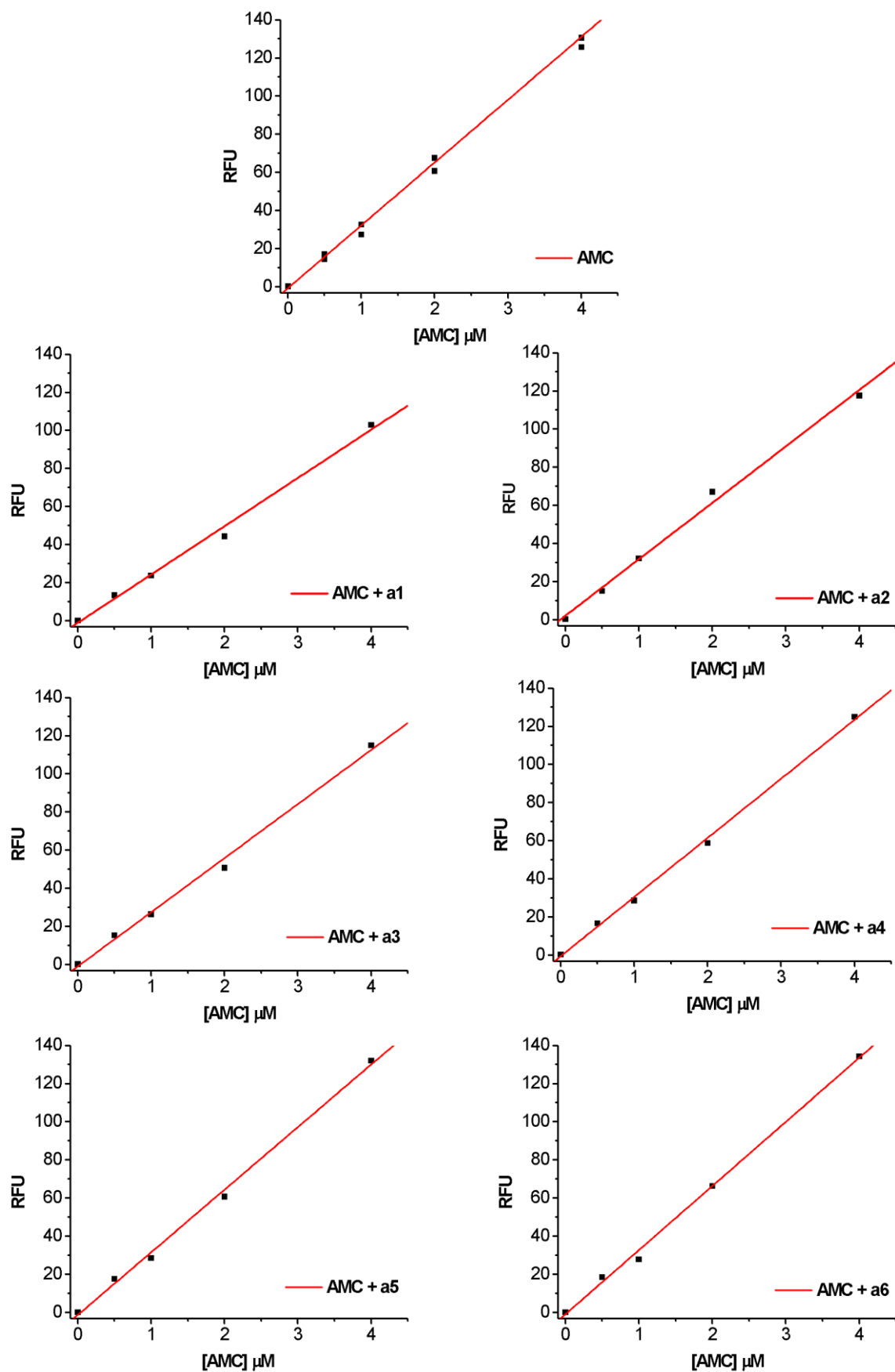


Figura 34. Curva de calibración de AMC en presencia y ausencia de los derivados nitrona y 1,3 tiazol. Las diluciones de AMC se realizan en buffer de actividad a una concentración final de (0.0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 μM). En ausencia de los derivados su comportamiento responde a la ecuación de la recta: $\text{RFU} = 32.9 [\text{AMC}] - 0.65$. **RFU** (del inglés, Relative Fluorescence Units), **AMC** (7-amino-4-metilcumarina).

El cálculo de velocidades a partir de las pendientes de los gráficos como se describe en la sección 3.4.1. de materiales y métodos demuestra que el compuesto **a1** que presenta el agrupamiento nitro en su estructura y en menor medida el compuesto **a3** que contiene un átomo de flúor en lugar del nitro, tienen un efecto de apagamiento “quenching” dinámico o estático en la emisión de fluorescencia de AMC del 22% y 12%, respectivamente. Estos aportes de interferencia por parte de los compuestos fueron tenidos en cuenta para el cálculo del porcentaje de inhibición de la actividad caspasa-3 y -7.

Por otro lado, los compuestos no mostraron poseer fluorescencia intrínseca a las longitudes de onda ensayadas.

4.4.2. Inhibición de la actividad enzimática.

Habiendo caracterizado las enzimas recombinantes caspasa-3 y -7, se procedió a ensayar la capacidad inhibitoria de los derivados a una concentración 100 μM .

Los resultados indicados en la figura 35 sugieren que los derivados sintetizados no presentan inhibición selectiva de caspasa-3. Respecto a la actividad inhibitoria, esta oscila entre 2 y 33% lo que nos permite afirmar que son inhibidores moderados a débiles de estas enzimas. Idealmente, para conocer más acerca del comportamiento inhibitorio de estos compuestos sería necesario evaluar un rango de concentraciones mayores a 100 μM y calcular la IC_{50} . Además, sería interesante evaluar los intermedios de síntesis en la inhibición enzimática ya que el aldehído por ejemplo podría ser un metabolito. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que los compuestos **a4** y **a6** presentaron los mayores porcentajes de inhibición sobre la enzima caspasa-3. Lamentablemente estos compuestos no fueron selectivos y también inhibieron la caspasa-7. Sin embargo, el compuesto **a1** a pesar de no ser el mejor inhibidor de la serie es el único que presenta mayor selectividad por caspasa-3. Este resultado interesante posiciona al compuesto **a1** como un posible líder para el futuro rediseño de compuestos inhibidores de caspasa-3.

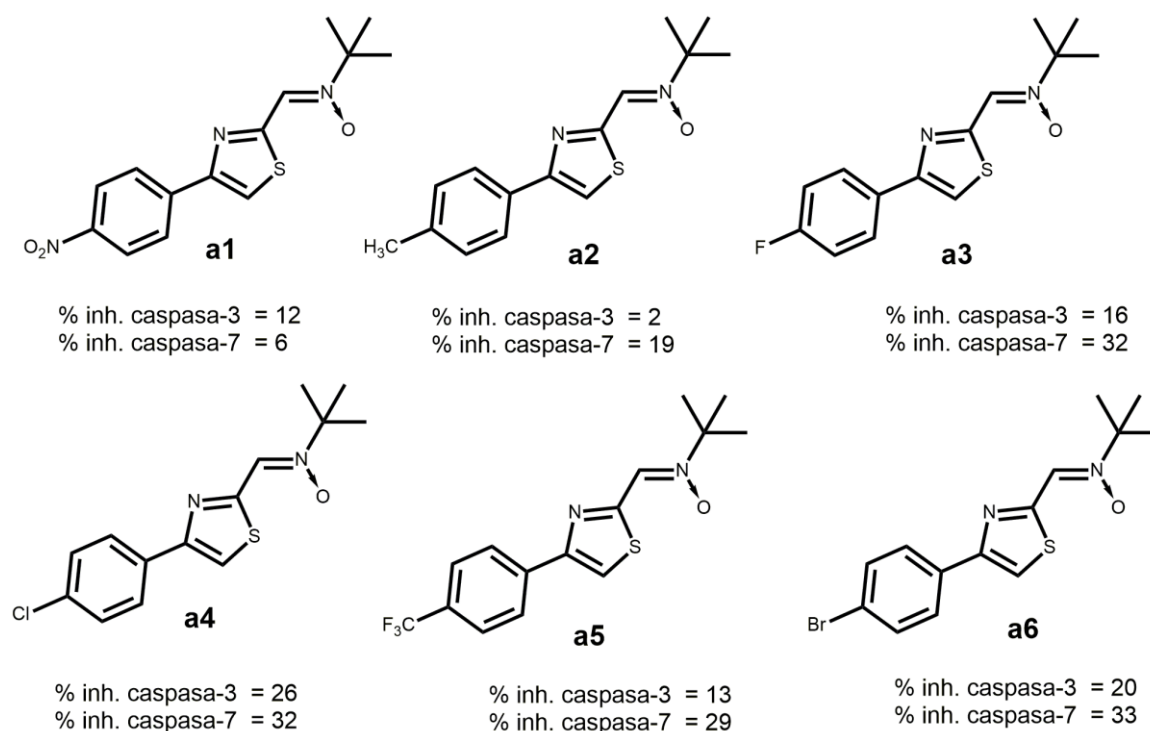


Figura 35. Valores preliminares de inhibición de la actividad enzimática de caspasa-3 y caspasa-7 de los derivados de nitrona y 1,3-tiazol. Los porcentajes de inhibición se obtuvieron del ensayo por triplicado y se calcularon según se indica en materiales y métodos, considerándose los valores de interferencia para los compuestos **a1** y **a3**. El desvío estándar fue menor al 1% en todos los casos.

Los bajos porcentajes de inhibición podrían deberse a la posible falta de pureza de las enzimas, para corroborarlo deberíamos realizar un paso más de purificación y volver a medir la actividad enzimática en presencia y ausencia de los compuestos, comparando los nuevos resultados con los aquí mostrados. Otra posible explicación podría ser que la caspasa-3 no se encontrara 100% activa y por ende la cantidad de enzima efectiva en el ensayo es menor a la de caspasa-7 utilizada, aunque la concentración de enzima en ambos casos *a priori* sea la misma.

También se podría pensar en una falta de solubilidad de los compuestos en el buffer de actividad enzimática. Criterio contemplado en la regla de 5 de Lipinski, la cual propone condiciones que debe cumplir una molécula con principio activo. Estas son: no debe contener más de cinco donadores de enlaces de hidrógeno, ni contener más de diez aceptores de enlaces de hidrógeno, debe poseer un peso molecular inferior a 500 y el coeficiente de partición en octanol/agua (LogP), debe ser inferior a 5. En este sentido se calcularon las 5 propiedades de la regla de

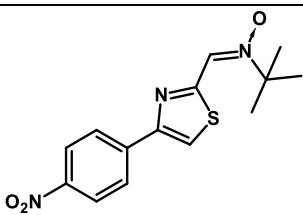
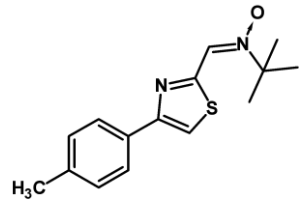
Lipinski para cada uno de los derivados mediante el uso del software de libre acceso que calcula propiedades moleculares Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>) a partir de bases de datos con valores empíricos de miles de moléculas orgánicas. Los resultados indican que ninguno de los derivados viola alguna de las 5 condiciones de la regla. El cálculo estimativo de los valores de LogP oscila entre 1.68 (**a1**) y 2.53 (**a6**). Además, se evaluó la solubilidad de los compuestos en la solución amortiguadora de trabajo, no observándose compuesto sin disolver o precipitado a 100 μM .

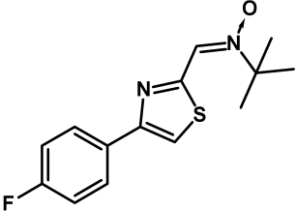
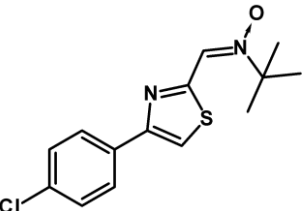
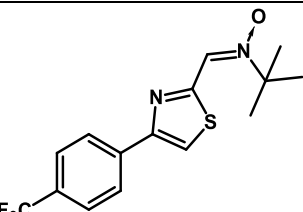
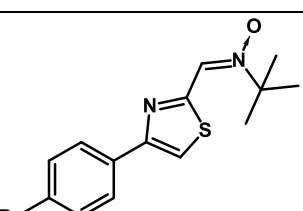
4.5. Estudios fisicoquímicos: *in vitro* e *in silico*.

4.5.1. Aproximación a la permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica (PAMPA).

Los valores de Papp obtenidos para los compuestos **a1**, **a2**, **a3** y **a5** (Tabla 1), fueron del orden del control positivo (verapamilo), lo que sugiere que los compuestos son capaces de atravesar este modelo que simula el pasaje a través de la barrera hematoencefálica. Los valores de Papp para los derivados **a4** y **a6** no fueron determinados debido a que no habían sido sintetizados al momento del ensayo, sin embargo su capacidad de trasvasar la BHE fue predicha usando el servidor Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) el cual determina que ambas nitronas serían permeables a la BHE. Su futura evaluación mediante el ensayo PAMPA se plantea en las perspectivas.

Tabla 1- Valores de Papp de los derivados de nitrona y 1-3 tiazol. (ND- no determinado).

Ref	Estructura	Papp ($\times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$)
a1		41.5
a2		23.4

a3		10.4
a4		ND
a5		16.8
a6		ND
Teofilina	Control negativo PAMPA	3.9
Verapamilo	Control positivo PAMPA	12.6

En concordancia con estos resultados, se realizó el cálculo *in silico* utilizando el software Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) del valor del área de superficie polar topológica (TPSA) de cada uno de los derivados. Esta propiedad se define como la suma de la superficie de todos los átomos polares que componen la molécula, principalmente oxígeno y nitrógeno, incluyendo también a los átomos de hidrógeno que tengan unidos. El valor de TPSA es comúnmente utilizado en química medicinal como una medida que permite optimizar la habilidad de una molécula de ser permeable a las células. Para moléculas que traspasan la barrera hematoencefálica este valor idealmente no debe superar los 90 Å.

El valor de TPSA estimativo para el derivado **a1** fue 87 Å y para los derivados **a2-a6** fue 41 Å, lo que se condice con los resultados experimentales.

Teniendo en cuenta los resultados del PAMPA, la predicción del servidor Swiss ADME y los valores de TPSA de los compuestos, así como también la similitud en la estructura, sería de

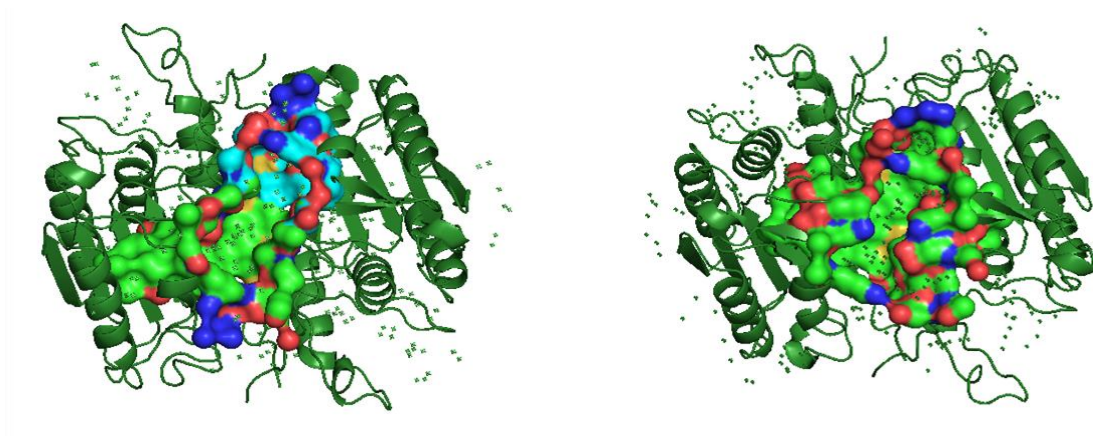
esperar que los derivados **a4** y **a6**, a los que no se les determinó el valor de Papp, también fueran capaces de atravesar la BHE.

4.6. Modelado molecular.

El descubrimiento de fármacos es un proceso complejo y costoso en el cual convergen diversas áreas del conocimiento. En años recientes métodos computacionales se han integrado a este esfuerzo multidisciplinario. A la fecha, los métodos computacionales han contribuido, entre otras aplicaciones, al análisis eficiente de datos, al filtrado de colecciones de compuestos para seleccionar moléculas para evaluación experimental, a la generación de hipótesis para ayudar a entender el mecanismo de acción de fármacos y al diseño de nuevas estructuras químicas. Además, los métodos *in silico* han tenido aportaciones significativas para desarrollar medicamentos que se encuentran en uso clínico [212].

4.6.1. Predicción de bolsillos de unión a ligando.

Como punto de partida para la búsqueda de posibles bolsillos de unión a los ligandos en caspasa-3 y caspasa-7 se utilizó el paquete de libre acceso Fpocket el cual permite estudiar los diferentes bolsillos de la proteína, analizando el carácter hidrófobo, el tamaño y volumen de los mismos, entre otros. Una vez realizada la búsqueda de *alpha* esferas se analizaron visualmente las estructuras para identificar los bolsillos conservados con mejor puntuación. Se observó que los bolsillos que tenían los mejores valores de puntuación y estaban presentes en las 17 estructuras en estudio, eran aquellos que pertenecían a la interfase en donde se encuentra el sitio alostérico de estas enzimas conformado por Arg132/132', Tyr153/153' y Por157/157' de cada uno de los heterodímeros. Sin embargo, los bolsillos en esta región pueden estar representados por una o dos cavidades dependiendo de la estructura cristalográfica en cuestión. A continuación, se muestran los bolsillos con mejor puntuación de las estructuras cristalográficas de caspasa-3 y caspasa-7 que fueron utilizadas en los estudios posteriores (Figura 36).



Caspasa-3	Puntuación del bolsillo	Puntuación hidrofóbica	Puntuación del volumen	Volumen real
Bolsillo 1	38.89	18.48	3.87	4659.52
Bolsillo 2	28.60	15.38	3.90	3093.11
Caspasa-7	Puntuación del bolsillo	Puntuación hidrofóbica	Puntuación del volumen	Volumen real
Bolsillo 1	52.46	19.01	3.98	7705.46

Figura 36. Mejores cavidades encontradas en caspasa-3 (PDB ID: 1RHM, izquierda) y caspasa-7 (PDB ID: 3IBF, derecha), parámetros sin unidades [180].

El bolsillo 1 de caspasa-3 se encuentra formado por Leu136, Glu135, Arg132, Gly93, Glu92, de la cadena A, Val222, Cys220, Tyr159, Gly158, Pro157, Ala156, Tyr153 de la cadena B, Arg132', Ile128', Ile127', Phe126', Arg115', Arg114', Asn109', Thr108', Ile107', Lys105', Leu104', Asp103', Ile94', Gly93', Glu90', Leu86', Cys84', Met68', Ile64', Ile18' de la cadena C, Met224', Val222', Cys220', Pro157', Tyr153', Tyr151', Glu146' de la cadena D. El bolsillo 2 de caspasa-3 se conforma por Arg269, Arg112, Asn109, Thr108, Lys105, Leu104, Asp103, Gly93, Glu90 de la cadena A, Met224, Val222, Tyr153, Tyr151, Phe149, Glu146 de la cadena B, Glu135', Glu90' de la cadena C, Tyr159', Gly158', Pro157', Ala156' de la cadena D. El bolsillo 1 presenta un mayor número de residuos pertenecientes a la cadena C, mientras que el bolsillo 2 se conforma de los mismos

residuos en el otro heterodímero. Estos dos bolsillos son complementarios y se pueden interpretar como un único bolsillo.

El bolsillo 1 de caspasa-7 se encuentra formado por Glu135, Arg132, Cys131, Ala130, Ile128, Thr108, Lys105, Ile104, Pro103, Ile95, Val94, Asn93, Glu92, Glu91, Leu86 de la cadena A, Met224, Val222, Cys220, Tyr159, Pro157, Val156, Thr155, Ser154, Tyr153, Phe151, Glu146 de la cadena B, Glu135', Thr134', Gly133', Arg132', Cys131', Ala130', Ile128', Arg115', Arg112', Ala109', Thr108', Asp106', Lys105', Ile104', Pro103', Ile95', Val94', Asn93', Glu92', Glu91', Leu87' de la cadena C, Met224', Val222', Cys220', Tyr159', Gly158', Pro157', Val156', Thr155', Ser154', Tyr153', Phe151', Phe149', Glu146' de la cadena D.

Los resultados demuestran que los bolsillos conservados entre las diferentes estructuras cristalográficas con propiedades más *drogables* son el bolsillo 1 y 2 en caspasa-3 y el bolsillo 1 en caspasa-7. Estos bolsillos tienen carácter hidrofóbico, son similares entre sí, y se componen de residuos pertenecientes a ambos heterodímeros incluidos los del sitio alostérico.

4.6.2. Hotspots.

Con el objetivo de obtener mayor información de los bolsillos de unión a ligandos de estas dianas utilizamos el *software* Fragment Hotspot Maps, el cual identifica la localización y calidad de los sitios de unión a ligando en proteínas. Muestrea átomos como “puntos calientes” mediante el uso de moléculas simples de prueba y genera un mapa de fragmentos de “puntos calientes” en la proteína. Los resultados nos permiten analizar de manera visual las regiones, zonas o residuos susceptibles de interaccionar con fragmentos orgánicos del sitio detectado por Fpocket que podrían estar participando en la unión con el ligando (Figura 37). Estos son aceptores/dadores de enlace de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas del tipo apolar o aromáticas que nos guían acerca de la naturaleza de la unión del ligando. En particular nos centrarnos en los resultados de hotspot en la región del bolsillo detectado por Fpocket. El bolsillo que se muestra en la figura 37 presenta un alto carácter hidrofóbico con algunos residuos con cadenas laterales polares capaces de generar interacciones del tipo enlace de hidrógeno y electrostáticas.

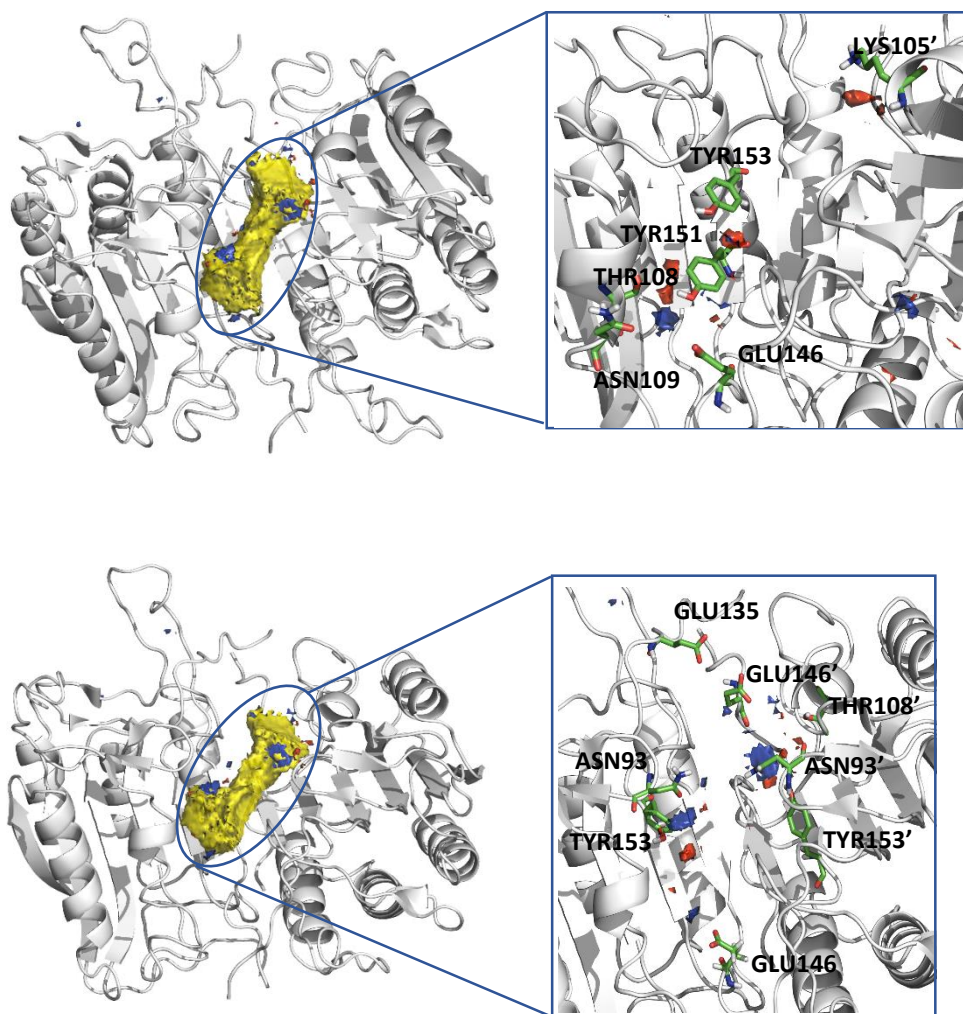


Figura 37. Representación de *hotspots* calculados usando el *software* Fragment Hotspot Maps. En amarillo se indica el área no polar donde el ligando puede unirse mediante interacciones de tipo hidrofóbicas. En azul se representa el área donde el ligando puede actuar como dador de enlaces de hidrógeno y en rojo el área donde puede actuar como aceptor de enlaces de hidrógeno. Se muestra caspasa-3 (código PDB 1RHM, arriba) y caspasa-7 (código PDB 3IBF, abajo).

Este estudio demuestra que para el bolsillo hidrofóbico detectado en caspasa-3 los residuos Thr108 y Asn109 que forman parte de la cadena A, Tyr151 y Tyr153 pertenecientes a la cadena B de uno de los heterodimeros, y la Lys105' de la cadena C del otro heterodímero, pueden actuar como dadores de enlaces de hidrógeno, mientras que Glu146 de la cadena B puede actuar como aceptor de enlace de hidrógeno. Por otro lado, el residuo Pro157' perteneciente a la cadena D y que forma parte del sitio alostérico puede actuar generando interacciones de tipo hidrofóbicas.

En el bolsillo hidrofóbico encontrado en caspasa-7 los residuos Thr108' de la cadena C de uno de los heterodímeros y Tyr153/153' perteneciente al sitio alostérico de ambos heterodímeros pueden actuar como dadores de enlace de hidrógeno. Los residuos Asn93/93', Glu146/146' de ambos heterodímeros, y Glu135 perteneciente a la cadena A, pueden actuar como aceptores de enlace de hidrógeno. Además, el residuo Pro157' de la cadena D puede actuar generando interacciones de tipo hidrofóbicas.

Los resultados aquí presentados del cálculo de las regiones más probables de interacción con ligandos muestran que los sitios con mejor puntuación encontrados por Fpocket son los bolsillos más susceptibles de unión por ligandos.

4.6.3. Simulaciones de dinámica molecular.

Para la realización de la dinámica molecular se llevó a cabo el *docking* molecular en ambas enzimas y se seleccionaron las poses de los ligandos que presentaban una menor energía de unión y un mayor número de conformaciones, considerando además la participación de al menos alguno de los residuos propuestos para la interacción con el ligando por el cálculo de *Hotspots*. Estos complejos ligando-proteína fueron tomados como punto de partida para las posteriores simulaciones. A continuación, se llevaron a cabo 100 ns de simulaciones de dinámica molecular (MD) convencional y acelerada usando el programa AMBER14 con el objetivo de analizar la estabilidad de estos compuestos en los bolsillos de unión.

Con el propósito de asegurarnos de la convergencia de las dinámicas en el tiempo de simulación y evaluar la estabilidad de los complejos se realizó el RMSD (del inglés *root-mean-square deviation*) correspondiente a la posición de los átomos del backbone CA, C, N, de las apo-enzimas y de cada uno de los complejos en caspasa-3 y caspasa-7 (Figura 38).

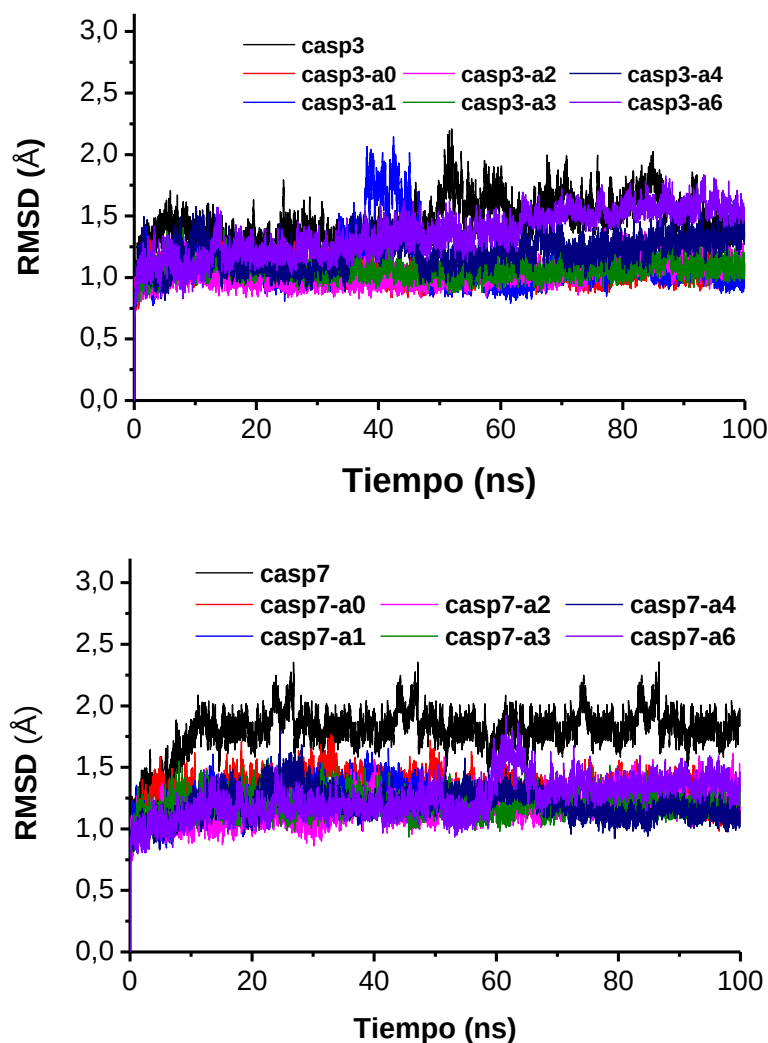


Figura 38. Evolución temporal del RMSD del backbone de caspasa-3 (arriba) y caspasa-7 (abajo) en presencia y ausencia de ligandos (**a0,a1,a2,a3,a4,a6**) a lo largo de 100 ns de simulación de dinámica molecular.

Los gráficos de RMSD muestran que el movimiento de los átomos del esqueleto aminoacídico a lo largo de la simulación es mínimo, encontrándose en el entorno de los 1.5 Å, estando en la cota superior caspasa-7 sin presencia de ligando. Los sistemas en estudio convergen luego de los 10-20 ns de simulación, lo que sugiere que la unión de los ligandos no afecta la estabilización de los complejos.

La región estabilizada de la trayectoria de la dinámica molecular, determinada a partir del cálculo del RMSD, se utilizó para realizar el análisis de la movilidad de las cadenas laterales de

cada residuo proteico en la simulación, determinando el RMSF (del inglés *root-mean-square fluctuation*) (Figura 39).

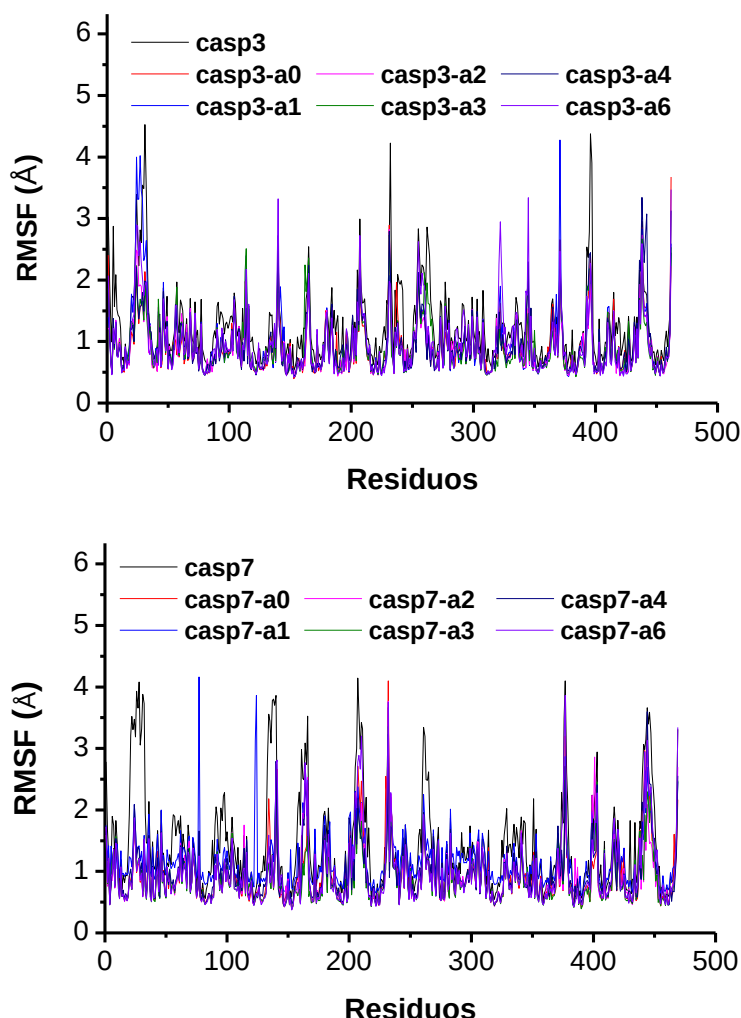


Figura 39. RMSF de las cadenas laterales de residuos de caspasa-3 (arriba) y caspasa-7 (abajo) en presencia y ausencia de ligandos (a0,a1,a2,a3,a4,a6) a lo largo de 100 ns de simulación de dinámica molecular.

La fluctuación de las cadenas laterales de los residuos Phe254-Val268 pertenecientes al *loop1*, Trp393-Asp398 del *loop3* y Ser205 del *loop4* en caspasa-3 se ve significativamente disminuida por la unión de los ligandos en la interfase en la región del sitio alostérico, mientras que en caspasa-7 solo se observa una disminución significativa de la movilidad en el *loop1*. Teniendo en cuenta que la flexibilidad de los *loops* que conforman el sitio activo es importante para la catálisis, y que el *loop3* forma la base del bolsillo de unión a ligando, este comportamiento diferencial de las enzimas en solución en presencia y ausencia de ligando podría afectar la formación de este bolsillo y, por ende, el correcto reconocimiento molecular del sustrato.

Para poder comparar las estructuras de las enzimas en ausencia y presencia de ligandos se realizó un análisis de componentes principales de cada una de las simulaciones para la proteína, el ligando y el complejo enzima-ligando. Se graficó la proyección de la trayectoria sobre los vectores propios 1 y 2 que dan cuenta de la mayor varianza y se graficaron en forma de “heat map” (ver material suplementario), a partir de dónde se seleccionó en cada sistema un *cluster* conteniendo el mayor número posible de conformaciones y, por ende, las estructuras más representativas. Estos resultados apuntan a que los mejores complejos obtenidos son en los que los ligandos se unen en la zona de la interfase de caspasa-3 y caspasa-7 donde se encuentra el bolsillo alostérico. A modo de ejemplo se muestran las estructuras más representativas luego de 100ns de dinámica molecular de los complejos con los ligandos **a0** y **a1** en caspasa-3 y caspasa-7 (Figura 40).

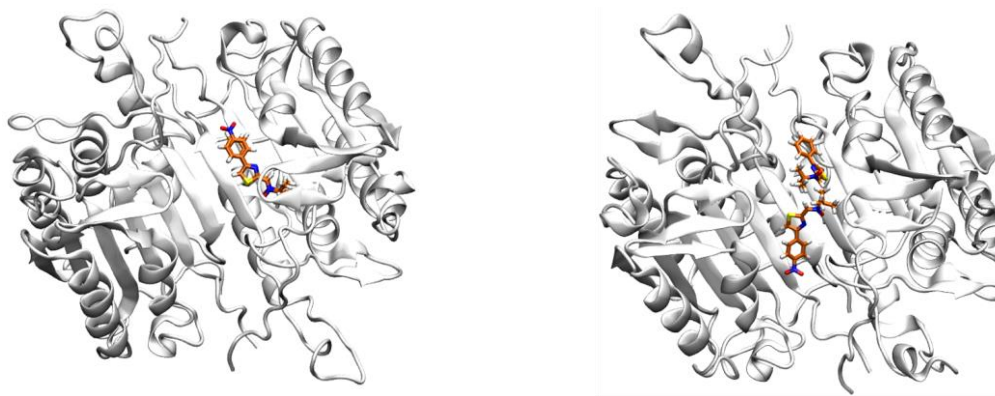


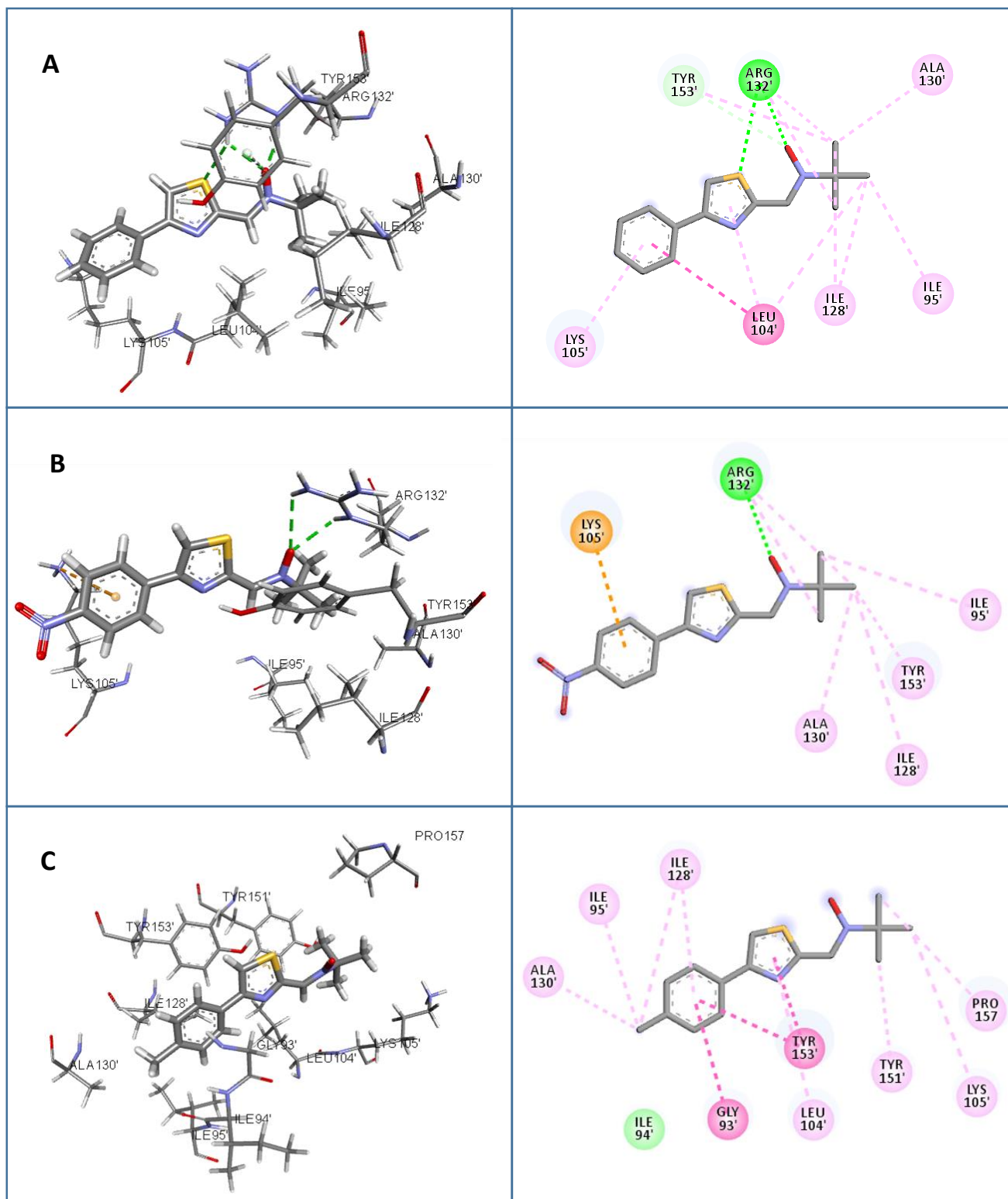
Figura 40. Solapamiento de estructuras representativas de los complejos caspasa-3-**a0** y caspasa-3-**a1** (izquierda) y caspasa-7-**a0** y caspasa-7-**a1** (derecha) luego de 100ns de dinámica molecular clásica.

Si bien el bolsillo de unión es prácticamente idéntico en ambas enzimas el modo de unión de los ligandos es diferente entre caspasas. La pose predicha por docking de los ligandos en caspasa-3 se mantiene a lo largo de la dinámica mientras que en caspasa-7 tienden a alternarse entre dos conformaciones y esto se refleja en el RMSD de los ligandos.

Los resultados nos permiten explicar un posible mecanismo de acción de los compuestos mediante el análisis de los residuos responsables de la interacción y los posibles cambios en la estructura de la enzima en cuestión.

Los resultados de la dinámica molecular en caspasa-3 muestran que el ligando **a0** interacciona con residuos Ile95', Leu104', Lys105', Ile128', Ala130' mediante interacciones hidrofóbicas y forma enlaces de hidrógeno con Arg132' y Tyr 153' ambos residuos pertenecientes al sitio

alostérico (Figura 41.A). El ligando **a1** interacciona con residuos Ile95', Lys105', Ile128', Ala130', Tyr153' mediante interacciones hidrofóbicas y forma enlaces de hidrógeno con Arg132' del sitio alostérico (Figura 41.B). El ligando **a2** interacciona con residuos Gly93', Ile94', Ile95', Leu104', Lys105', Ile128', Ala130', Tyr151', Tyr153' y Pro157 mediante interacciones hidrofóbicas (Figura 41.C). El ligando **a3** interacciona con residuos Ile95', Leu104', Lys105', Arg132', Tyr151', Tyr153' mediante interacciones hidrofóbicas y forma enlaces de hidrógeno con Gly93'. (Figura 41.D). El ligando **a4** interacciona con residuos Gly90', Glu91', Glu92', Leu104', Ile128', Ala130', Tyr151', Tyr153' y Pro157 mediante interacciones hidrofóbicas y forma enlaces de hidrógeno con residuos Gly93' y Lys105' (Figura 41.E). El ligando **a6** interacciona con residuos Ile94', Leu104', Lys105', Ala130', Arg132', Tyr151', Tyr153' y Pro157 mediante interacciones hidrofóbicas y forma enlace de hidrógeno con Gly93' (Figura 41.F).



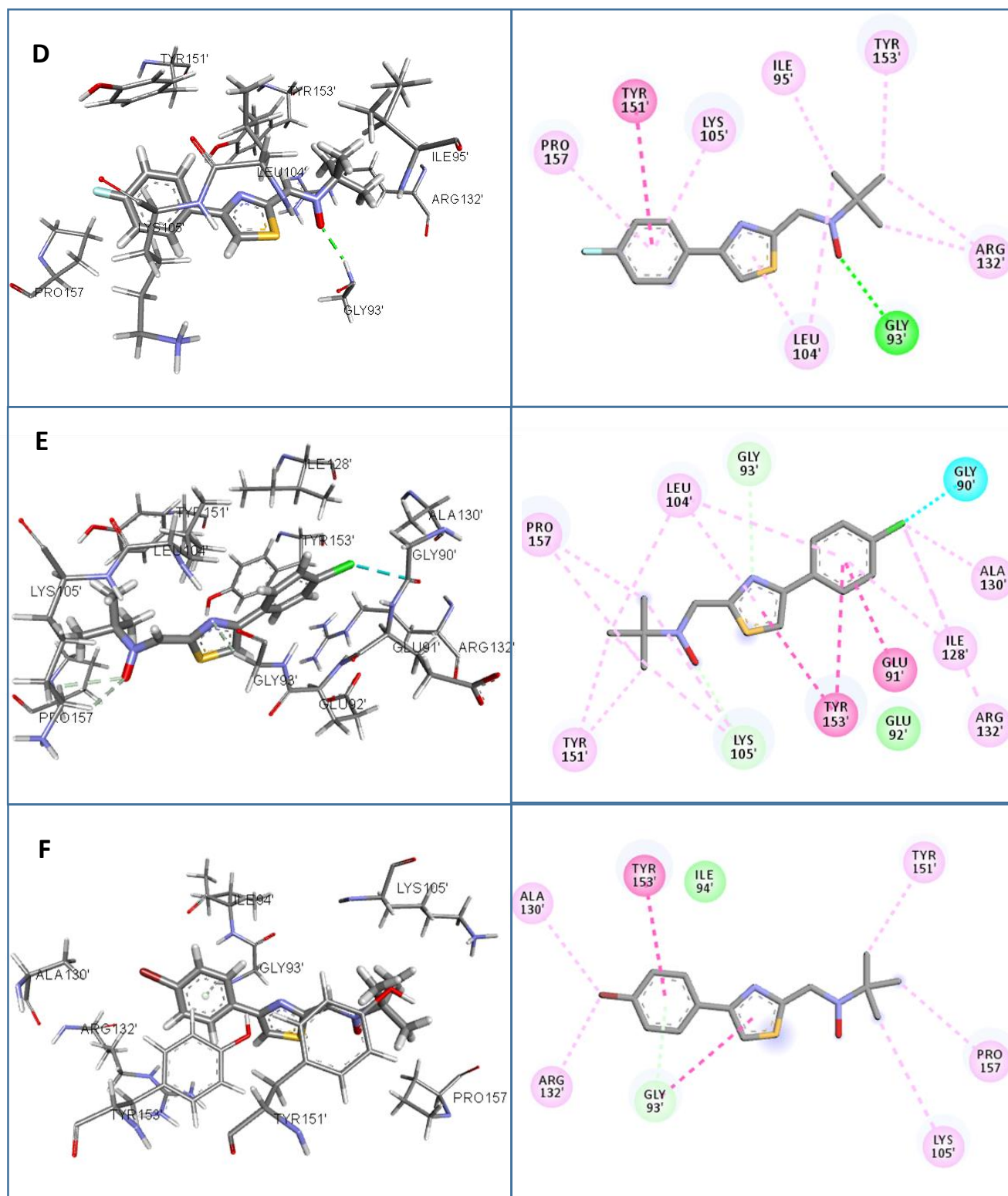
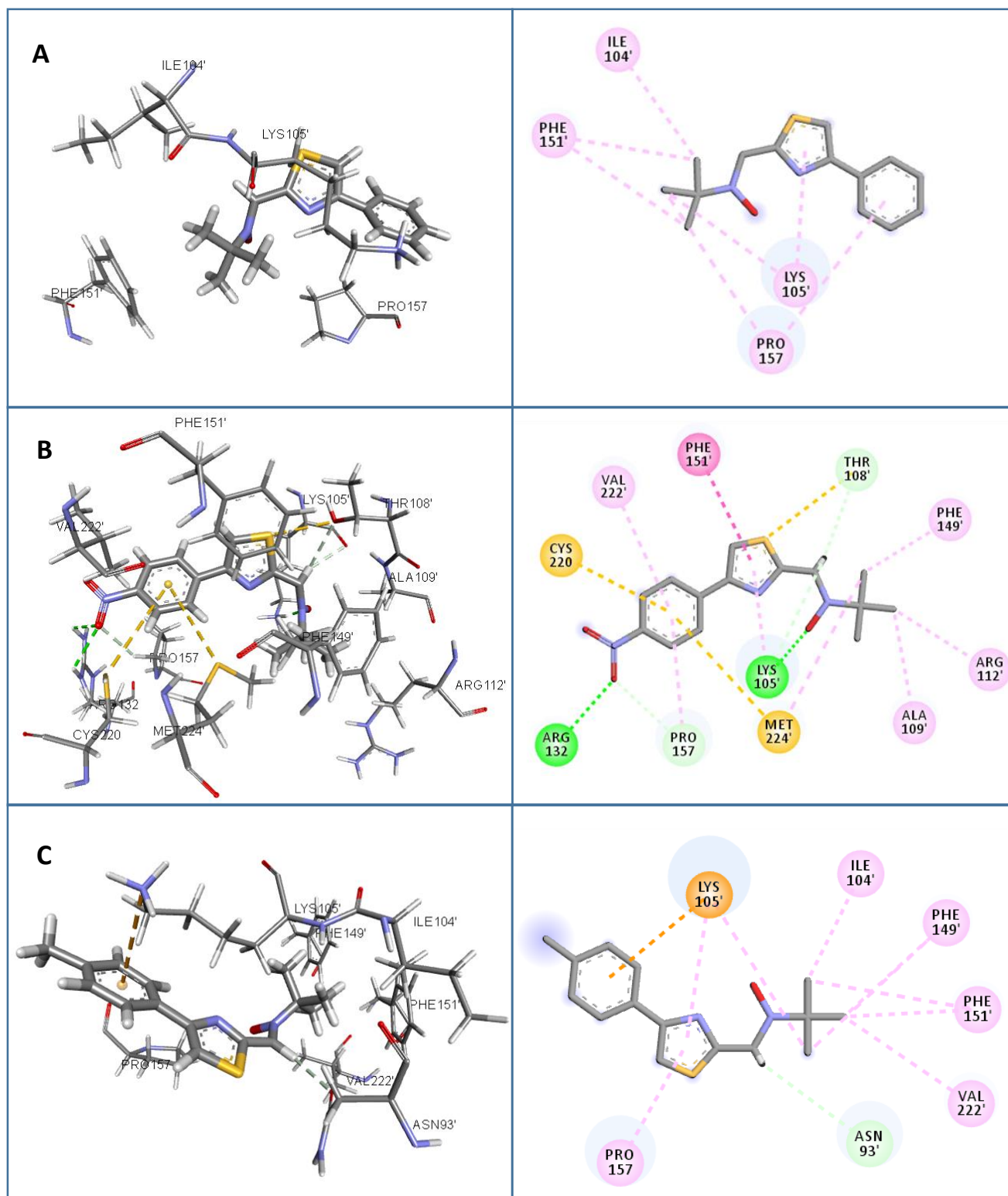


Figura 41. Diagrama de estructuras 3D (izquierda) y 2D (derecha) de las interacciones del ligando con residuos de caspasa-3 de estructuras representativas de los complejos luego de 100ns de dinámica molecular. (A) caspasa-3-a0, (B) caspasa-3-a1, (C) caspasa-3-a2, (D) caspasa-3-a3, (E) caspasa-3-a4, (F) caspasa-3-a6. En línea punteada interacciones del ligando con la proteína, en rosa Pi-Alquil y Alquil, en

fucsia Pi-Pi y Amida-Pi, en cian halógeno, en verde agua van der Waals, en verde y celeste enlaces de hidrógeno. En sombreado superficies accesibles al solvente.

Los resultados de la dinámica molecular en caspasa-7 muestran que el ligando **a0** contacta con residuos Ile104', Lys105', Phe 151' y Pro 157 mediante interacciones de tipo hidrofóbicas (Figura 42.A). El ligando **a1** en caspasa-7 forma enlaces de hidrógeno con residuos Lys105', Thr108', Arg132 y Pro 157 y contacta con residuos, Ala109', Arg112', Phe149', Phe 151', Cys220, Val222', Met224' mediante interacciones de tipo hidrofóbicas (Figura 42.B). El ligando **a2** se une a caspasa-7 contactando con residuos Ile104', Lys105', Phe149', Phe 151', Pro 157, Val222' mediante interacciones de tipo hidrofóbicas y formando enlace de hidrógeno con Asn93' (Figura 42.C). El ligando **a3** se une a caspasa-7 contactando con residuos Lys105', Phe151' y Val222' mediante interacciones de tipo hidrofóbicas (Figura 42.D). El ligando **a4** se une a caspasa-7 contactando con residuos Pro103, Lys105, Phe151, Phe157', Val222 mediante interacciones de tipo hidrofóbicas (Figura 42.E). El ligando **a6** se une a caspasa-7 contactando con residuos val94', Pro103', Ile104', Phe151', Phe157 mediante interacciones de tipo hidrofóbicas y formando enlace de hidrógeno con Lys105' (Figura 42.F).



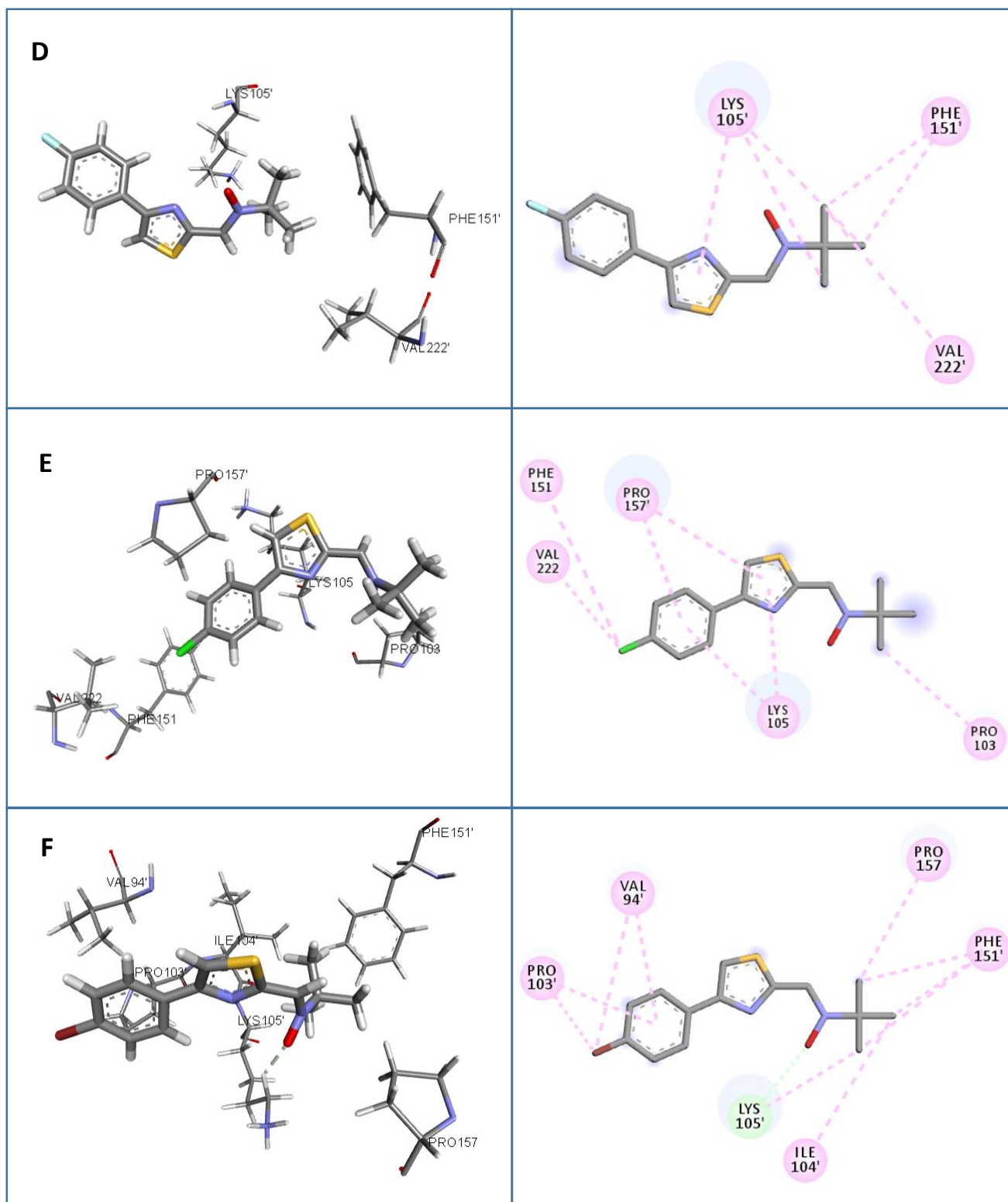


Figura 42. Diagrama de estructuras 3D (izquierda) y 2D (derecha) de las interacciones del ligando con residuos de caspasa-7 de estructuras representativas de los complejos luego de 100ns de dinámica molecular. (A) caspasa-7-a0, (B) caspasa-7-a1, (C) caspasa-7-a2, (D) caspasa-7-a3, (E) caspasa-7-a4, (F) caspasa-7-a6. En línea punteada interacciones del ligando con la proteína, en rosa Pi-Alquil y Alquil, en

fucsia Pi-Pi y Amida-Pi, en amarillo Pi-Azufre y Azufre-X, en verde agua van der Waals, en verde y celeste enlaces de hidrógeno. En sombreado superficies accesibles al solvente.

Es interesante resaltar que a excepción del compuesto **a2** todos los ligandos en caspasa-3 forman uno o dos enlaces de hidrógeno mediante la función nitrona y/o el anillo tiazol del ligando, y la Arg132' alostérica o Lys105' y Gly93' como lo hace el ligando **a4**. Cabe destacar que el residuo Gly93' de caspasa-3 es Asn93' en caspasa-7, y los resultados muestran que éste no forma enlaces de hidrógeno con ninguno de los ligandos. Las interacciones Pi-Pi entre Tyr153' alostérica y el fenilo y/o tiazol de los ligandos **a3**, **a4** y **a6** en caspasa-3 compromete las interacciones de apilamiento entre este residuo y la Arg132' y Pro157'. Esto podría contribuir a que la enzima estuviese en un estado inactivo, cosa que no sucede cuando los ligandos se unen a caspasa-7. Más aún, los ligandos interaccionan en mayor medida con los residuos alostéricos cuando están unidos a caspasa-3 y no a caspasa-7.

La disminución en la movilidad de los residuos de los *loops* en caspasa-3, así como también la interacción de los ligandos con residuos alostéricos, podrían explicar los resultados experimentales de inhibición de apoptosis y actividad enzimática.

De esta manera el ligando **a4** que mostró tener la mejor actividad biológica en los ensayos experimentales, es el compuesto que contacta con un mayor número de residuos en caspasa-3, tiene una energía de unión de -25.8 Kcal/mol y es el único que muestra una interacción con su sustituyente halógeno, cloro en este caso. A diferencia de que en caspasa-7 contacta con un menor número de residuos únicamente mediante interacciones hidrofóbicas, lo que sugiere cierta selectividad de este compuesto por caspasa-3, aunque en los estudios enzimáticos no mostró ser selectivo.

Comparando los resultados del modo de unión de los ligandos en caspasa-3 y en caspasa-7 podemos afirmar que los mismos se posicionan más internamente en el bolsillo alostérico de caspasa-3, interaccionando con un mayor número de residuos de la proteína, mientras que en caspasa-7 se encuentran más expuestos al solvente, lo que sugiere una mayor afinidad de estos ligandos por caspasa-3. En suma, los resultados sugieren que los compuestos presentan una selectividad parcial por caspasa-3, ya que la unión de los ligandos a esta enzima se encuentra más estabilizada por los motivos anteriormente descritos.

5. Conclusiones

Se lograron sintetizar exitosamente seis nuevos derivados híbridos que combinan en su estructura los agrupamientos nitrona y el heterociclo 1,3-tiazol con potencial actividad antioxidante, antiapoptótica e inhibitoria de caspasa-3-activa. Los derivados se obtuvieron con muy buenos rendimientos globales y fueron caracterizados espectroscópicamente mediante técnicas de ^1H , ^{13}C RMN y espectrometría de masas.

La actividad biológica de los nuevos derivados sintetizados fue evaluada en un modelo neuronal *in vitro* en donde mostraron no ser citotóxicos a concentraciones menores que $25\ \mu\text{M}$, excelentes agentes antioxidantes y potentes inhibidores de la apoptosis. El derivado **a6** presentó la mejor actividad antioxidante, mientras que el derivado **a5** mostró mejor actividad antiapoptótica.

Además, se logró producir las enzimas recombinantes caspasa-3 y caspasa-7 y evaluar la inhibición de la actividad enzimática por nitronas derivadas de 1,3-tiazol donde los resultados indican que los compuestos inhiben parcialmente la actividad caspasa-3 y -7 sin mostrar selectividad por caspasa-3. En este estudio se destacaron los derivados **a4** y **a6** que inhibieron la caspasa-3 en un 26% y 20% respectivamente.

Los derivados **a1**, **a2**, **a3** y **a5** son permeables a la membrana que simula la barrera hematoencefálica según resultados del ensayo *in vitro* PAMPA y predicciones *in silico* de permeabilidad a la BHE realizadas, lo cual es interesante a tener en cuenta para alcanzar el blanco de acción a nivel del sistema nervioso central.

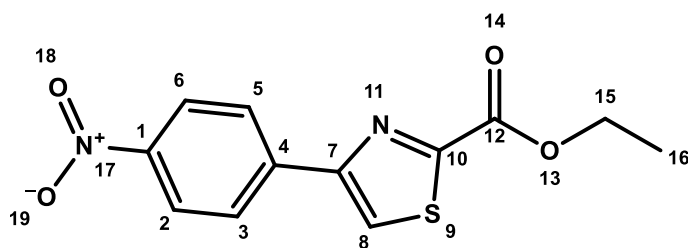
Los estudios teóricos nos permiten plantear que estos derivados se unen en la interfase del heterodímero e interaccionan con residuos del sitio alostérico de las capasas-3 y -7 que son claves para mantener la conformación activa de la enzima y, por ende, la catálisis enzimática.

Teniendo en cuenta todos estos resultados podemos afirmar que los compuestos **a4** y **a6** son los que presentan una mejor actividad neuroprotectora y **a1** el que muestra ser selectivo por caspasa-3 y, por ende, los indicados a ser seleccionados para profundizar en su mecanismo de acción, así como también para el rediseño de futuros compuestos como potenciales fármacos para la EA y otras enfermedades neurodegenerativas.

6. Perspectivas

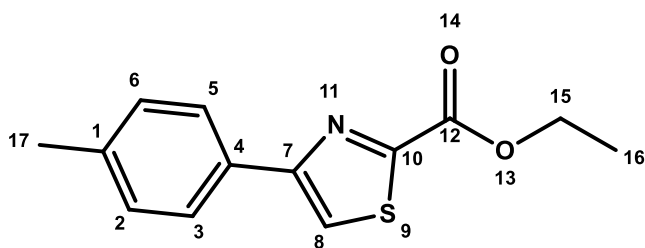
- Completar espectros de RMN de intermedios de síntesis, realizar masa de nitrona **a5** e intermedios de síntesis, determinar estereoquímica de las nitronas mediante Efecto Nuclear Overhauser Diferencial (NOE-Diff).
- Realizar una nueva producción de caspasa-3 y -7 recombinantes adicionando un paso de purificación respecto al protocolo utilizado y reevaluar los compuestos a la concentración evaluada y realizar una curva dosis-respuesta.
- Secuenciar las enzimas recombinantes para confirmar que la secuencia proteica en los cristales utilizados en los ensayos teóricos es la misma.
- Evaluar la inhibición de caspasa-3 activa en células HT22 para los nuevos derivados híbridos sintetizados en este trabajo.
- Realizar el ensayo PAMPA para los compuestos **a4** y **a6**.
- Ampliar el estudio de la detección de fragmentos citotóxicos de APP mediante western blot a las nuevas nitronas sintetizadas.
- Completar los estudios de modelado molecular para el ligando **a5** y determinar la energía de unión de los ligandos en caspasa-7.
- Realizar el test de Ames para estudiar mutagenicidad de la nitrona **a4**.
- Evaluar el efecto neuroprotector de la nitrona **a4** en un modelo *in vivo* de Alzheimer.

7. Elucidación estructural

Derivados 4-Aril-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol.

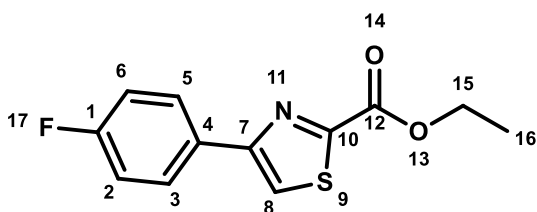
4-(4-nitrofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol, I.1. Sólido amarillo, (R= 58%) ^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ_{H} (ppm): 8.86 (s, 1H, H-8), 8.38 – 8.34 (m, 2H, H-6, H-2), 8.31 – 8.27

(m, 2H, H-5, H-3), 4.44 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-15), 1.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-16). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, DMSO) δ_{C} (ppm): 159.69 (C12), 158.82 (C10), 154.27 (C7), 147.66 (C1), 139.59 (C4), 127.78 (C3, C5), 125.17 (C8), 124.83 (C2, C6), 62.91 (C15), 14.53 (C16).



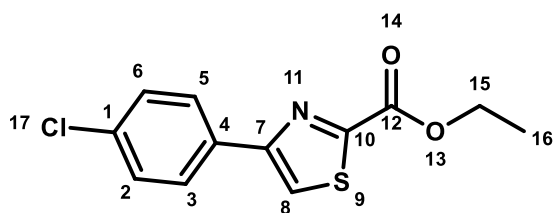
4-(4-metilfenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol, I.2. Sólido blanco, (R= 51%). ^1H RMN (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm): 8.24 (s, H, H-8), 7.95 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3, H-5), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-6, H-2), 4.50 – 4.43 (m, 2H,

H-15), 2.38 (s, 3H, H-17), 1.42 (td, $J = 6.9, 2.9$ Hz, 3H, H-16). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 159.68 (C10), 157.82 (C12), 157.23 (C7), 138.50 (C1), 131.14 (C4), 129.46 (C2, C6), 126.36 (C3, C5), 118.92 (C8), 62.07 (C15), 20.41 (C17), 17.84 (C16).



4-(4-fluorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol, I.3. Sólido blanco, (R= 62%) ^1H RMN (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm): 8.31 (s, 1H, H-8), 8.13 – 8.09 (m, 2H, H-5, H-3), 7.28 – 7.24 (m, 2H, H-6, H-2), 4.34 – 4.29 (m, 2H, H-15), 1. –

1.31 (m, 3H, H-16). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 164.17 (C1), 161.73 (C4), 159.58 (C12), 158.09 (C10), 155.99 (C7), 128.47 (C3, C5), 119.54 (C8), 115.53 (C2, C6), 62.13 (C15), 13.62 (C16).

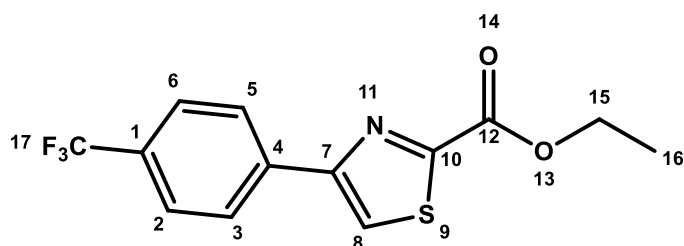
**4-(4-clorofenil)-2-etoxicarbonil-1,3-tiazol,****I.4.** Sólido amarillo, (R = 91%). ^1H RMN (400MHz, Metanol) δ_{H} (ppm): 8.09 (s, 1H, H-8),

7.89 – 7.86 (m, 2H, H-5, H-3), 7.36 – 7.33 (m,

2H, H-6, H-2), 4.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-15),1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-16). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, MeOD) δ_{C} (ppm): 159.73

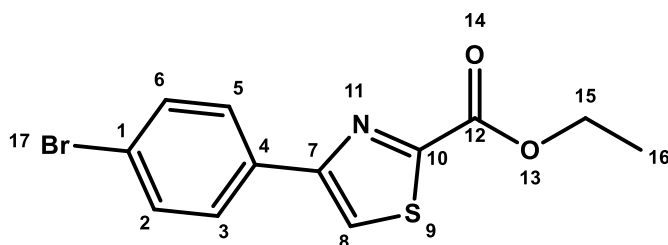
(C10), 158.03 (C12), 156.05 (C7), 134.28 (C1), 132.24 (C4), 128.65 (C2, C6), 127.73 (C3, C5),

119.98 (C8), 62.32 (C15), 13.07 (C16).

**4-[4-(trifluorometil)fenil]-2-****etoxicarbonil-1,3-tiazol, I.5.** Sólidoblanco (R= 50%). ^1H RMN (400 MHz,Acetona) δ_{H} (ppm): 8.38 (s, 1H, H-8),8.15 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7.70(d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3, H-5), 4.34 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-15), 1.28 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-16). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 159.45 (C12), 158.61 (C10), 155.28

(C7), 137.44 (C4), 129.90 (C1), 126.97 (C2, C6), 125.86 (C3, C5), 123.07 (C8), 62.19 (C15),

13.59 (C16).

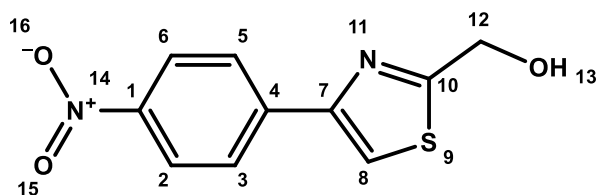
**4-(4-bromofenil)-2-etoxicarbonil-****1,3-tiazol, I.6.** Sólido blanco, (R=46%). ^1H RMN (400 MHz,Acetona) δ_{H} (ppm): 8.39 (s, 1H, H-

8), 8.05 – 8.01 (m, 2H, H-3, H-5),

7.71 – 7.67 (m, 2H, H-2, H-6), 4.48 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H-15), 1.43 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-16). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 159.49 (C12), 158.32 (C10), 155.76

(C7), 133.03 (C4), 131.95 (C2, C6), 128.28 (C3, C5), 122.19 (C1), 120.28 (C8), 62.11 (C15),

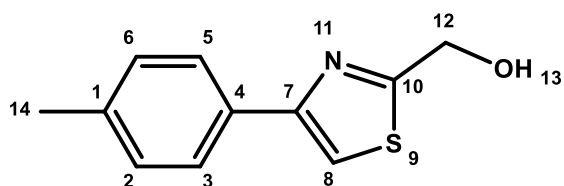
13.59 (C16).

Derivados 4-Aril-2-hidroximetil-1,3-tiazol.**4-(4-nitrofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol,****II.1.** Sólido amarillo, (R= 88%). ^1H RMN**(400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm):** 8.34 – 8.31

(m, 2H, H-2, H-6), 8.29 – 8.26 (m, 2H, H-

3, H-5), 8.23 (s, 1H, H-8), 5.31 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-13), 4.98 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, H-12). ^{13}C **RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm):** 174.74 (C10), 152.52 (C7), 147.17 (C1),

140.66 (C4), 126.84 (C3, C5), 124.01 (C2, C6), 117.02 (C8), 61.63 (C12).

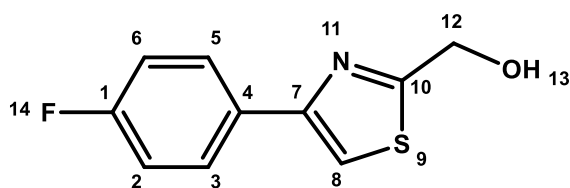
**4-(4-metilfenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol,****II.2.** Sólido color crudo, (R= 89%). ^1H RMN**(400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm):** 7.88 (d, $J =$

8.2 Hz, 2H, H-3, H-5), 7.78 (s, 1H, H-8), 7.25

(d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-2, H-6), 5.19 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-13), 4.93 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H-12), 2.36(s, 3H, H-14). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 173.34 (C10), 154.95

(C7), 137.47 (C1), 132.19 (C4), 129.22 (C2, C6), 126.02 (C3, C5), 111.91 (C8), 61.70 (C12),

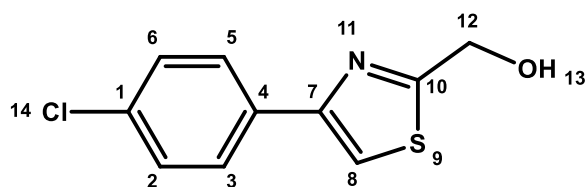
20.30 (C14).

**4-(4-fluorofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol,****II.3.** Sólido blanco, (R= 75%). ^1H RMN (400**MHz, Acetona) δ_{H} (ppm):** 8.06 – 8.02 (m,

2H, H-3, H-5), 7.84 (s, 1H, H-8), 7.23 – 7.18

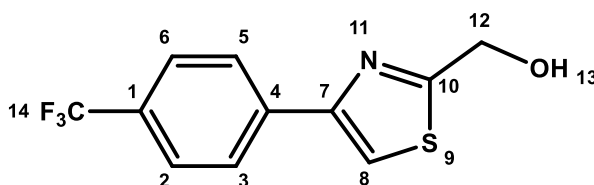
(m, 2H, H-2, H-6), 5.18 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-13), 4.94 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, H-12). ^{13}C RMN**(HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm):** 173.73 (C10), 163.68, 161.25 (C1), 153.77

(C7), 131.38 (C4), 128.07 (C3, C5), 115.45 (C2, C6), 112.59 (C8), 61.68 (C12)

**4-(4-clorofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol,**

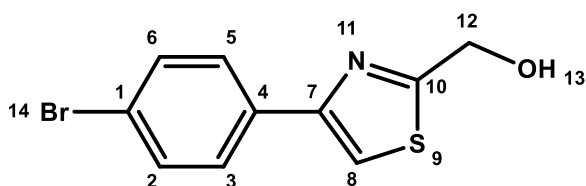
II.4. Sólido color crudo, (R= 99%). ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ_{H} (ppm): δ 7.82 – 7.79 (m, 2H, H-3, H-5), 7.72 (s, 1H, H-8), 7.32 –

7.30 (m, 2H, H-2, H-6), 5.67 (s, 1H, H-13)), 4.76 (s, 2H, H-12). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, MeOD) δ_{C} (ppm): δ 171.54, (C10) 153.97 (C7), 133.51 (C1), 133.07 (C4), 128.47 (C2, C6), 127.45 (C3, C5), 114.49 (C8), 61.08 (C12).

**4-[4-(trifluorometil)fenil]-2-hidroximetil-1,3-tiazol, II.5.**

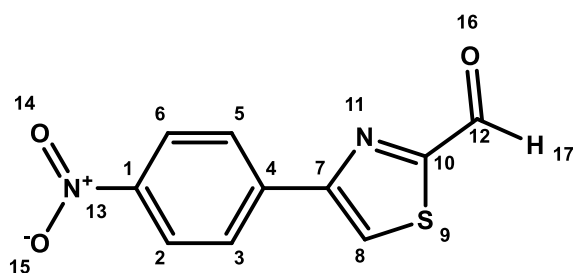
Sólido color crudo, (R= 85%). ^1H RMN (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm): 8.07 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-2, H-6),

7.94 (s, 1H, H-8), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-3, H-5), 5.07 (t, J = 5.9 Hz, 1H, H-13), 4.82 (s, 2H, H-12). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 174.27 (C10), 153.18 (C7), 138.43 (C4), 128.76 (C1), 126.55 (C2, C6), 125.63 (C3, C5), 115.34 (C8), 61.68 (C12).

**4-(4-bromofenil)-2-hidroximetil-1,3-tiazol, II.6.**

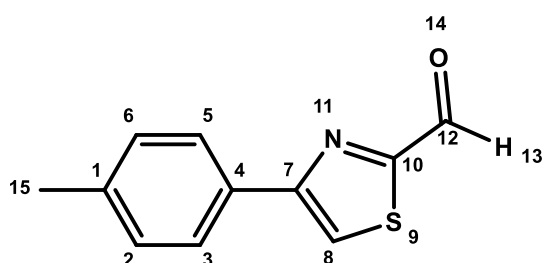
Sólido blanco, (R= 93%). ^1H RMN (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm): 7.97

– 7.94 (m, 2H, H-3, H-5), 7.94 (s, 1H, H-8), 7.64 – 7.60 (m, 2H, H-2, H-6), 5.19 (td, J = 6.1, 3.4 Hz, 1H, H-13), 4.96 – 4.93 (m, 2H, H-12). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 171.47 (C10), 153.78 (C7), 133.16 (C4), 132.23 (C2, C6), 128.51 (C3, C5), 123.98 (C1), 113.06 (C8), 64.35 (C12).

Derivados 4-Aril-2-formil-1,3-tiazol.**4-(4-nitrofenil)-2-formil-1,3-tiazol, III.1.**

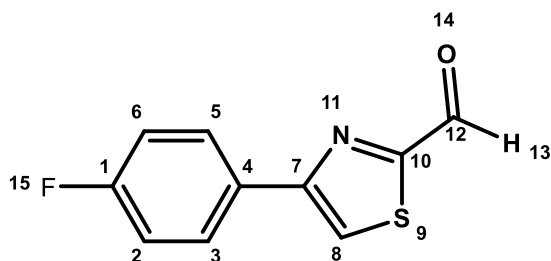
Sólido amarillo, (R= 81%). ^1H RMN (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm): 10.09 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-17), 8.80, (s, 1H, H-8), 8.40 – 8.38 (m, 4H, H-5, H-3, H-6, H-2). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C}

(ppm): 184.00 (C12), 166.57 (C10), 155.34 (C7), 139.33 (C4), 127.39 (C3, C5), 124.23 (C2, C6), 124.19 (C8).

**4-(4-metilfenil)-2-formil-1,3-tiazol, III.2.**

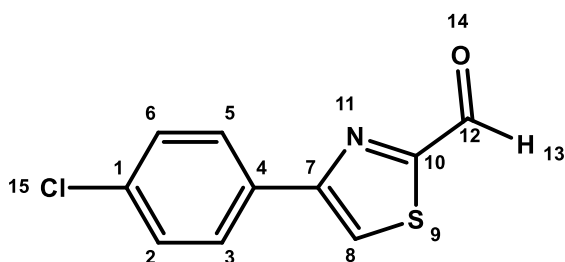
Sólido color crudo, (R= 94%). ^1H RMN (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm): 10.05 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-13), 8.41 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-8), 7.99 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3, H-5), 7.34 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-2, H-6), 2.40 (s, 3H, H-15). ^{13}C RMN

(HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 184.06 (C12), 165.82 (C10), 158.11 (C7), 138.80 (C1), 130.89 (C4), 129.54 (C2, C6), 126.37 (C3, C5), 119.97 (C8), 20.35 (C15).

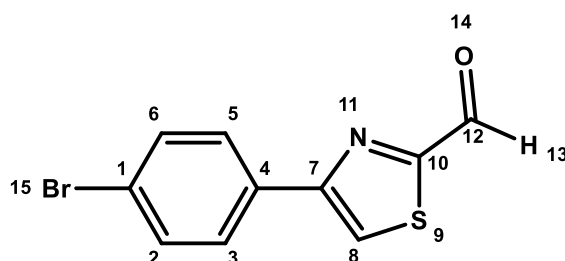
**4-(4-fluorofenil)-2-formil-1,3-tiazol, III.3.**

Sólido anaranjado, (R= 96%). ^1H RMN (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm): 10.06 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-13), 8.47 (s, 1H, H-8), 8.18 – 8.13 (m, 2H, H-3, H-5) 7.30 (ddd, $J = 9.7, 6.0, 2.5$ Hz,

2H, H-2, H-6). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 184.00 (C12), 166.03 (C10), 161.87 (C1), 156.86 (C7), 130.11 (C4), 128.60, 128.52 (C3, C5), 120.58 (C8), 115.86 (C2, C6).

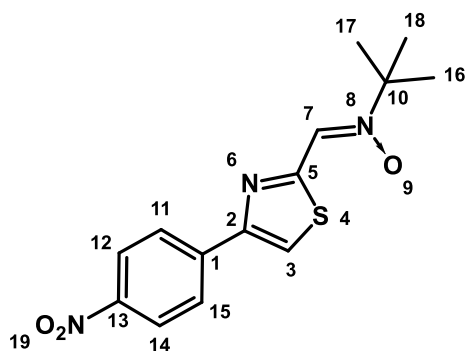


4-(4-clorofenil)-2-formil-1,3-tiazol, III.4.
 Sólido anaranjado, (R= 90%). ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ_{H} (ppm): 9.61 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-13), 8.72 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-8), 8.06 – 8.00 (m, 2H, H-3, H-5), 7.56 – 7.53 (m, 2H, H-2, H-6). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, MeOD) δ_{C} (ppm): 188.93 (C12), 165.88 (C10), 153.24 (C7), 134.75 (C1), 131.56 (C4), 129.11 (C2, C6), 128.37 (C3, C5), 117.81 (C8).

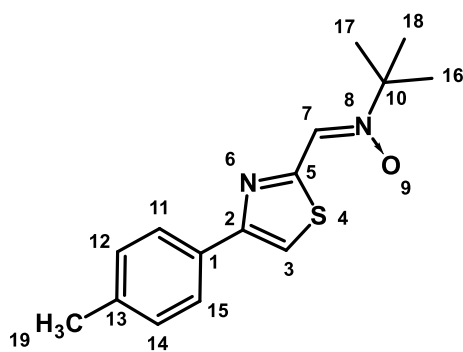


4-(4-bromofenil)-2-formil-1,3-tiazol, III.6.
 Sólido color crudo, (R= 70%). ^1H RMN (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm): 9.91 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-13), 8.40 (s, 1H, H-8), 7.92 – 7.90 (m, 2H, H-3, H-5), 7.58 – 7.55 (m, 2H, H-2, H-6). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 183.97 (C12), 166.15 (C10), 156.64 (C7), 132.76 (C4), 132.05 (C2, C6), 131.70, 128.31 (C3, C5), 127.95, 122.45 (C1), 121.38 (C8).

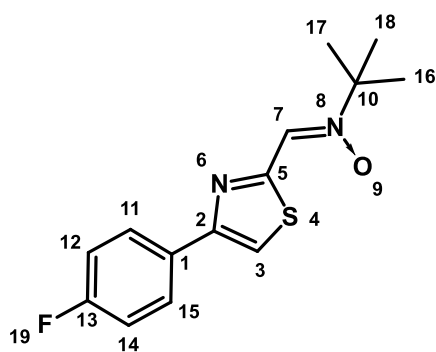
Derivados α -(4-aril-1,3-tiazol-2-il)-*N*-tert-butilnitrona.



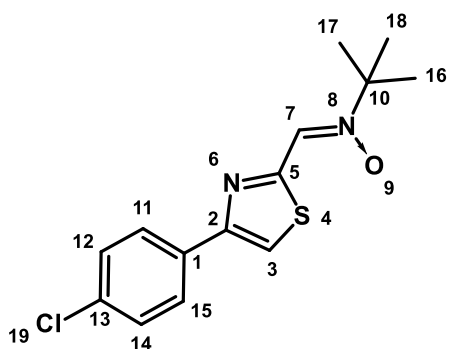
α -(4-[4-nitrofenil]-1,3-tiazol-2-il)-*N*-tert-butilnitrona, a1. Sólido amarillo, (R= 21%) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 8.75 (s, 1H, H-3), 8.51 (s, 1H, H-7), 8.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-12, H-14), 8.29 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H-11, H-15), 1.58 (s, 9H, H-16, H-17, H-18). ^{13}C RMN (HSQC, HMBC) (101 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 158.08 (C5), 153.08 (C2), 147.33 (C13), 140.44 (C1), 127.49 (C11, C15), 126.95 (C3), 124.77 (C12, C14), 119.25 (C7), 71.16 (C10), 27.91 (C16, C17, C18). **MS, m/z (%)**: 305 (M^+ , 14), 249 (35), 232 (1). **PF** = 197-199 $^{\circ}\text{C}$.



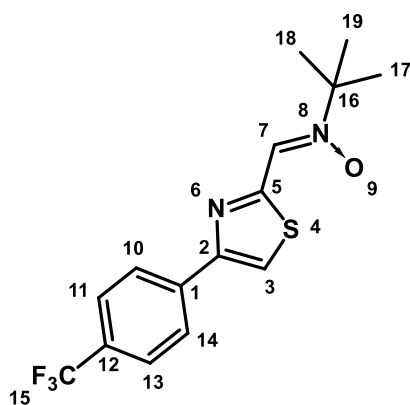
α -(4-[4-metilfenil]-1,3-tiazol-2-il)-N-tert-butilnitrona, a2. Sólido amarillo pálido, (R= 29%) ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 8.53 (s, 1H, H-3), 7.95 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-11, H-15), 7.90 (s, 1H, H-7), 7.29 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H-12, H-14), 2.38 (s, 3H, H-19), 1.67 (s, 9H, H-16, H-17, H-18). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 157.36 (C5), 155.86 (C2), 132.01 (C13), 129.32 (C12, C14), 128.73 (C1), 126.21 (C11, C15), 126.08 (C3), 113.47 (C7), 70.38 (C10), 27.18 (C16, C17, C18), 20.31 (C19). MS, m/z (%): 274 (M^+ , 43), 218 (100), 161 (15). PF = 175-177 $^{\circ}\text{C}$.



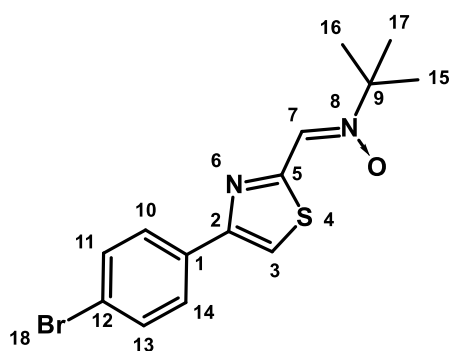
α -(4-[4-fluorofenil]-1,3-tiazol-2-il)-N-tert-butilnitrona, a3. Sólido anaranjado, (R= 25%) ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ_{H} (ppm): 8.51 (s, 1H, H-3), 7.93 – 7.88 (m, 2H, H-11, H-15), 7.81 (s, 1H, H-7), 7.10 – 7.05 (m, 2H, H-12, H-14), 1.54 (s, 9H, H-16, H-17, H-18). ^{13}C RMN (HSQC-HMBC) (101 MHz, MeOD) δ_{C} (ppm): 161.73 (C13), 157.21 (C5), 155.25 (C2), 130.68 (C1), 128.13 (C11, C15), 127.73 (C3), 115.29 (C12, C14), 115.08 (C7), 70.61 (C10), 26.71 (C16, C17, C18). MS, m/z (%): 280 (M, 2), 261 (3), 222 (63). PF = 128-129 $^{\circ}\text{C}$.



α -(4-[4-clorofenil]-1,3-tiazol-2-il)-N-tert-butilnitrona, a4. Sólido blanco, (R = 13%) ^1H NMR (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm): 8.56 (s, 1H, H-3), 8.09 – 8.05 (d, 2H, H-11, H-15), 8.01 (s, 1H, H-7), 7.52 – 7.48 (d, 2H, H-12, H-14), 1.67 (s, 9H, H-16, H-17, H-18). ^{13}C NMR (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm): 157.73 (C5), 154.38 (C2), 133.47 (C13), 133.39 (C1), 128.80 (C12, C14), 127.86 (C11, C15), 126.08 (C3), 114.75 (C7), 70.53 (C10), 27.18 (C16, C17, C18). MS, m/z (%): 296 (M, 7), 238 (48), 181 (3). PF = 162-163 $^{\circ}\text{C}$.



α -(4-[4-(trifluorometil)fenil]-1,3-tiazol-2-il)-N-tert-butilnitrona, a5. Sólido color crudo, (R= 11%) **^1H NMR (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm):** 8.60 (s, 1H, H-3), 8.29 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-10, H-14), 8.17 (s, 1H, H-7), 7.82 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-11, H-13), 1.69 (s, 9H, H-17, H-18, H-19). **^{13}C NMR (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm):** 158.00 (C5), 153.94 (C2), 138.32 (C1), 126.76 (C10, C14), 126.06-125.63 (C7-C11-C13-C12-C15), 116.20 (C3), 70.63 (C16), 27.16 (C17, C18, C19). **MS, m/z (%):** 330 (M, 1), 272 (35), 261 (3). **PF** = 173-174 °C.



α -(4-[4-bromofenil]-1,3-tiazol-2-il)-N-tert-butilnitrona, a6. Sólido color crudo, (R= 15%) **^1H NMR (400 MHz, Acetona) δ_{H} (ppm):** 8.41 (s, 1H, H-3), 7.89 – 7.87 (d, 2H, H-10, H-14), 7.86 (s, 1H, H-7), 7.52 – 7.49 (m, 2H, H-11, H-13), 1.53 (s, 9H, H-15, H-16, H-17). **^{13}C NMR (HSQC-HMBC) (101 MHz, Acetona) δ_{C} (ppm):** 157.75 (C5), 154.40 (C2), 133.89 (C12), 131.79 (C11, C13), 128.13 (C10, C14), 126.01 (C1), 121.58 (C3), 114.75 (C7), 70.52 (C9), 27.16 (C15, C16, C17).

8. Material Suplementario

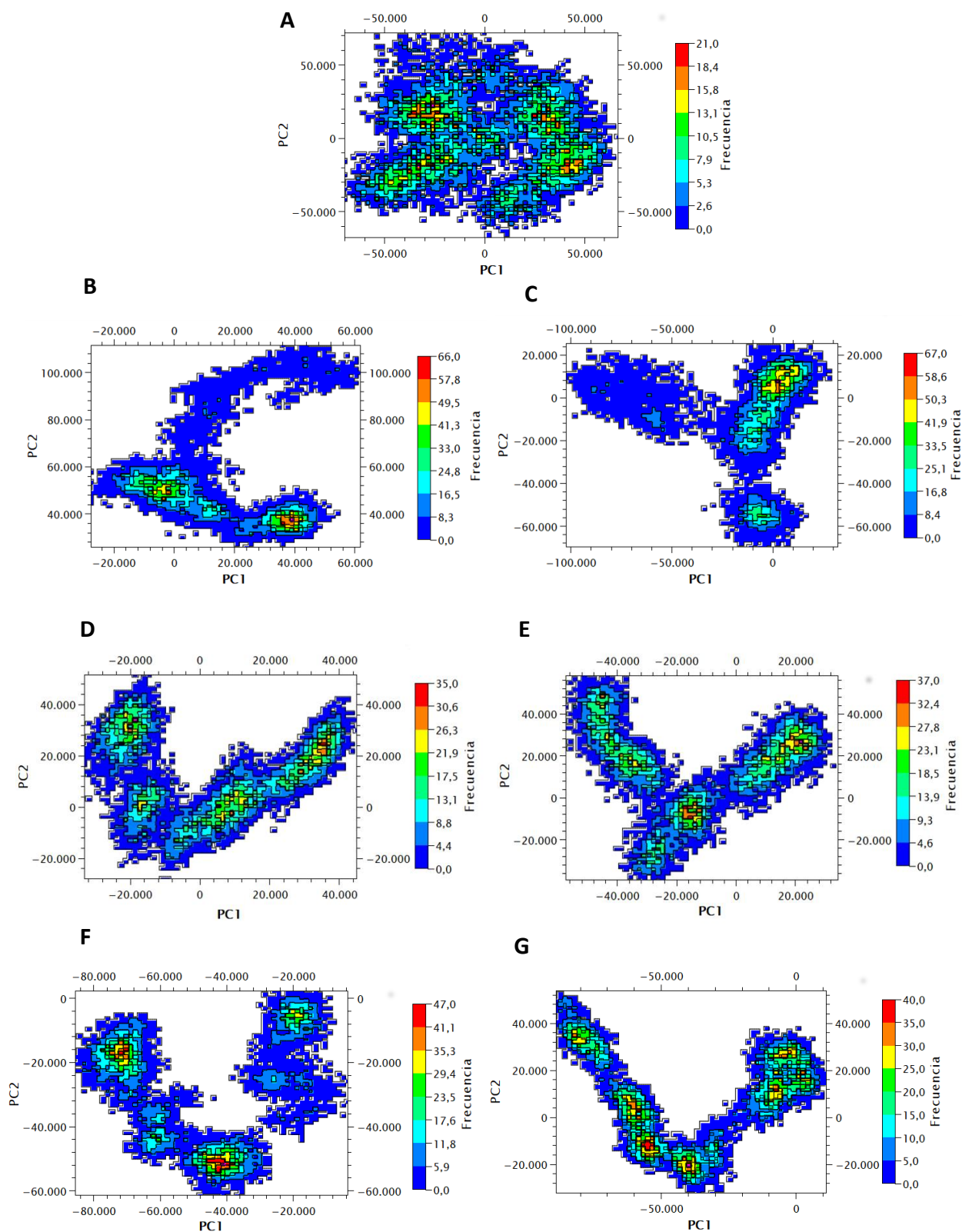


Figura 43. Análisis de componentes principales. Gráficos de la proyección de los 100 ns aMD de caspasa-3 en ausencia y presencia de ligando sobre el primer y segundo vector propio. (A) Caspasa-3, (B) Caspasa-3-a0, (C) Caspasa-3-a1, (D) Caspasa-3-a2, (E) Caspasa-3-a3, (F) Caspasa-3-a4, (G) Caspasa-3-a6.

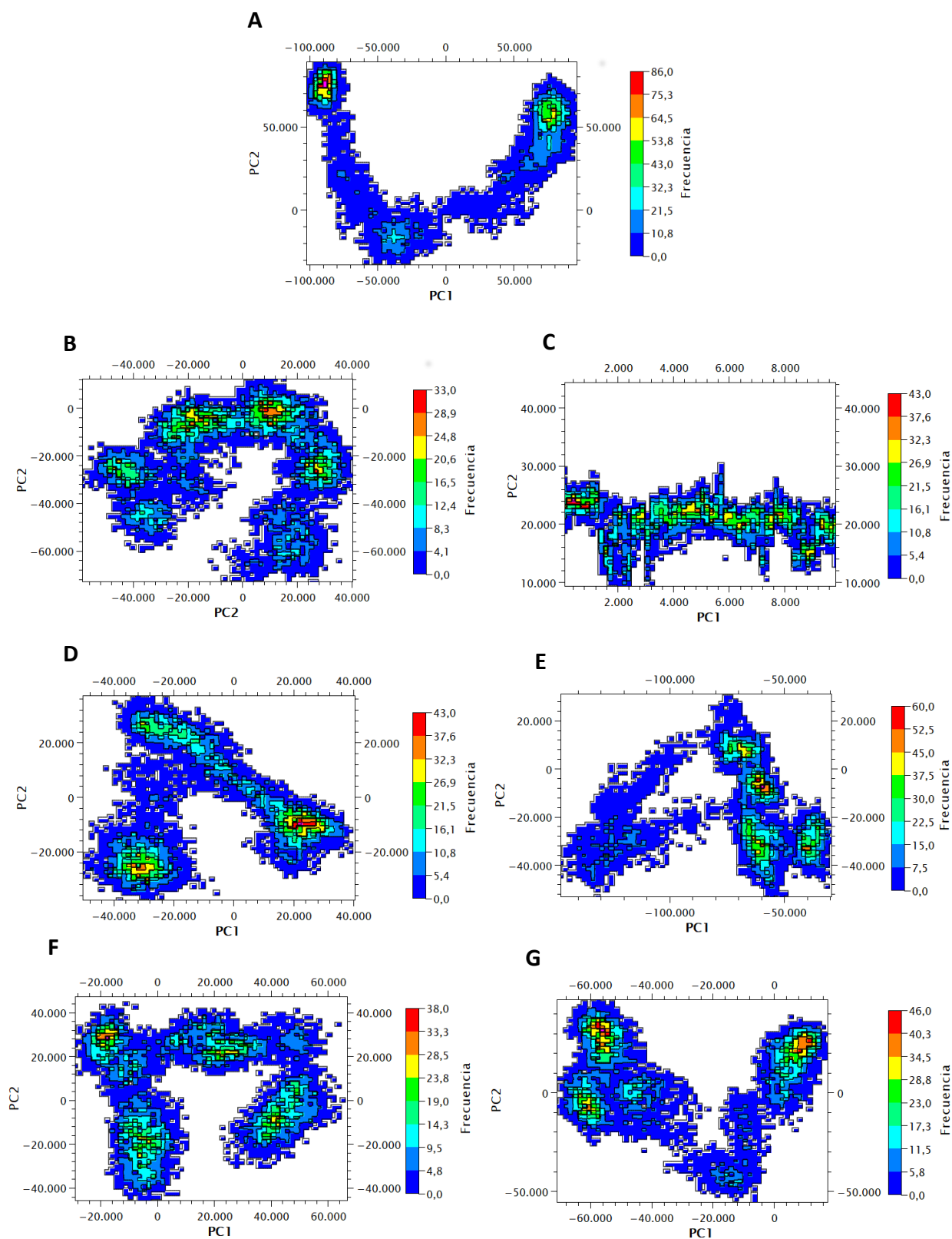


Figura 44. Análisis de componentes principales. Gráficos de la proyección de los 100 ns aMD de caspasa-7 en ausencia y presencia de ligando sobre el primer y segundo vector propio. (A) Caspasa-7, (B) Caspasa-7-a0, (C) Caspasa-7-a1, (D) Caspasa-7-a2, (E) Caspasa-7-a3, (F) Caspasa-7-a4, (G) Caspasa-7-a6.

9. Referencias

- [1] Hui-Ming Gao y Jau-Shyong Hong. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Neuropharmacology Section, Laboratory of Pharmacology, National Institute of Environmental Health Sciences/National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC 27709, USA.*, 29, (2008), 357–365.
- [2] Marriott, A.L., Rojas-Mancilla, E., Morales, P., Herrera-Marschitz, M., Tasker, R.A. Models of progressive neurological dysfunction originating early in life, *Progress in Neurobiology* (2015)
- [3] World Alzheimer Report 2015, (2015). <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf> (accessed October 2, 2015).
- [4] Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* 8, (2012), 131–168.
- [5] Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H. M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.*, 3, (2007), 186-191.
- [6] Niedowicz, M.; D.; Nelson, P.T.; Murphy, M.P. Alzheimer's Disease: pathological mechanisms and recent insights. *Curr. Neuropharmacol.*, 9, (2011), 674-684.
- [7] Sanders, S.; Zhang, Z.; Tang, B. Pathways to Cures: Neurodegenerative Diseases in China; (2013).
- [8] Sheikh Arslan Sehgal, Mirza A. Hammad, Rana Adnan Tahir, Hafiza Nisha Akram and Faheem Ahmad. Current Therapeutic Molecules and Targets in Neurodegenerative Diseases Based on in silico Drug Design *Current Neuropharmacology.*, 16, (2018), No. 6 651.
- [9] Hatters, D.M. Protein misfolding inside cells: The case of huntingtin and Huntington's disease. *IUBMB Life.*, 60, (2008), 724–728.
- [10] Blokhuis, A.M.; Groen, E.J.N.; Koppers, M.; van den Berg, L.H.; Pasterkamp, R.J. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.*, 125, (2013), 777–794.
- [11] David, M.A.; Tayebi, M. Detection of protein aggregates in brain and cerebrospinal fluid derived from multiple sclerosis patients. *Front. Neurol.*, 5, (2014), 251.
- [12]. Lucke-Wold, B.P.; Turner, R.C.; Logsdon, A.F.; Bailes, J.E.; Huber, J.D.; Rosen, C.L. Linking traumatic brain injury to chronic traumatic encephalopathy: Identification of potential mechanisms leading to neurofibrillary tangle development. *J. Neurotrauma.*, 31, (2014), 1129–1138.
- [13] Sarkar S, Dammer EB, Malovic E, Olsen AL, Raza SA, Gao T, Xiao H, Oliver DL, Duong D, Joers V, Seyfried N, Huang M, Kukar T, Tansey MG, Kanthasamy AG and Rangaraju S. Molecular Signatures of Neuroinflammation Induced by α Synuclein Aggregates in Microglial Cells. *Front. Immunol.* (2020), 11:33.
- [14] Alberto J. Espay, Joaquin A. Vizcarra, Luca Marsili, Anthony E. Lang, David K. Simon, Aristide Merola, Keith A. Josephs, Alfonso Fasano, Francesca Morgante, Rodolfo Savica, J. Timothy Greenamyre, Franca Cambi, Tritia R. Yamasaki, Caroline M. Tanner, Ziv Gan-Or, Irene Litvan, Ignacio F. Mata, Cyrus P. Zabetian, Patrik Brundin, Hubert H. Fernandez, David G. Standaert, Marcelo A. Kauffman, Michael A. Schwarzschild, S. Pablo Sardi, Todd Sherer, George Perry, James B. Leverenz. Revisiting protein aggregation as pathogenic in sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *Neurology.* 92, (2019), 329-337.
- [15] F. Massoud, G. C. Léger, Pharmacological treatment of Alzheimer disease, *Can. J. Psychiatry.* 56 (2011) 579–588.
- [16] A. Kumar, A. Singh, Ekavali, A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update, *Pharmacol. Reports.* 67 (2015) 195–203.
- [17] Franco R y Cedazo-Minguez. A Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Front. Pharmacol.*(2014), 5:146
- [18] LA. Craig, NS. Hong, RJ. McDonald. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, (2011), 1397–1409.

- [19] AV. Terry, JJ. Buccafusco. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, (2003), 821-827.
- [20] R. Schliebs, T. Arendt. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 113, (2006), 1625-44.
- [21] VJ. De-Paula, M. Radanovic, BS. Diniz, OV. Forlenza. Alzheimer's disease. *Sub-cell Biochem.* 65, (2012), 329-52.
- [22] T. Fiorelli, L. Kirouac, J. Padmanabhan. Altered Processing of Amyloid Precursor Protein in Cells Undergoing Apoptosis. *Plos One.* 8, (2013), 1-12.
- [23] HW. Querfurth, FM. LaFerla. Mechanisms of Disease Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 362, (2010), 329-44.
- [24] Y. An, C. Zhang, S. He, C. Yao, L. Zhang, Q. Zhang. Main hypotheses, concepts and theories in the study of Alzheimer's disease. *Life Sci. J.* 5, (2008), 1-5.
- [25] Kurt A. Jellinger. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J. Cell. Mol. Med.* 14, (2010), 457-487
- [26] Lee JA. Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin. *BMB Rep.* 42, (2009), 324–30.
- [27] Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1793, (2009), 664–73.
- [28] Yue Z, Friedman L, Komatsu M, et al. The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1793, (2009), 1496–507.
- [29] Uversky VN. Intrinsic disorder in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Front Biosci.* 14, (2009), 5188–238.
- [30] Herczenik E, Gebbink MF. Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. *FASEB J.* 22, (2008), 2115–33.
- [31] Ovádi J, Orosz F. Protein folding and misfolding: neurodegenerative diseases. Netherlands: Springer; (2009), 274.
- [32] Mendoza-Espinosa P, Garcia-Gonzalez V, Moreno A, et al. Disorder-to-order conformational transitions in protein structure and its relationship to disease. *Mol Cell Biochem.* 330, (2009), 105–20.
- [33] B. Uttara, A.V. Singh, P. Zamboni, R.T. Mahajan. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr. Neuropharmacol.*, 7 (2009) 65-74.
- [34] Singh, A.; Kukreti, R.; Saso, L.; Kukreti, S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 24, (2019), 1583.
- [35] Pająk B, Kania E, Orzechowski A. Killing Me Softly: Connotations to Unfolded Protein Response and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2016, (2016), 1805304.
- [36] M.T. Lin, M.F. Beal. Nature Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443, (2006), 787-795.
- [37] I. Bezprozvanny, MP. Mattson. Neuronal Calcium Mishandling and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci.* 31, (2008), 454–463.
- [38] MP. Mattson, B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg, RE. Rydel. Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.* 12, (1992), 376-89.
- [39] VP. Reddy, X. Zhu, G. Perry, MA. Smith. Oxidative stress in Diabetes and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 16, (2009), 763-774.

- [40] Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. Edward H. Koo, Peter T. Lansbury, Jeffery W. Kelly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, (1999), 9989-9990.
- [41] VJ. De-Paula, M. Radanovic, BS. Diniz, OV. Forlenza. Alzheimer's disease. *Sub-cell Biochem.* 65, (2012), 329-52.
- [42] C. Haass, C. Kaether, G. Thinakaran, S. Sisodia. Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2, (2012), a006270.
- [43] H.A. Bustamante, A. Rivera-Dictter, V.A. Cavieres, et al. Turnover of C99 is Controlled by a Crosstalk between ERAD and Ubiquitin-Independent Lysosomal Degradation in Human Neuroglioma Cells. *Plos One.* 8, (2013), e83096.
- [44] Sandra Villegas. Alzheimer's disease: New therapeutic strategies. *Medicina Clínica (English Edition)*, 145, (2015), 76-83
- [45] M. Aslan, T. Ozben. Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 1, (2004), 111-9.
- [46] B. Halliwell, JMC. Gutteridge. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radic. Biol. Med.* 12, (1992), 93-5.
- [47] G. Kim, YE. Lee, H. Xu, MA. Philbert, R. Kopelman. Nanoencapsulation method for high selectivity sensing of hydrogen peroxide inside live cells. *Anal Chem.* 82, (2010), 2165-9.
- [48] T. Nakamura et al. *Experimental Neurology*, 238, (2012), 12–21.
- [49] Kumar, A., et al., Herbs to curb cyclic nucleotide phosphodiesterase and their potential role in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* (2015)
- [50] M. D'Amelio, M. Sheng, F. Cecconi. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends in Neurosci.* 35, (2012), 700-709.
- [51] Lin, M. T., y Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, (2006), 787–795.
- [52] Petit, A. et al. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J. Biol. Chem.* 280, (2005), 34025–34032.
- [53] Takeuchi, H., Kobayashi, Y., Ishigaki, S., Doyu, M., Sobue, G. Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 277, (2002), 50966–50972.
- [54] Reddy, P. H. et al. Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 13, (2004), 1225–1240.
- [55] BM. McGleenon, KB. Dynan, AP. Passmore. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48, (1999), 471–480.
- [56] PT. Francis, AM. Palmer, M. Snape, GK. Wilcock. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosur. Ps.* 66, (1999), 137–147.
- [57] S. Reardon. Alzheimer antibody drugs show questionable potential. *Nature reviews.* 14, (2015), 591,592.
- [58] I. Kanazawa. How do neurons die in neurodegenerative diseases?, *Trends in Molecular Medicine*, 7, (2001), 339–344.
- [59] A. G. Porter and R. U. Janicke. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death & Differentiation.* 6, (1999), 99–104.
- [60] M. E. Nuttall, D. Lee, B. McLaughlin, and J. A. Erhardt. Selective inhibitors of apoptotic caspases: implications for novel therapeutic strategies, *Drug Discovery Today.* 6, (2001), 85–91

- [61] S. Sharma, A. Basu, and R. K. Agrawal. Pharmacophore modeling and docking studies on some nonpeptide-based caspase-3 inhibitors, *BioMed Research International*, 2013, (2013), 1-15.
- [62] M. D'Amelio, M. Sheng, and F. Cecconi. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis, *Trends in Neurosciences*, 35, (2012), 700–709.
- [63] N. Louneva, J. W. Cohen, L.-Y. Han et al., Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 173, (2008), 1488–1495.
- [64] S. Khan, K. Ahmad, MA. Alshammari, M. Adnan, MH. Baig, M. Lohani, P. Somvanshi, S. Haque. Implication of Caspase-3 as a Common Therapeutic Target for Multineurodegenerative Disorders and Its Inhibition Using Nonpeptidyl Natural Compounds. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International.*, (2015), 1-9.
- [65] I. Kanazawa. How do neurons die in neurodegenerative diseases? *Trends Mol. Med.* 7 (2001) 339–344.
- [66] V. Cavallucci, M. D'Amelio. Matter of life and death: the pharmacological approaches targeting apoptosis in brain diseases. *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 215–229.
- [67] YP. Goldberg, et al. Cleavage of huntingtin by apopain, aproapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat. Genet.* 13 (1996) 442–449.
- [68] CL. Wellington, et al. Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 9158–9167.
- [69] C. Alves da Costa, F. Checler. Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism? *Cell. Signal.* 23 (2011) 963–968.
- [70] RE. Burke. Programmed cell death in Parkinson's disease. *Handb. Clin. Neurol.* 83 (2007) 591–605.
- [71] F. Strappazon, et al. Non-apoptotic roles for death-related molecules: When mitochondria chose cell fate. *Exp. Cell Res.* 318 (2012) 1309–1315.
- [72] FG. Gervais, D. Xu, GS. Robertson, JP. Vaillancourt, Y. Zhu, J. Huang, A. LeBlanc, D. Smith, M. Rigby, MS. Shearman, EE. Clarke, H. Zheng, LH. Van Der Ploeg, SC. Ruffolo, NA. Thornberry, S. Xanthoudakis, RJ. Zamboni, S. Roy, DW. Nicholson. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-b precursor protein and myloidogenic Ab peptide formation. *Cell* 97 (1999) 395–406.
- [73] JP. Borg, Y. Yang, M. De Taddéo-Borg, B. Margolis, RS. Turner. The X11a protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Ab40 and Ab42 secretion. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14761–14766.
- [74] C. Dumanchin-Njock, CA. Alves da Costa, L. Mercken, L. Pradier, F. Checler. The caspase-derived C-terminal fragment of β APP induces caspase-independent toxicity and triggers selective increase of A β 42 in mammalian cells. *J. Neurochem.* 8 (2001) 1153–1161.
- [75] G. Tesco, Y. Ho Koh, RE. Tanzi. Caspase Activation Increases β -Amyloid Generation Independently of Caspase Cleavage of the β -Amyloid Precursor Protein (APP). *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 46074-46080.
- [76] Z. Li, J. Jo, JM. Jia, SC. Lo, DJ. Whitcomb, S. Jiao, K. Cho, M. Sheng. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell.* 141 (2010) 859–871.
- [77] A. de Calignon, LM. Fox, R. Pitstick, GA. Carlson, BJ. Bacsikai, TL. Spires-Jones, BT. Hyman. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464 (2010) 1201–1214.
- [78] CA. Bradley, S. Peineau, C. Taghibiglou, CS. Nicolas, DJ. Whitcomb, ZA. Bortolotto, BK. Kaang, K. Cho, YT. Wang, GL. Collingridge. A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* 5 (2012) 1-11.

- [79] J. Jo, DJ. Whitcomb, K. Moore Olsen, TL. Kerrigan, SC. Lo, G. Bru-Mercier, B. Dickinson, S. Scullion, M. Sheng, G. Collingridge, K. Cho. A β 1–42 inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3 β . *Nat. Neurosci.* 14 (2011) 545-547.
- [80] M. D'Amelio, V. Cavallucci, S. Middei, C. Marchetti, S. Pacioni, A. Ferri, A. Diamantini, D. De Zio, P. Carrara, L. Battistini, S. Moreno, A. Bacci, M. Ammassari-Teule, H. Marie, F. Cecconi. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 14 (2011) 69-79.
- [81] M. Yamada, K. Kida, W. Amutuhaire, F. Ichinose, and M. Kaneki, Gene disruption of caspase-3 prevents MPTP-induced Parkinson's disease in mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402, (2010), 312–318.
- [82] M. Chen, V. O. Ona, M. Li et al., Minocycline inhibits caspase1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease, *Nature Medicine*, 6, (2000), 797–801.
- [83] L. J. Martin, A. C. Price, A. Kaiser, A. Y. Shaikh, and Z. Liu, Mechanisms for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and in models of motor neuron death, *International Journal of Molecular Medicine*, 5, (2000), 3– 13.
- [84] M. Li, V. O. Ona, C. Guegan et al., Functional role of caspase-1 ' and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model, *Science*, 288, (2000), 335–339.
- [85] W. Boston-Howes, S. L. Gibb, E. O. Williams, P. Pasinelli, R. H. Brown Jr., and D. Trotti, Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, (2006), 14076–14084.
- [86] A. Dejda, V. Jolivel, S. Bourgault, T. Seaborn, A. Fournier, H. Vaudry, D. Vaudr. Inhibitory Effect of PACAP on Caspase Activity in Neuronal Apoptosis: A Better Understanding Towards Therapeutic Applications in Neurodegenerative Diseases. *J Mol Neurosci* 36 (2008) 26–37.
- [87] C. Stadelmann, T.L. Deckwerth, A. Srinivasan, C. Bancher, W. Bruck, K. Jellinger, et al., Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death, *Am J Pathol.* 155 (1999) 1459–1466.
- [88] E. Kavanagh, J. Rodhe, M.A. Burguillos, J.L. Venero, B. Joseph, Regulation of caspase-3 processing by cIAP2 controls the switch between pro-inflammatory activation and cell death in microglia., *Cell Death Dis.* 5 (2014).
- [89] Philchenkov, A.A. Caspases as Regulators of Apoptosis and Other Cell Functions. *Biochemistry (Moscow)* 68, (2003), 365–376.
- [90] Crawford, ED.; Wells, JA. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 80 (2011) 1055-1087.
- [91] P. Fuentes-Prior, GS. Salvesen. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384 (2004) 201-232.
- [92] L. Minini, F. Ferraro, S. Cancela, A. Merlino. Insight into the mechanism of action and selectivity of caspase-3 reversible inhibitors through in silico studies. *J. Mol. Struct.* 1147 (2017) 558-568.
- [93] J. Agniswamy, B. Fang, IT. Weber. Conformational similarity in the activation of caspase-3 and -7 revealed by the unliganded and inhibited structures of caspase-7. *Apoptosis* 14 (2009) 1135–1144.
- [94] J. Rotonda, DW. Nicholson, KM. Fazil, M. Gallant, Y. Gareau, M. Labelle, EP. Peterson, DM. Rasper, R. Ruel, JP. Vaillancourt. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 619–625.
- [95] B. Feeney, C. Pop, P. Swartz, C. Mattos, AC. Clark. Role of loop bundle hydrogen bonds in the maturation and activity of (Pro)caspase-3. *Biochem.* 45 (2006) 13249–13263.
- [96] HJ. Kang, Y. Lee, MS. Jeong, M. Kim, KH. Bae, SJ. Kim, SJ. Chung. Molecular insight into the role of the leucine residue on the L2 loop in the catalytic activity of caspases 3 and 7. *Biosci. Rep.* 32 (2012) 305–313.

- [97] Häcker, H. G., Sisay, M. T., Gütschow, M. Allosteric modulation of caspases. *Pharmacol. Ther.* 132, (2011), 180–195.
- [98] Walters, J., Schipper, J. L., Swartz, P., Mattos, C., Clark, A. C. Allosteric modulation of caspase-3 through mutagenesis. *Biosci. Rep.* 32, (2012), 401–411.
- [99] A. Clay Clark. Caspase allostery and conformational selection. *Chem. Rev.* 116, (2016), 6666–6706.
- [100] Joseph J. Maciag, Sarah H. Mackenzie, Matthew B. Tucker, Joshua L. Schipper, Paul Swartz, A. Clay Clark. Tunable allosteric library of caspase-3 identifies coupling between conserved water molecules and conformational selection. *PNAS*, 113, (2016), E6080-E6088
- [101] HR. Stennicke, M. Renatus, M. Meldal, GS. Salvesen. Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem. J.* 350 (2000) 563–568.
- [102] S. Mahrus, JC. Trinidad, DT. Barkan, A. Sali, AL. Burlingame, JA. Wells. Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini. *Cell.* 134 (2008) 866–76
- [103] JC. Timmer, W. Zhu, C. Pop, T. Regan, SJ. Snipas, AM. Eroshkin, SJ. Riedl, GS. Salvesen. Structural and kinetic determinants of protease substrates. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 1101–1108.
- [104] J. Walter, A. Schindzielorz, J. Grunberg, C. Haass. Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (1999) 1391–96.
- [105] M. Barkett, D. Xue, HR. Horvitz, TD. Gilmore. Phosphorylation of IkappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29419–22.
- [106] R. Schweigreiter, T. Stasyk, I. Contarini, S. Frauscher, T. Oertle et al. Phosphorylation-regulated cleavage of the reticulon protein Nogo-B by caspase-7 at a noncanonical recognition site. *Proteomics* 7 (2007) 4457–67.
- [107] B. Fang, P.I. Boross, J. Tozser, I.T. Weber, Structural and Kinetic Analysis of Caspase-3. Reveals Role for S5 Binding Site in Substrate Recognition., *J. Mol. Biol.* 360 (2006) 654–666.
- [108] NA. Thornberry, TA. Rano, EP. Peterson, DM. Rasper, T. Timkey. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17907–17911.
- [109] B. Fang, G. Fu, J. Agniswamy, R.W. Harrison, I.T. Weber, Caspase-3 binds diverse P4 residues in peptides as revealed by crystallography and structural modeling., *Apoptosis.* 14 (2009) 741–752.
- [110] G. Fu, A. Chumanevich, J. Agniswamy, B. Fang, R.W. Harrison, I.T. Weber, Structural basis for executioner caspase recognition of P5 position in substrates., *Apoptosis.* 13 (2008) 1291–1302.
- [111] S. Cancela, L. Canclini, G. Mourglia, P. Hernández, A. Merlino. Neuroprotective effects of novel nitrones: In vitro and in silico studies. *Eur. J. Pharmacol.*, 871 (2020) 172926.
- [112] C. Park, S. Marqusee. Probing the high energy states in proteins by proteolysis. *J. Mol. Biol.* 343 (2004) 1467–76.
- [113] A. Kossiakoff. The application of neutron crystallography to the study of dynamic and hydration properties of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1985) 1195–227.
- [114] L. Yang, S. Sugama, RP. Mischak, M. Kiaei, N. Bizat, E. Brouillet, TH. Joh, MF. Beal. A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo. *Neurobiol. Dis.* 17 (2004) 250-259.
- [115] S. Toulmond, K. Tang, Y. Bureau, H. Ashdown, A. Giroux, Y. Zhu, M. Boucher, B. Pikounis, S. Xanthoudakis, S. Roy, M. Rigby, R. Zamboni, GS. Robertson, GYK. Ng, DW. Nicholson, JPF. Flückiger. Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. *British J. Pharmacol.* 141 (2004) 689-697.

- [116] W. Tao, J. Kim, S. Faubel, JC. Wu, SA. Falk, RW. Schrier, CL. Edelstein. Caspase inhibition reduces tubular apoptosis and proliferation and slows disease progression in polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102 (2005) 6954-6959.
- [117] SD. Linton, T. Aja, RA. Armstrong, X. Bai, LS. Chen, N. Chen, B. Ching, P. Contreras, JL. Diaz, CD. Fisher, LC. Fritz, P. Gladstone, T. Groessl, X. Gu, J. Herrmann, BP. Hirakawa, NC. Hoglen, KG. Jahangiri, VJ. Kalish, DS. Karanewsky, L. Kodandapani, J. Krebs, J. McQuiston, SP. Meduna, K. Nalley, ED. Robinson, RO. Sayers, K. Sebring, AP. Spada, RJ. Ternansky, KJ. Tomaselli, BR. Ullman, KL. Valentino, S. Weeks, D. Winn, JC. Wu, P. Yeo, CZ. Zhang. First-in-class pan caspase inhibitor developed for the treatment of liver disease. *J. Med. Chem.* 48 (2005) 6779-6782.
- [118] TL. Deckwerth, LM. Adams, C. Wiessner, PR. Allegrini, M. Rudin, A. Sauter, B. Hengerer, RO. Sayers, G. Rovelli, T. Aja, R. May, K. Nalley, SD. Linton, DS. Karanewsky, JC. Wu, S. Roggo, A. Schmitz, PC. Contreras, KJ. Tomaselli. Long-term protection of brain tissue from cerebral ischemia by peripherally administered peptidomimetic caspase inhibitors. *Drug Develop. Res.* 52 (2001) 579-586.
- [119] CA. Dinarello. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4 (2004) 378-385.
- [120] D. Lee, SA. Long, JL. Adams, G. Chan, KS. Vaidya, TA. Francis, K. Kikly, JD. Winkler, CM. Sung, C. Debouck, S. Richardson, MA. Levy, WE. DeWolf, PM. Keller, T. Tomaszek, MS. Head, MD. Ryan, C. Haltiwanger, PH. Liang, CA. Janson, PJ. McDevitt, K. Johanson, NO. Concha, W. Chan, SS. Abdel-Meguid, AM. Badger, MW. Lark, DP. Nadeau, LJ. Suva, M. Gowen, ME. Nuttall. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspase-3 and -7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16007-16014.
- [121] A. Iwata, K. Nishio, RK. Winn, EY. Chi, WR. Henderson, J. Harlan. A Broad-Spectrum Caspase Inhibitor Attenuates Allergic Airway Inflammation in Murine Asthma Model. *J. Immunol.* 170 (2003) 3386-3391
- [122] J. Rozman-Pungercar, N. Kopitar-Jerala, M. Bogyo, D. Turk, O. Vasiljeva, I. Stefe, P. Vandenabeele, D. Bromme, V. Puizdar, M. Fonovic, M. Trstenjak-Prebanda, I. Dolenc, V. Turk, B. Turk. Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death Differ.* 10 (2003) 881-888.
- [123] M. Werle, A. Bernkop-Schnürch. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids.* 30 (2006) 351-367.
- [124] SD. Linton. Caspase Inhibitors: A Pharmaceutical Industry Perspective. *Curr. Topics Med. Chem.* 5 (2005) 1697-1717.
- [125] Y. Jiang, TV. Hansen. Isatin 1,2,3-triazoles as potent inhibitors against caspase-3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 1626-1629.
- [126] LM. Havran, DC. Chong, WE. Childers, PJ. Dollings, A. Dietrich, BL. Harrison, V. Marathias, G. Tawa, A. Aulabaugh, R. Cowling, B. Kapoor, W. Xu, L. Mosyak, F. Moy, WT. Hum, A. Wood, AJ. Robichaud. 3,4-dihydropyrimido(1,2-A)indol-10(2H)-ones as potent non-peptidic inhibitors of caspase-3. *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 7755-7768.
- [127] R. Fattorusso, D. Jung, KJ. Crowell, M. Forino, M. Pellechia. Discovery of a novel class of reversible non-peptide caspase inhibitors via a structure-based approach. *J. Med. Chem.* 48 (2005) 1649-1656.
- [128] Y. Han, A. Giroux, J. Colucci, CI. Bayly, DJ. McKay, S. Roy, S. Xanthoudakis, JP. Vaillancourt, DM. Rasper, J. Tam, P. Tawa, DW. Nicholson, RJ. Zamboni. Novel pyrazinone mono-amides as potent and reversible caspase-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 1173-1180.
- [129] Y. Han, A. Giroux, EL. Grimm, R. Aspiotis, S. Francoeur, CI. Bayly, DJ. McKay, S. Roy, S. Xanthoudakis, JP. Vaillancourt, DM. Rasper, J. Tam, P. Tawa, NA. Thornberry, EP. Paterson, M. García-Calvo, JW Becker, J. Rotonda, DW. Nicholson, RJ. Zamboni. Discovery of novel aspartyl ketone dipeptides as potent and selective caspase-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 805-808.

- [130] D. Lee, S.A. Long, J.H. Murray, J.L. Adams, M.E. Nuttall, D.P. Nadeau, K. Kikly, J.D. Winkler, C.M. Sung, M.D. Ryan, M.A. Levy, P.M. Keller, W.E. DeWolf. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7. *J. Med. Chem.* 44 (2001) 2015-2026.
- [131] W. Chu, J. Rothfuss, A. d'Avignon, C. Zeng, D. Zhou, R.S. Hotchkiss, R.H. Mach. Isatin sulfonamide analogs containing a Michael addition acceptor: a new class of caspase 3/7 inhibitors. *J. Med.Chem.* 50 (2007) 3751-3755.
- [132] P.J. Lakshmi, B.V.S.S. Kumar, R.S. Nayana, M.S. Mohan, R. Bolligarla, S.K. Das, M.U. Bhanu, A.K. Kondapi, M. Ravikumar. Design, synthesis, and discovery of novel non-peptide inhibitor of Caspase-3 using ligand based and structure based virtual screening approach. *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6040-6047.
- [133] Z. Li, Y. Pan, W. Zhong, Y. Zhu, Y. Zhao, L. Li, W. Liu, H. Zhou, C. Yang. Synthesis and evaluation of N-acyl-substituted 1,2-benzisothiazol-3-one derivatives as caspase-3 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6735-45.
- [134] Y. Jiang, T.V. Hansen, Isatin 1,2,3-triazoles as potent inhibitors against caspase-3., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 1626–1629.
- [135] L.M. Havran, D.C. Chong, W.E. Childers, P.J. Dollings, A. Dietrich, B.L. Harrison, et al., 3,4-Dihydropyrimido(1,2-a)indol-10(2H)-ones as potent non-peptidic inhibitors of caspase-3, *Bioorganic Med. Chem.* 17 (2009) 7755–7768.
- [136] Z. Guo, Z. Yan, X. Zhou, Q. Wang, M. Lu, W. Liu, et al., Synthesis and biological evaluation of novel 1,2-benzisothiazol-3-one-derived 1,2,3-triazoles as caspase-3 inhibitors, *Med. Chem. Res.* 24 (2015) 1814–1829.
- [137] Z. Li, Y. Pan, W. Zhong, Y. Zhu, Y. Zhao, L. Li, et al., Synthesis and evaluation of Nacyl-substituted 1,2-benzisothiazol-3-one derivatives as caspase-3 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6735–6745.
- [138] L. Wu, M. Lu, Z. Yan, X. Tang, B. Sun, W. Liu, et al., 1,2-Benzisothiazol-3-one derivatives as a novel class of small-molecule caspase-3 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 2416–2426.
- [139] D. Liu, Z. Tian, Z. Yan, L. Wu, Y. Ma, Q. Wang, et al., Design, synthesis and evaluation of 1,2-benzisothiazol-3-one derivatives as potent caspase-3 inhibitors, *Bioorganic Med. Chem.* 21 (2013) 2960–2967.
- [140] Q. Zhu, L. Gao, Z. Chen, S. Zheng, H. Shu, J. Li, et al., A novel class of small-molecule caspase-3 inhibitors prepared by multicomponent reactions., *Eur. J. Med. Chem.* 54 (2012) 232–238.
- [141] P.J. Lakshmi, B.V.S.S. Kumar, R.S. Nayana, M.S. Mohan, R. Bolligarla, S.K. Das, et al., Design, synthesis, and discovery of novel non-peptide inhibitor of Caspase-3 using ligand based and structure based virtual screening approach., *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6040–6047.
- [142] R. Fattorusso, D. Jung, K.J. Crowell, M. Forino, M. Pellecchia, Discovery of a novel class of reversible non-peptide caspase inhibitors via a structure-based approach., *J. Med. Chem.* 48 (2005) 1649–1656.
- [143] Hoye AT, Davoren JE, Wipf P, Fink MP, Kagan VE. Targeting mitochondria. *Acc. Chem. Res.* 41, (2008), 87–97.
- [144] G. Barriga, C. Olea-Azar, E. Norambuena, A. Castro, W. Porcal, A. Gerpe, M. González, H. Cerecetto. New heteroaryl nitrones with spin trap properties: Identification of a 4-furoxanyl derivative with excellent properties to be used in biological systems. *Bioorgan. Med. Chem.* 18 (2010) 795–802.
- [145] C. Chavarría, D.I. Perez, C. Pérez, J.A. Morales, S. Alonso, A. Pérez, C. Gil, J.M. Souza, W. Porcal. Microwave-assisted synthesis of hydroxyphenyl nitrones with protective action against oxidative stress. *Eur. J. Med. Chem.* 58 (2012) 44-49.
- [146] W. Porcal, P. Hernández, M. González, A. Ferreira, C. Olea-Azar, H. Cerecetto, A. Castro. Heteroaryl nitrones as drugs for neurodegenerative diseases: synthesis, neuroprotective properties, and free radical scavenger properties. *J. Med. Chem.* 51 (2008) 6150-6159.

- [147] Y. Zhao, J. Dou, T. Wu, H.A. Aisa. Investigating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibition activities of *Gossypium herbaceum*. *Molecules*. 18 (2013) 951-62.
- [148] I.E. Orhan, I.P. Sutar, E.K. Akkol. In vitro neuroprotective effects of the leaf and fruit extracts of *Juglans regia* L. (walnut) through enzymes linked to Alzheimer's disease and antioxidant activity. *Int J Food Sci Nutr*. 62 (2011) 1781-6.
- [149] M. Lohani, M. Ahuja, M.A. Buabeid, S. Dean, S. Dennis, V. Suppiramaniam, B. Kemppainen, M. Dhanasekaran. Anti-oxidative and DNA protecting effects of flavonoids-rich *Scutellaria lateriflora*. *Nat. Prod. Commun*. 10 (2013) 1415-8.
- [150] J.Y. Wang, L.L. Wen, Y.N. Huang, Y.T. Chen, M.C. Ku. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 3521-33.
- [151] M.J. McManus, M.P. Murphy, J.L. Franklin. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate caspase-dependent and -independent neuronal deaths. *Mol. Cell. Neurosci*. 63 (2014) 13-23.
- [152] A. Das, B. Gopalakrishnan, O.H. Voss, A.I. Doseff, F.A. Villamena. Inhibition of ROS-induced apoptosis in endothelial cells by nitron spin traps via induction of phase II enzymes and suppression of mitochondria-dependent pro-apoptotic signaling. *Biochem. Pharmacol*. 84 (2012) 486-49
- [153] F.A. Villamena, A. Das, and K.M. Nash. Potential implication of the chemical properties and bioactivity of nitron spin traps for therapeutics. *Future Med Chem*. 4 (2012) 1171-1207.
- [154] R.A. Floyd et al., Nitrones, their value as therapeutics and probes to understand aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 123 (2002) 1021-1031.
- [155] H. Cerecetto, W. Porcal. Pharmacological Properties of Furoxans and Benzofuroxans: Recent Developments. *Mini-Rev. Med. Chem*. 5 (2005) 57-71.
- [156] A. Castro, T. Castaño, A. Encinas, W. Porcal, C. Gil. Advances in the synthesis and recent therapeutic applications of 1,2,4-thiadiazole heterocycles. *Bioorgan. Med. Chem*. 14 (2006) 1644-1652.
- [157] Goldstein and Pierre Lestage, Chemical and Pharmacological Aspects of Heteroaryl-Nitrones, *Current Medicinal Chemistry*. 7 (2000) 1255.
- [158] Ougolkov A.V., Billadeau D.D. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3. In: Vincan E. (eds) *Wnt Signaling. Methods in Molecular Biology*, 468 (2008), Humana Press.
- [159] Mishra CB, Kumari S, Tiwari M. Thiazole: a promising heterocycle for the development of potent CNS active agents. *Eur J Med Chem*. 92 (2015) 1-34.
- [160] L. Minini, P. Hernández, M.L. Lavaggi, A. Merlino. Novel compounds as selective inhibitors of caspase-3: organic synthesis, in silico and in vitro evaluation. 45a Reunión Anual de la Sociedad Brasileira de Bioquímica y Biología Molecular, Natal, Río Grande do Norte, Brasil, Junio 18-21, (2016).
- [161] J.G. Walsh, S.P. Cullen, C. Sheridan, A.U. Lüthi, C. Gerner, S.J. Martin, Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 12815-12819.
- [162] S. Cancela, Estudio de nitronas como inhibidores de apoptosis en células neuronales, Tesina Grado, Licenciatura En Bioquímica, Fac. Ciencias, UdelAR, Montevideo, Uruguay. (2015).
- [163] Z. Li et al. Design, synthesis and Structure-activity relationship studies of new thiazole-based free fatty acid receptor 1 agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Eur J. Med. Chem.* 113 (2016) 246-257.
- [164] J.E. Steves y S.S. Stahl. Stable TEMPO and ABNO Catalyst Solutions for User-Friendly (bpy)Cu/Nitroxyl-Catalyzed Aerobic Alcohol Oxidation, *J. Org. Chem*. 80 (2015) 11184-11188.
- [165] Hoover, J., Steves, J., Stahl, S. Copper(I)/TEMPO-catalyzed aerobic oxidation of primary alcohols to aldehydes with ambient air. *Nat Protoc*. 7 (2012) 1161-1166.

- [166] B. Roy y R. Narayan De. Preparation of nitrones and studies of their intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition reactions, *Indian J. Chem.* 50B, (2011) 1513-1518.
- [167] P. Maher, JB. Davis. The Role of Monoamine Metabolism in Oxidative Glutamate Toxicity. *J. Neurosci.* 16 (1996) 6394 – 6401.
- [168] J. Liu, L. Li, WZ. Suo. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.* 84 (2009) 267-71.
- [169] T.J. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63.
- [170] H. Wang y J.A. Joseph Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic Biol Med.* 27 (1999) 612–616
- [171] B. Liu, Z. Jian, Q. Li, K. Li, Z. Wang, L. Liu, L. Tang, X. Yi, H. Wang, C. Li, T. Gao. Baicalein protects Human melanocytes from H₂O₂-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase activation and the p38 MAPK pathway. *Free Rad. Biol. Med.* 53 (2012) 183–193.
- [172] LR. Aminova, JC. Chavez, J. Lee, H. Ryu, A. Kung, JC. LaManna, RR. Ratan. Prosurvival and Prodeath Effects of Hypoxia-inducible Factor-1Stabilization in a Murine Hippocampal Cell Line. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 3996 –4003.
- [173] Stefanis, L., Park, D.S., Friedman, W.J., Greene, L.A. Caspase-dependent and independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *J. Neurosci.* 19 (1999) 6235-6247.
- [174] Denault, JB y Salvesen, GS. Expression, Purification and Characterization of Caspases. *Current Protocols in Protein Science*, 21 (2002) 1-21.
- [175] Gasteiger, E. et al. Expasy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acid Res.* 31, (2003), 3784–3788 .
- [176] Michaelis, L. y Menten, M. L. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochemistry.* 49 (1913) 333–369 .
- [177] D. Lee, SA. Long, JH. Murray, JL. Adams, ME. Nuttall, DP. Nadeau, K. Kikly, JD. Winkler, CM. Sung, MD. Ryan, MA. Levy, PM. Keller, WE. DeWolf. Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7. *J. Med. Chem.* 44 (2001) 2015-2026
- [178] Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K. Screening : Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* 41 (1998) 1007–1010 .
- [179] 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 (2016) 102–111 .
- [180] Schmidtke P, Le Guilloux V, Maupetit J, Tuffery P. Fpocket: online tools for protein ensemble pocket detection and tracking. *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) W582–9.
- [181] Le Guilloux V, Schmidtke P, Tuffery P. Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics* 10 (2009) 168.
- [182] Schrödinger Release 2017-1: Schrödinger Suite 2017-1 Protein Preparation Wizard; Epik S, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017. In: 2017.
- [183] Schrödinger Release 2017-1: Maestro S, LLC, New York, NY, 2017. Maestro, Schrödinger. In: Maestro, Schrödinger; 2017.
- [184] Radoux CJ, Olsson TS, Pitt WR, et al. Identifying interactions that determine fragment binding at protein hotspots. *J. Med. Chem.* 59 (2016) 4314–25.

- [185] The PyMOL Molecular Graphics System VS, LLC.
- [186] Case DA, Babin V, Berryman JT, et al. Amber14. In: Amber14; University of California, San Francisco; 2014.
- [187] J.A. Maier, C. Martínez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K.E. Hauser, C. Simmerling, ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB, *J. Chem. Theory Comput.* 11 (2015) 3696–3713.
- [188] M. Sulpizi, U. Rothlisberger, P. Carloni, Molecular Dynamics Studies of Caspase-3, *Biophys. J.* 84 (2003) 2207–2215.
- [189] G.P. Miscione, M. Calvaresi, A. Bottoni, Computational evidence for the catalytic mechanism of caspase-7. A DFT investigation, *J. Phys. Chem. B.* 114 (2010) 4637–4645.
- [190] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, et al., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791.
- [191] GM. Morris, R. Huey, MF. Lindstrom, RK. Sanner, DS. Belew, AJ. Goodsell. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791.
- [192] E. Cancès, B. Menucci, J. Tomasi, A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics, *J. Chem. Phys.* 107 (1997) 3032–3041.
- [193] J. Tomasi. B. Mennucci y E. Cancès. 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. Molec. Struc.* 464 (1999) 211–226.
- [194] JD Chai, M. Head-Gordon. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *J. Chem. Phys.* 10 (2008) 6615–6620.
- [195] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.B. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, et al., Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, (2009).
- [196] Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. D., Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model. *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 10269–10280.
- [197] Wang, J. M., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P., Case, D. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1157–1174.
- [198] OJ.P. Ryckaert, G. Ciccotti, H.J.C. Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes, *J. Comput. Phys.* 23 (1977) 327–341.
- [199] D.S. Corti, Monte Carlo simulations in the isothermal-isobaric ensemble: The requirement of a “shell” molecule and simulations in small systems, *Mol. Phys.* 100 (2002) 1887–1904.
- [200] Y. Miao, F. Feixas, C. Eun, JA. McCammon. Accelerated Molecular Dynamics Simulations of Protein Folding. *J. Comput. Chem.* 36 (2015) 1536–1549.
- [201] 216. Roe, D. R. y Cheatham III, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J Chem Theory Com.* 9 (2013) 3084–3095 .

- [202] P.A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, et al., Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models, *Acc. Chem. Res.* 33 (2000) 889-897.
- [203] W. Humphrey A. Dalke, K. Schulten. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33-38.
- [204] Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.
- [205] XMGRACE V. In: Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR; 2005.
- [206] OriginPro 8.5, Version 2010, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.
- [207] QtiPlot: data analysis and scientific visualization.
- [208] Franco, J. et al. In vitro activity and mode of action of distamycin analogues against African trypanosomes. *Eur. J. Med. Chem.* 126 (2017) 776–788 .
- [209] Poręba, M., Strózyk, A., Salvesen, G. S., Drąg, M. Caspase substrates and inhibitors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) 1–20.
- [210] 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 (2009) 2700–2714 .
- [211] 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 (2002) 11860–11865.
- [212] Talele TT, Khedkar SA, Rigby AC. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. *Curr. Top. Med. Chem.* 10 (2010) 127-41.