



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Química Orgánica



***N*-ACILAMINOFENOTIAZINAS Y 5,6-DIHIDRO-1,4,5-
DIBENZO[*B,F*]TIADIAZEPINAS:
FÁRMACOS NEUROPROTECTORES DE POSIBLE
APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL ALZHEIMER
Y DE OTRAS ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS**

TESIS DOCTORAL

Gema C. González Muñoz
Madrid, 2009

A mis padres

¿Por qué esta magnífica tecnología científica, que ahorra trabajo y nos hace la vida mas fácil, nos aporta tan poca felicidad? La repuesta es está, simplemente: porque aún no hemos aprendido a usarla con tino.

Albert Einstein

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a los directores del IQM e ITH los doctores Pilar Goya Laza y Antonio García García por acogerme en ambos institutos.

Desearía dar las gracias a mis directores de tesis. A los doctores Santiago Conde y M^a Isabel Rodríguez, que confiaron en mí para participar en este proyecto de Química Médica, algo que nunca podré agradecer como se merece el haberme rescatado para la investigación. A la Profa. Mercedes Villarroya, por su acogida en el Departamento de Farmacología, por enseñarme todas las técnicas farmacológicas que he aprendido en estos años y por responder a todas mis inquietudes.

También gracias a mi tutora la Profa. Ana Martín, por su apoyo.

Y como no agradecer al CSIC la concederme la beca I3P y al ministerio y la comunidad de Madrid por la financiación de los dos proyectos a los que pertenezco: “Estrategias neuroprotectoras para la enfermedad de Alzheimer: fármacos multifuncionales activos en varias dianas terapéuticas del SNC” (SAF 2006-01249). “Diseño, síntesis y desarrollo de fármacos neuroprotectores para las demencias tipo Alzheimer y vascular” (P-2006/SAL-0275).

Quisiera agradecer a la Profa. Manuela García el haberme acogido en el Laboratorio 3, responder a todas mis dudas, y hacer de mi trabajo en su laboratorio de lo más agradable y fructífero.

Para agradecer a mis compañeros de trabajo todo lo que me han aportado y lo que he aprendido de ellos haría falta una Memoria igual de tamaño a ésta. A la Doctora Mariana Arce quien fue mi compi desde el principio y me enseñó a sintetizar y a trabajar en el laboratorio de orgánica. A la Doctora Carmen Gil, por estar ahí siempre

que la necesitamos y no protestar nunca (gracias por guardarlo todo). A la Doctora Tania Castaño por todos sus buenos consejos los cuales me han sido muy útiles y me han ayudado a ser mejor persona, gracias Tani. A mi supercompañera Beatriz López por ayudarme con la síntesis cuando no salía, y por dejarme entrar en su vida y que hoy en día seamos también amigas. Y también a los que se han ido la Dra. Isabel Fernández, Vicente y Arantxa muchas gracias por hacer más ameno el trabajo día a día.

También agradecer a mis compis del ITH, como me recibieron y todo lo que me han ayudado. En particular quiero agradecer a Laura Del Barrio todas sus risas y los buenos momentos que hemos pasado en el fluorímetro. A Javier Egea por tener siempre una buena idea, de por donde seguir y a su ayuda con el citómetro. A Alex por sembrarme las células y hacerme experimentos con calcio cuando yo no podía. A Tere que aunque ya no está me acuerdo un montón de cuando dejábamos de trabajar e íbamos al retiro a patinar. Y a Rafa, Noelia y Angelo por todos los buenos momentos pasados y los que quedan por venir.

Quiero recordar también en estas breves palabras, a todos aquellos miembros técnicos sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

Muchas gracias a los demás Profesores y Doctores miembros del Departamento de Farmacología y del Instituto de Química Médica, que han hecho tan agradable mi trabajo durante estos últimos años.

Me gustaría agradecer todo su apoyo a mis amigos y familia, en especial a mi cuñada Raquel por estar en todo momento y escucharme siempre que lo necesito y desearle que su nuevo hijo nos de tanto como nos da su otra hija, mi sobri Lydia la cual hace que me olvide de mis penas y me pueda reír. Os quiero.

Como no dedicarle esto a mi querido hermano Mariano que, aunque a través del teléfono siempre tiene las palabras adecuadas, no me acostumbro a tenerte lejos.

También dedicar todo el trabajo y el ser persona sobre todo a mis padres, por su apoyo incondicional, sin pedir nunca nada a cambio, a ti papa gracias por tantos paseos a Badajoz cuando no tenía coche para que pudiera estudiar y a ti mi mama gracias por venir a tantos exámenes, estar en un periquete en Madrid nada más descolgar el teléfono y demostrarme que todo en la vida se arregla y se supera. Gracias a los dos sin vosotros no hubiera sido posible, aunque estemos lejos me hacéis sentir que estáis cerca.

Y como no dedicarle esta tesis al culpable de que este aquí en Madrid y haya podido realizar este trabajo a mi marido Edu, por hacerme sentir que no estoy sola aunque mi familia no este cerca, por tantas buenas caras cuando venia desesperada del labo por que no salía nada, y sobretodo agradecerle el que sea el motor que necesito para levantarme cada mañana y convencerme de que todo lo que nos propongamos en esta vida los dos juntos lo vamos ha conseguir, muchas gracias por todo. Te quiero.

Muchas gracias a todos.

Gema

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Enfermedades neurodegenerativas.....	1
2. Enfermedad de Alzheimer.....	3
2.1. Generalidades. Datos estadísticos y epidemiología.....	3
2.2. Historia.....	5
2.3. Patología y neuroquímica de la EA.....	6
2.3.1. Neurotransmisión colinérgica.....	7
2.3.2. Placas amiloides.....	9
2.3.3. Ovillos neurofibrilares.....	13
2.3.4. Procesos oxidativos.....	17
2.3.5. Ca ²⁺ y enfermedad de Alzheimer.....	20
2.4. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.....	21
2.4.1. Diagnóstico.....	21
2.4.2. Aproximación colinérgica. Productos en mercado.....	24
2.4.3. Aproximaciones relacionadas con el péptido amiloide.....	26
2.4.5. Ovillos neurofibrilares, inhibición de GSK-3 β	32
2.4.6. Oxidación.....	33
2.4.7. Bloqueantes de los canales de calcio voltaje dependientes.....	35
3. Fenotiazinas.....	37
II. OBJETIVOS.....	40
III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
1. Búsqueda de cabezas de serie en la familia de las fenotiazinas y de las Dibenzotiadiazepinas.....	42
1.1. Caracterización de los compuestos.....	43
1.2. Ebaluación biológica.....	47
1.2.1. Medida de la actividad como inhibidores de acetil y butirilcolinesterasa.....	49
1.2.2. Ensayos en cultivos celulares: neuroprotección frente a estrés oxidativa.....	49
1.2.2.1. Neuroprotección frente agua oxigenada.....	52
1.2.2.2. Neuroprotección frente a la mezcla de rotenona y oligomicina.....	55

1.2.3. Medidas de propiedades antioxidantes de los compuestos: captación de peróxido de hidrógeno.....	56
1.2.4. Medidas de la concentración de calcio citosólico.....	59
1.2.5. Medida de la $[Ca^{2+}]_c$ inducida por los compuestos en presencia de nimodipino.....	61
1.2.6. Medida de la neuroprotección frente a H_2O_2 inducida por los compuestos en presencia de nimodipino.....	62
1.2.7. Capacidad de penetración en el sistema nervioso central.....	64
2. Optimización de la serie de <i>N</i> -acilaminofenotiazinas.....	67
2.1. Síntesis de nuevas <i>N</i> -acilaminofenotiazinas.....	69
2.2. Evaluación biológica.....	72
2.2.1. Inhibición de acetil y butirilcolinesterasa (AChEI, BuChEI).....	73
2.2.2. Ensayos de neuroprotección en cultivos celulares de neuroblastoma humano.....	74
2.2.2.1. Neuroprotección frente a agua oxigenada.....	74
2.2.2.2. Neuroprotección frente a la mezcla de rotenona y oligomicina A.....	78
2.2.3. Medida de propiedades antioxidantes: captación de peróxido de hidrógeno.....	79
2.2.4. Medida de la concentración de calcio citosólico.....	80
2.2.5. Medida de la capacidad neuroprotectora de los derivados en rodajas de hipocampo..	82
2.2.6. Capacidad de penetración en el sistema nervioso central.....	85
3. Optimización de una familia de dibenzotiadiazepinas.....	88
3.1. Síntesis de nuevas dibenzotiadiazepinas.....	89
3.2. Evaluación biológica.....	92
3.2.1. Inhibición de acetil y butirilcolinesterasa (AChEI, BuChEI).....	93
3.2.2. Ensayos de neuroprotección en cultivos celulares.....	94
3.2.3. Medida de la capacidad antioxidante de los compuestos: Captación de peróxido de hidrógeno.....	97
3.2.4. Medida de la concentración de calcio citosólico.....	98
3.2.5. Capacidad de penetración en el sistema nervioso central.....	100
IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	102

V. PARTE EXPERIMENTAL.....	107
1. Materiales y métodos.....	107
2. Búsqueda de cabezas de serie en la familia de las fenotiazinas y de las Dibenzotiadiazepinas.....	108
3. Serie <i>N</i> -acilaminofenotiazinas.....	111
3.1. <i>N</i> -acilfenotiazinas presentes en la quimioteca.....	111
3.2 Síntesis de <i>N</i> -acilaminofenotiazinas.....	116
4. Serie dibenzotiadiazepinas.....	133
4.1. Dibenzotiadiazepinas presentes en la quimioteca.....	133
4.2. Síntesis de dibenzotiadiazepinas.....	134
4.3. Intermedios presentes en la quimioteca.....	140
5. Parte experimental farmacológica.....	142
5.1. Materiales y métodos.....	142
5.1.1. Materiales, soluciones y fármacos.....	142
5.1.2. Modelos celulares de estudio “in vitro”, células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).....	144
5.2. Procedimientos Experimentales.....	145
5.2.1. Inhibición de las enzimas AChE y BuChE.....	145
5.2.2. Determinación de la viabilidad celular. Medida de la actividad LDH.....	145
5.2.3. Captación de peróxido de hidrógeno.....	146
5.2.4. Determinación de la concentración de calcio citosólico libre.....	147
5.2.5. Medida de la capacidad neuroprotectora de los derivados en rodajas de hipocampo.....	149
5.2.6. Predicción del paso de la barrera hematoencefálica.....	150

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APP	Proteína precursora de amiloide
sAPP α	Fragmento soluble de la proteína precursora de amiloide
ATP	Adenosil trifosfato
β A	Proteína β amiloide
BuChE	Butirilcolinesterasa
[Ca ²⁺] _c	Concentración de Ca ²⁺ citosólico
CAT	Colín-acetil-transferasa
CCDV	Canales de Ca ²⁺ voltaje-dependientes
CI ₅₀	Concentración inhibidora 50
COSY	"Correlation spectroscopy"
CSF	Fluido cerebroespinal
DCFH-DA	Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína
DMEM	"Dulbecco-Modified Eagle Medium", medio de cultivo generalmente utilizado
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
E, Glu	Glutamato
EA	Enfermedad de Alzheimer
EM	Espectrometría de Masas
EN	Enfermadades neurodegenerativas
FDA	Food and Drug Administration (Agencia estadounidense del medicamento)
GSK	Glicógeno sintasa quinasa
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazín-N'-2-etanosulfónico
HMBC	"Heteronuclear multiple bond correlation experiment"
HNE	4-Hidroxi-2,3-nonenal
HMQC	"Heteronuclear multiple-quantum coherence experiment"
HOSA	Hidroxilamino-O-sulfato
HSQC	"Heteronuclear single-quantum coherence experiment"

Hz	Hertzios
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
I + D	Investigación y Desarrollo
LDH	Lactato deshidrogenasa
μM	Micromolar; $\times 10^{-6}$ M
mM	Milimolar; $\times 10^{-3}$
MAP	Proteína asociadas a microtubulos
nAChR	Receptores nicotínicos
NAD(H)	Nicotínadeníndinucleótido
NADP(H)	Nicotínadeníndinucleótido fosfato
NMDA	N-Metil-D-aspartato
ON	Ovillos neurofibrilares
PAS	Sitio periférico
Pf	Punto de fusión
PHF	Filamentos helicoidales pareados
PKC	Protein quinasa C
POG	Privación de glucosa y oxígeno
ppm	Partes por millón
PS	Placas seniles
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S, Ser	Serina
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superoxido dismutasa
τ	Proteína tau
T, Thr	Treonina
TCA	Ácido tricloroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	"Thin Layer Chromatography", cromatografía en capa fina
U.A.F	Unidades arbitrarias de fluorescencia
UV/VIS	Ultravioleta/visible

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

1. Enfermedades neurodegenerativas.

Muchas de las variaciones de las funciones cerebrales son procesos patológicos conocidos como enfermedades neurodegenerativas (EN) que afectan fundamentalmente a las facultades motoras, cognitivas y de comunicación de los pacientes. Su principal característica es la pérdida de neuronas en ciertas áreas del sistema nervioso central (SNC) que varían según la EN de que se trate. Si bien en alguna de ellas pueden influir componentes genéticos o cuadros clínicos como alcoholismo, traumatismos, tumores, etc., el máximo factor de riesgo es la edad, afectando aproximadamente a un 5% de la población de más de 65 años. Algunos ejemplos de EN son la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson y la ataxia de Friereich.

En los últimos años, como consecuencia de la mejora en las condiciones higiénicas y sanitarias, la esperanza de vida ha aumentado espectacularmente como puede verse en la *Tabla 1*¹ referida a la Unión Europea, con un aumento de la esperanza de vida al nacer de nada menos que 8 años en el plazo relativamente breve de 40 años.

Tabla 1. Esperanza de vida al nacer (UE-25), en años.

	1960	2004	2004ES	Prev. 2025 ¹
Mujeres	73	81.7	83.8	84.3
Hombres	67	75.6	77.2	78.7

ES: España

¹ Eurostat Pocketbooks. Living conditions in Europe. Data 2002-2005. **2007** edition.

Quizás incluso más espectaculares son las previsiones que aparecen en el mismo informe de Eurostat sobre el porcentaje estimado de población de 80 años o más para 2050 en comparación con los de 2004 (*Tabla 2*).

Tabla 2. Porcentaje de población mayor de 80 años

	Alemania	España	UE-25	Irlanda
2004	4.3	4.3	4.0	2.7
Estimado 2050	16.9	15.3	14.1	10.0

En los datos que aparecen en el informe referido a la Europa de 25 países, se estima que, con los datos y tendencias actuales, en el plazo de sólo 45 años la población de más de 80 años de edad pasaría del 4.0% actual a un 14.1%, es decir, se va a multiplicar por más de 3.5 veces, siendo los extremos Alemania e Irlanda con casi 17% y 10% respectivamente. España se encuentra por encima de la media europea.

Al margen de las múltiples reflexiones a que estas cifras puedan dar lugar, está claro que las enfermedades relacionadas con la edad, como es el caso de las EN, van a aumentar su importancia relativa, con la necesidad de un mayor conocimiento de sus causas, desencadenantes de las distintas patologías, relaciones entre ellas, etc., orientado hacia la prevención y/o tratamiento de dichas enfermedades. Sin duda ya se está haciendo un gran esfuerzo en este campo, tanto por parte de las compañías farmacéuticas como por universidades u otros centros públicos de investigación. La lista de moléculas en desarrollo para el tratamiento de EN, actualizada a Junio de 2007, incluye 605 productos desde la fase de descubrimiento y preclínica hasta fase clínica III, con su nombre o sigla, nivel de desarrollo, compañía o grupo responsable, indicación (p. ej.: tratamiento de Alzheimer, de EN en general,...), modo de acción (p. ej.: inhibidor de acetilcolinesterasa, agonista muscarínico M1,...) y categoría terapéutica (p. ej.: neuroprotector, antipsicótico,...)².

² Pogacíc, V.; Herrling, P. List of drugs in development for neurodegenerative diseases. *Neurodegener. Dis.* **2007**, *4*, 443-486.

2. Enfermedad de Alzheimer.

2.1. Generalidades. Datos estadísticos y epidemiología.

Entre las distintas EN, demencias seniles y otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento figura en primer lugar la enfermedad de Alzheimer (EA), con una prevalencia (prevalencia se refiere al número o proporción de una población concreta afectada por una determinada enfermedad o incidencia en un momento dado) en torno al 66% de todas las EN, seguida de las demencias vasculares y la enfermedad de Parkinson (10 – 14%)³.

La enfermedad es hereditaria tan sólo en el 1-2.5% de los casos. Este tipo de EA genética se puede dar a edades tan tempranas como 36-38 años y suele provocar procesos mucho más rápidos entre la aparición de los primeros síntomas y la muerte que en la EA no familiar⁴. Los casos más generales son los llamados esporádicos o no hereditarios, si bien se presentan casos intermedios en que, sin ser la EA familiar, existen factores genéticos de riesgo⁵. Afecta aproximadamente a un 1 % en el segmento de población de 65 a 69 años de edad, que aumenta a un 40 a 50 % entre las personas de 85 o más años, con una mayor incidencia (1.6:1) en mujeres que en hombres (*Figura 1*)⁶, si no bien parece deberse a una diferencia de género sino simplemente a la mayor esperanza de vida de las mujeres⁷.

³ Cacabelos, R. Alzheimer's disease and other dementias. Epidemiology and genetics. Handbook of Neurogeriatrics. Ed. Masson. Barcelona **1999**.

⁴ Murrell, J. R.; Hake, A. M.; Quaid, K. A.; Farlow, M. R.; Ghetti, B. Early-onset Alzheimer disease caused by a new mutation (V717L) in the amyloid precursor protein gene. *Arch. Neurol.* **2000**, *57*, 885-887.

⁵ Bertram, L.; Hiltunen, M.; Parkinson, M.; Ingelsson, M.; Lange, C.; Ramasamy, K.; Mullin, K.; Menon, R.; Sampson, A. J.; Hsiao, M. Y.; Elliott, K. J.; Velicelebi, G.; Moscarillo, T.; Hyman, B. T.; Wagner, S. L.; Becker, K. D.; Blacker, D.; Tanzi, R. E. Family-based association between Alzheimer's disease and variants in UBQLN1. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 884-94.

⁶ Nussbaum, R. L., Ellis, C. E., Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1356-64.

⁷ Alzheimer's Association, 2008 Alzheimer's Disease Facts and Figures. http://www.alz.org/national/documents/report_alzfactsfigures_2008.pdf.

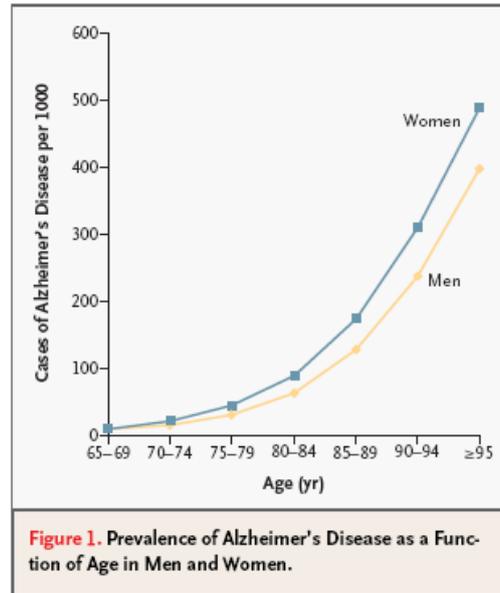


Figura 1. Prevalencia de la EA según sexo y edad.

Según datos publicados en 2001 por la Organización Mundial de la Salud⁸, se estimaba en 18 millones el número de pacientes afectados por la EA en todo el mundo y se calcula que para el año 2050, considerando el aumento y envejecimiento de la población, este número subirá a unos 70 millones si no se encuentra un tratamiento eficaz⁹.

La EA es una EN crónica y progresiva, lo que supone que el coste del cuidado de estos pacientes es enorme, tanto para los cuidadores como para la sociedad. Estos implican costes directos como los destinados al cuidado en sí mismo (p. ej. contratar los servicios de personal sanitario), e indirectos, como la pérdida de productividad y tiempo de los cuidadores. El gasto promedio se eleva en función del grado de severidad de la enfermedad. Según datos de 1996, el coste generado por los cuidados de un paciente de EA ascendía a 18.408, 30.096 y 36.132 \$/año según el grado leve, moderado o grave de la enfermedad, respectivamente¹⁰. En el estudio de la Organización Mundial de la Salud anteriormente citado⁸, se cifraban los costes directos y totales en Estados Unidos

⁸ Alzheimer's Disease: The Brain Killer. World Health Organization (2001). http://searo.who.int/LinkFiles/Health_and_Behaviour_alzheimers.pdf.

⁹ Sloane, P. D.; Zimmerman, S.; Suchindran, C.; Reed, P.; Wang, L.; Boustani, M.; Sudha, S. The public health impact of Alzheimer's disease, 2000-2050: potential implication of treatment advances. *Annu. Rev. Public. Health.* **2002**, *23*, 213-31.

¹⁰ Leon, J.; Cheng, C. K.; Neumann, P. J. Alzheimer's disease care: costs and potential savings. *Health Aff (Millwood).* **1998**, *17*, 206-16.

durante el año 2000 en 536.000 millones y 1.75 billones de dólares respectivamente. El lapso de tiempo entre el diagnóstico de EA y la muerte del paciente oscila entre 4 y 12 años por término medio, según la edad del paciente. Además del costo monetario, muchos esposos/as y familiares cuidan a pacientes de EA durante estos años, con efectos devastadores a nivel emocional, físico, psíquico, financiero, etc., imposibles de cuantificar. Puede entenderse que, aunque no sea la solución definitiva, cualquier fármaco capaz de aliviar o retrasar los síntomas es bienvenido.

2.2. Historia.

En noviembre de 1906 tuvo lugar la 37ª Conferencia de Psiquiatras Alemanes en Tubinga, donde Alois Alzheimer describió el caso de una paciente de 51 años, Auguste D., ingresada en 1901 en el hospital de Frankfurt y fallecida unos meses después. Dicha paciente presentaba un cuadro de demencia senil que no se correspondía con su edad, con pérdida de memoria, desorientación, alucinaciones y demencia en general. La necropsia de su cerebro mostró una corteza cerebral reducida (atrofiada) y dos tipos de



anomalías muy llamativas, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, característicos de la forma de demencia que a partir de 1910 se conoce como enfermedad de Alzheimer. Si bien la demencia senil estaba bien descrita desde el siglo XIX, la primera descripción de la EA fue publicada en 1907¹¹. Alois Alzheimer continuó estudiando otros casos de esta enfermedad, describiendo el caso de un segundo paciente, Johann F. fallecido en 1911 con 57 años, donde se incluían dibujos de neurofibrillas de Auguste D¹². Estos trabajos quedaron prácticamente olvidados, en gran parte debido a que la baja esperanza de vida (comparada con la actual) hacía que los casos de EA fueran bastante escasos. Ya en las décadas 70 y 80 del siglo XX se retoma el interés por la EA y comienzan a estudiarse en profundidad causas, tratamientos, etc. En 1995, 80 aniversario de la muerte de A. Alzheimer (fallecido a los 51 años de un ataque al corazón), se le rinden distintos homenajes y se hace pública la perdida historia clínica

¹¹ Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*. **1907**, 64, 146–148.

¹² Alzheimer, A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*. **1911**, 4, 356–385.

de Auguste D. en la que Alzheimer describe su situación familiar, conversaciones y pruebas, datos clínicos y detalles del curso de su enfermedad y muerte, incluyendo una diagnosis histopatológica¹³. En 1997 la revista Lancet publica un artículo resumiendo estos datos históricos, incluyendo la foto de Auguste D. que encabeza este apartado, de las cuatro que aparecían en su historia clínica¹⁴.

2.3. Patología y neuroquímica de la EA¹⁵.

La EA es un proceso neurodegenerativo, compartiendo algunos de sus cambios patológicos con otras EN. Una de las principales características de la EA es la pérdida neuronal progresiva que afecta de forma selectiva a circuitos neurológicos en la corteza, hipocampo, amígdala, tálamo anterior y núcleos basales¹⁶. Estos déficits están asociados a una pérdida importante de proyecciones corticales de las neuronas colinérgicas, y a una reducción en los marcadores presinápticos del sistema colinérgico, especialmente en las áreas del cerebro relacionadas con la memoria y el aprendizaje^{17,18,19}. Además, si bien en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la EA, tampoco está claro cuales son estos cambios iniciales o desencadenantes de la cascada de procesos que conduce a la enfermedad y posterior aparición de los síntomas, se supone que varios años después.

Los primeros síntomas aparecen como pérdidas de memoria a corto plazo, que llegan hasta el no reconocimiento de familiares o el olvido de habilidades normales para el individuo, dificultades de orientación, problemas del lenguaje, alteraciones cognitivas y pérdida de la capacidad de aprendizaje. Según avanza la enfermedad estos síntomas se agravan hasta la falta total de orientación y cambios en el comportamiento que incluyen fases de ansiedad y arrebatos de violencia. En las fases finales se deteriora la

¹³ O'Brien, C. Auguste, D. and Alzheimer's disease. *Science*. **1996**, 273, 28.

¹⁴ Maurer, K.; Volk, S.; Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*. **1997**, 349, 1546-9.

¹⁵ Medicinal Chemistry of Alzheimer's Disease. Transworld Research Network. Ed. By Martinez, A. **2008**.

¹⁶ Price, D. L.; Tanzi, R. E.; Borchelt, D. R.; Sisodia, S. S. Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu Rev Genet*. **1998**, 32, 461-93.

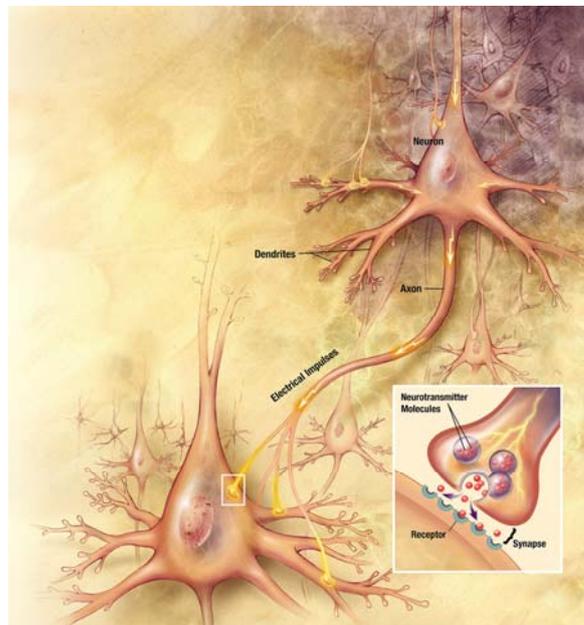
¹⁷ Bartus, R. T.; Dean, R. L.; Beer, B.; Lippa, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. **1982**, 217, 408-14.

¹⁸ Davies, P.; Maloney, A. J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. **1976**, 2, 1403.

¹⁹ Perry, E. K.; Perry, R. H.; Blessed, G.; Tomlinson, B. E. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol*. **1978**, 4, 273-7.

musculatura y la movilidad, con pérdida del control de las funciones corporales como el control de esfínteres, de la capacidad para comer o tragar y eventual muerte por infección o malnutrición. Como se dijo anteriormente, es un proceso muy lento, con un tiempo medio de 8 años entre la aparición de los primeros síntomas y la muerte²⁰.

Conviene hacer un pequeño comentario para llamar la atención sobre la complejidad del cerebro: este órgano que controla todas las funciones corporales llamadas centrales pesa, en un ser humano adulto, entre 1.2 y 1.5 Kg, aproximadamente un 2% del peso corporal total, pero su metabolismo precisa casi el 20 % de todo el oxígeno que consume el cuerpo, y además en un aporte continuo ya que una falta de oxígeno a nivel neuronal provocaría su muerte de forma irreversible, quedando secuelas permanentes²¹. Tal vez esta cifra no



sea tan sorprendente si se tiene en cuenta que en el cerebro existen aproximadamente 100.000 millones de neuronas conectadas por 100 billones (millones de millones) de sinapsis o uniones sinápticas como la representada en la figura adjunta.

2.3.1. Neurotransmisión colinérgica.

La causa inmediata de estos fallos cognitivos, al menos en las primeras etapas, es la disminución de los niveles de neurotransmisores que constituyen la comunicación sináptica, en especial de acetilcolina (ACh), dado que la transmisión colinérgica está especialmente dañada en la EA. Teniendo en cuenta que la ACh resulta hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), los inhibidores de esta enzima mejorarían la neurotransmisión y con ello la capacidad cognitiva de los pacientes.

²⁰ Larson, E. B.; Shadlen, M. F.; Wang, L.; McCormick, W. C.; Bowen, J. D.; Teri, L.; Kukull, W. A. Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.* **2004**, *140*, 501-9.

²¹ Smith, D. G.; Cappai, R.; Barnham, K. J. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta.* **2007**, *1768*, 1976-1990.

La ACh se produce en el citosol por acción de la enzima colinoacetilasa, también conocida como colín-acetil-transferasa (ChAT), siendo posteriormente almacenada en vesículas sinápticas desde las que, mediante un proceso de exocitosis dependiente de calcio, se libera al espacio sináptico. Allí ejerce su acción como neurotransmisor, uniéndose a los receptores muscarínicos y nicotínicos a ambos niveles pre y postsináptico. Una vez ejercida su acción sobre los diferentes receptores colinérgicos, la ACh es hidrolizada a colina y ácido acético mediante la acción de la acetilcolinesterasa (AChE). Una segunda enzima también implicada en la neurotransmisión colinérgica es la butirilcolinesterasa (BuChE)²². En cerebros sanos la AChE se encarga de hidrolizar del orden del 80% de ACh mientras que la BuChE juega un papel secundario, pero en cerebros afectados por la EA la actividad de la AChE se ve disminuida mientras se incrementa la de BuChE en un intento de las neuronas por mantener los niveles de ACh (Figura 2)²³.

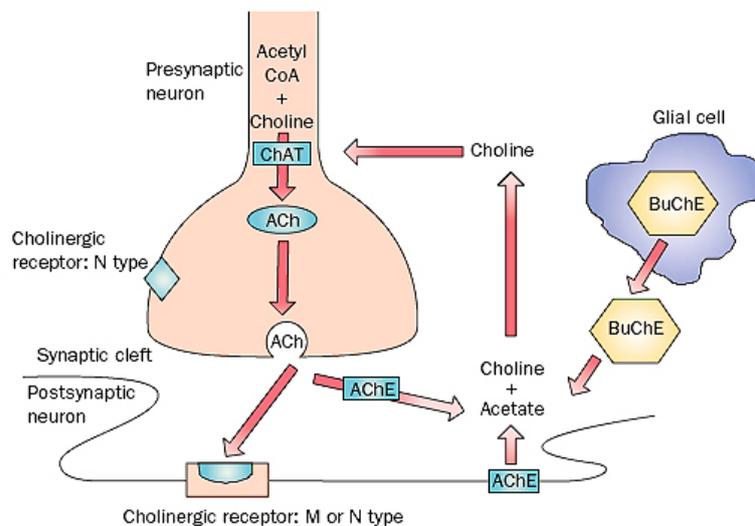


Figura 2. Neurotransmisión colinérgica.

²² Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131-138.

²³ Scarpini, E.; Scheltens, P.; Feldman, H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 539-47.

2.3.2. Placas amiloides.

Las dos señas de identidad más llamativas de la EA son las placas seniles (PS) y los ovillos neurofibrilares (ON), extra e intraneuronales respectivamente (*Figura 3*), que se observan sobre todo en corteza cerebral e hipocampo. Estas formaciones no son exclusivas de la EA, sino que están también presentes una, otra e incluso las dos, en mayor o menor extensión en otras EN como Parkinson, Huntington, prionosis y amiloidosis²⁴, y existe una razonable evidencia de que estos cambios conformacionales y asociativos de las proteínas, que dan lugar a las enfermedades, son producidos por moléculas o condiciones exógenas²⁵.

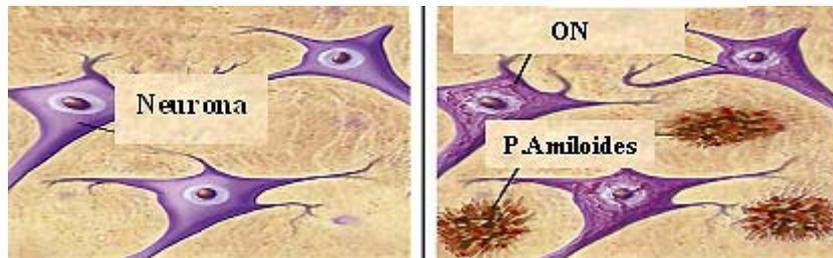


Figura 3. Neuronas de cerebro normal y de paciente EA.

Según va avanzando la enfermedad se va produciendo una pérdida masiva de tejido neuronal, en gran parte sustituido por las placas y los ovillos. En la *Figura 4* se aprecia la diferencia entre un cerebro normal y el de un paciente de EA.

²⁴ Agorogiannis, E. I.; Agorogiannis, G. I.; Papadimitriou, A.; Hadjigeorgiou, G. M. Protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2004**, *30*, 215-24.

²⁵ Walker, L. C.; Levine, H.; Mattson, M. P.; Jucker, M. Inducible proteopathies. *Trends. Neurosci.* **2006**, *29*, 438-43.

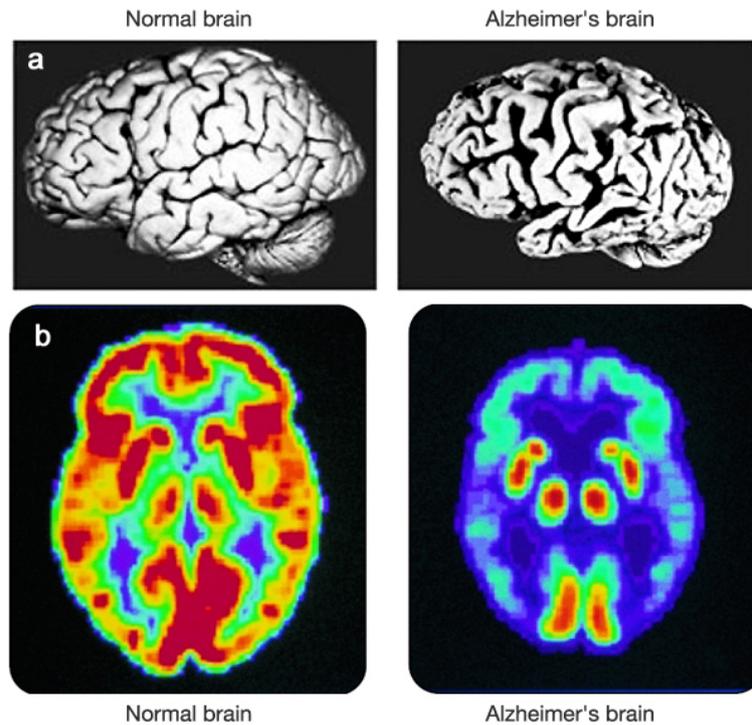


Figura 4. PET (Positron Emission Tomography) de cerebro normal y EA.

Las placas seniles o amiloides están básicamente formadas por agregados insolubles de fibrillas que a su vez son oligómeros de una proteína llamada β -amiloide (Abeta)²⁶. Son depósitos extracelulares con un tamaño variable de 10 a 120 μm , que pueden llegar a desplazar gran parte del tejido neuronal. Abeta está compuesta por 40-42 aminoácidos y se genera a partir de una proteína de membrana llamada APP²⁷ (*amyloid precursor protein*) por hidrólisis en dos puntos catalizada por las enzimas β - y γ -secretasas.

Es bien conocido desde hace mucho tiempo que un metabolismo anómalo de la APP se encuentra en el origen de la enfermedad²⁸, aunque todavía se desconoce cual es la causa desencadenante de esta desviación. En condiciones fisiológicas normales, la APP se procesa en más de un 90% por la acción secuencial de dos enzimas, las α - y γ -secretasas, en la llamada ruta no amiloidogénica, pues la hidrólisis producida por la α -secretasa²⁹ se produce hacia el centro de la secuencia de Abeta, impidiendo su

²⁶ Gorman, P. M.; Chakrabarty, A. Alzheimer beta-amyloid peptides: structures of amyloid fibrils and alternate aggregation products. *Biopolymers*. **2001**, *60*, 381-94.

²⁷ Wolfe, M. S.; Guénette, S. Y. APP at a glance. *J. Cell. Sci.* **2007**, *120*, 3157-61.

²⁸ Hardy, J.; Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 383-8.

²⁹ Postina, R. A closer look at alpha-secretase. *Curr Alzheimer Res.* **2008**, *5*, 179-186.

formación. Esta ruta genera un fragmento soluble (sAPP α) al que se atribuyen propiedades neuroprotectoras e incluso neurogénicas³⁰. En condiciones patológicas, la llamada ruta amilodogénica aumenta su importancia en detrimento de la hidrólisis *via* α -secretasa, la proteína APP es hidrolizada secuencialmente por las enzimas β - y γ -secretasa para dar lugar al oligopéptido Abeta con destino final en las placas seniles o amiloides extraneuronales (*Figura 5*)³¹. Conviene hacer especial hincapié en que una de las grandes incógnitas de la EA es el factor o conjunción de factores desencadenante de la cascada de procesos incorrectos que se dan en la enfermedad.

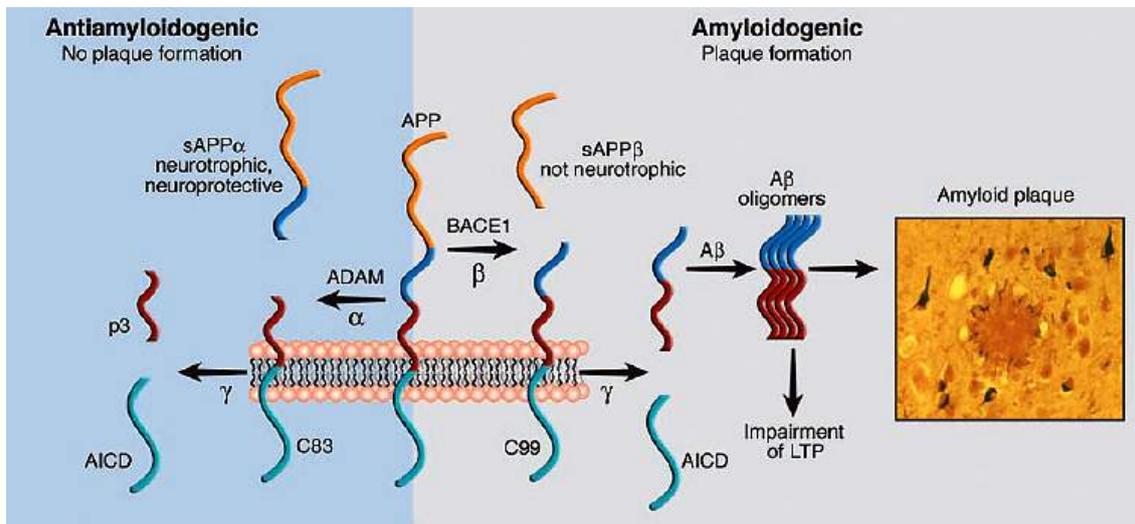


Figura 5. Hidrólisis de la APP por las dos rutas, fisiológicamente normal y amilodogénica.

Las placas seniles son depósitos extraneuronales formados mayoritariamente por Abeta en un proceso que incluye varios pasos (*Figura 6*)³²: los péptidos Abeta de 40 o 42 aminoácidos, solubles y fisiológicamente aceptables³³, pasan por distintas fases de polimerización a esferoides primero y oligómeros fibrilares, no necesariamente siguiendo un modelo fijo. Estas fibrillas iniciales sufren un cambio conformacional, de α -hélice a β -láminas que van formando agregados insolubles hasta formar la placa senil.

³⁰ Gralle, M.; Ferreira, S. T. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol.* **2007**, *82*, 11-32.

³¹ Lichtenthaler, S. F.; Haass, C. Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*, 1384-7.

³² Talaga, P. Inhibitors of beta-amyloid aggregation: still an issue of structure and function?. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 1.* **2004**, *1*, 7-12.

³³ LaFerla, F. M.; Green, K. N.; Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* **2007**, *8*, 499-509.

Por ser tan llamativas, estas placas ocupaban el centro de la hipótesis amiloide original³⁴ pero en la actualidad se piensa que la capacidad neurotóxica se encuentra principalmente en formas intermedias prefibrilares, oligómeros solubles y protofibrillas producidas durante la formación de las placas, de forma que los grandes agregados de proteínas podrían ser simplemente inactivos o incluso un intento por parte de la neurona de inactivar las especies neurotóxicas y deshacerse de ellas.

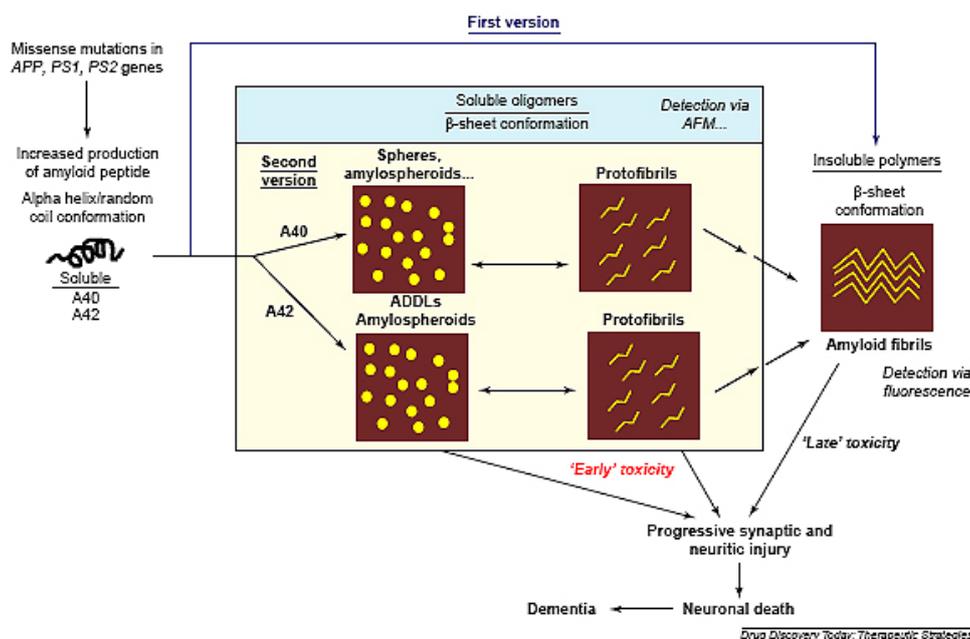


Figura 6. Actualización de la hipótesis de la cascada amiloide donde las especies neurotóxicas son oligómeros solubles.

Por otra parte, ya desde 1997 se conocía que la AChE desarrollaba otras funciones no colinérgicas y favorecía la agregación de Abeta³⁵, y poco después quedó demostrado que dicha actividad residía en el sitio periférico (PAS: *peripheral anionic site*) de la enzima³⁶. Recientemente se ha publicado una extensa revisión de esta relación³⁷, de la que se tratará más adelante en el apartado de fármacos de acción dual.

³⁴ Hardy, J.; Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 383-8.

³⁵ Alvarez, A.; Opazo, C.; Alarcon, R.; Garrido, J.; Inestrosa, N.C. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 348-61.

³⁶ Johnson, G.; Moore, S. W. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. *Biochem Biophys Res Commun.* **1999**, *258*, 758-62.

³⁷ Inestrosa, N. C.; Dinamarca, M.C.; Alvarez, A. Amyloid-cholinesterase interactions. *Implications for Alzheimer's disease.* **2008**, *275*, 625-632.

En resumen, Abeta es un producto natural presente en cerebro y líquido cefalorraquídeo en individuos sanos y su simple presencia no causa neurodegeneración, sino que la autoasociación o agregación de las moléculas de Abeta es esencial para la toxicidad. Actualmente existen datos experimentales que apoyan esta idea³⁸. También sobre este tema se ha publicado recientemente una revisión que trata exhaustivamente el tema³⁹. El péptido Abeta está implicado en varios procesos tóxicos⁴⁰ tales como la alteración de la homeostasis del Ca²⁺, apoptosis, la intercalación directa en la membrana celular, generación de radicales libres, inflamación de la microglía o la inducción de la formación de ovillos neurofibrilares.

2.3.3. Ovillos neurofibrilares.

En células eucarióticas, la fosforilación reversible de residuos de serina, treonina y tirosina provoca cambios conformacionales y variaciones en sus propiedades biológicas que suponen el principal mecanismo de control en la mayoría de los eventos intracelulares⁴¹. Esto también es aplicable a una proteína llamada tau, perteneciente a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) que forman el citoesqueleto, y que es el principal componente de los ovillos neurofibrilares, la otra gran señal de identidad de la EA junto con las placas seniles.

Los ovillos neurofibrilares son estructuras intraneuronales situadas en el citoplasma de la célula, principalmente en las cortezas frontal, temporal y parietal, en hipocampo y amígdala. Su componente principal es la proteína tau, si bien un análisis proteómico recientemente publicado revela la existencia de nada menos que 155 proteínas, 63 de ellas desconocidas en cuanto asociadas a ON⁴². Se expresa principalmente en neuronas

³⁸ Ma, Q. L.; Lim, G. P.; Harris-White, M. E.; Yang, F.; Ambegaokar, S. S.; Ubeda, O. J.; Glabe, C. G.; Teter, B.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. Antibodies against beta-amyloid reduce Abeta oligomers, glycogen synthase kinase-3beta activation and tau phosphorylation in vivo and in vitro. *J. Neurosci. Res.* **2006**, *83*, 374-84.

³⁹ Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. Abeta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1172-84.

⁴⁰ Small, D. H.; Mok, S. S.; Bornstein, J. C. Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci.* **2001**, *2*, 595-8.

⁴¹ Yoshida, H.; Goedert, M. Molecular cloning and functional characterization of chicken brain tau: isoforms with up to five tandem repeats. *Biochemistry.* **2002**, *41*, 15203-11.

⁴² Wang, Q.; Woltjer, R. L.; Cimino, P. J.; Pan, C.; Montine, K. S.; Zhang, J.; Montine, T. J. Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease identifies GAPDH as a detergent-insoluble paired helical filament tau binding protein. *FASEB J.* **2005**, *19*, 869-71.

donde juega un importante papel en la unión de los monómeros de tubulina para formar los microtúbulos que constituyen el esqueleto neuronal, mantienen la forma de la célula y sirven como rutas para el transporte axonal de nutrientes y otras moléculas entre el cuerpo de la célula y el extremo del axón (Figura 7)⁴³.

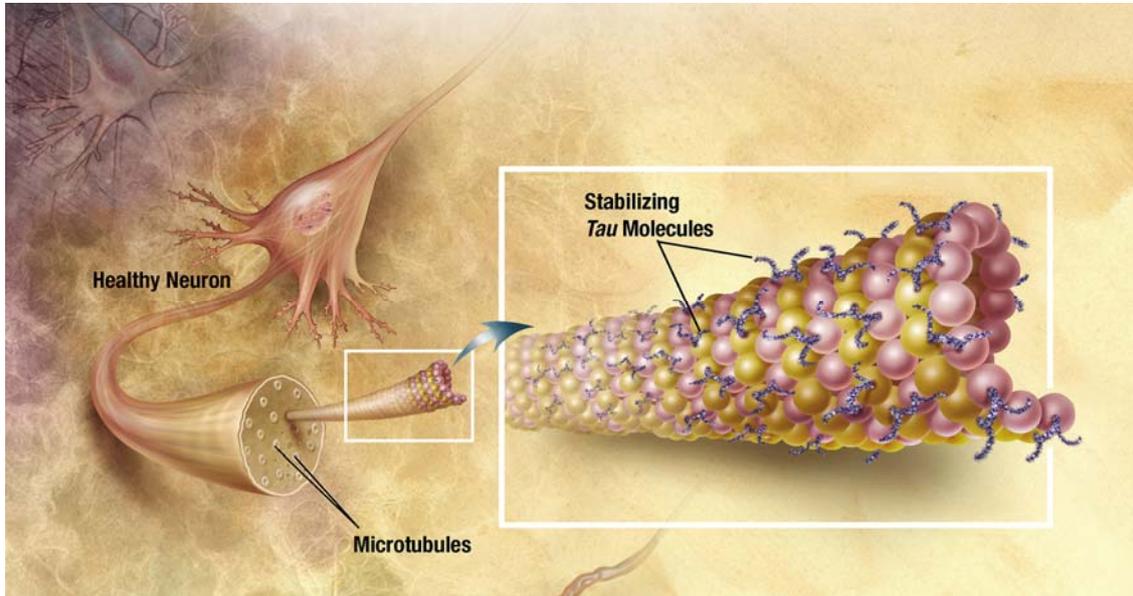


Figura 7. Microtúbulos en una neurona sana.

Esta proteína tau y su papel fisiológico son bien conocidos desde hace mucho tiempo, así como su implicación en procesos neurodegenerativos en general y en la EA en particular. El buen funcionamiento de tau viene regulado por un equilibrio fosforilación-hidrólisis (es decir, quinasas-fosfatasas)⁴⁴, pero en situaciones patológicas dicho equilibrio se rompe y tau es hiperfosforilada de manera aberrante por una serie de quinasas, especialmente la llamada GSK-3 β , y pierde su función en los microtúbulos. La neurona responde a la pérdida de niveles de tau aumentando la producción de otras proteínas asociadas a microtúbulos, como MAP1A/MPA1B y MAP2, pero el problema es que la nueva tau disfuncional, hiperfosforilada, es tóxica. Así, la neurona afectada intenta defenderse de esta tau tóxica de dos maneras, 1) sintetizando nuevas cantidades de tau normal y 2) empaquetando la tau tóxica, fosforilada, en polímeros inertes, los ON formados por los filamentos helicoidales apareados, pero inevitablemente sufre una

⁴³ Buée, L.; Bussière, T.; Buée-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* **2000**, *33*, 95–130.

⁴⁴ Mi, K.; Johnson, G. V. The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2006**, *3*, 449-63.

lenta y progresiva degeneración. Esta patología es característica tanto de EA como de otras tauopatías y resulta evidente que impedir la hiperfosforilación aberrante de tau mediante inhibición controlada de la quinasa GSK3 β es una de las aproximaciones terapéuticas más prometedoras para su tratamiento.

En las condiciones patológicas de EA el equilibrio antes mencionado se rompe y tau se hiperfosforila de forma irreversible en distintos puntos de su molécula por la acción de un grupo de quinasas, siendo la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3)⁴⁵ la que desarrolla el papel principal. En estas condiciones de hiperfosforilación, tau es incapaz de cumplir su función y los microtúbulos degeneran (*Figura 8*) y con ellos la neurona. La proteína tau se ubica en lugares anormales del citoplasma y polimeriza formando filamentos que forman agregados dobles (PHF, *paired helical filaments*) que a su vez se enredan entre sí formando la maraña conocida como ovillos neurofibrilares (ON, *neurofibrillary tangles NFT*)⁴⁶. Tampoco los daños causados por la hiperfosforilación aberrante de tau son exclusivos de EA, pues también se presenta en una serie de procesos neurodegenerativos llamados tauopatías, tales como la demencia frontotemporal, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear y degeneración corticobasal⁴⁷. En 2005 la revista *Biochimica et Biophysica Acta* publicó un número monográfico dedicado a este tema al que pertenece la referencia anterior.

⁴⁵ Ali, A.; Hoeflich, K. P.; Woodgett, J. R. Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2527-40.

⁴⁶ Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 425-7.

⁴⁷ Iqbal, K.; Alonso Adel, C.; Chen, S.; Chohan, M. O.; El-Akkad, E.; Gong, C. X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; Tanimukai, H.; Grundke-Iqbal, I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1739*, 198-210.

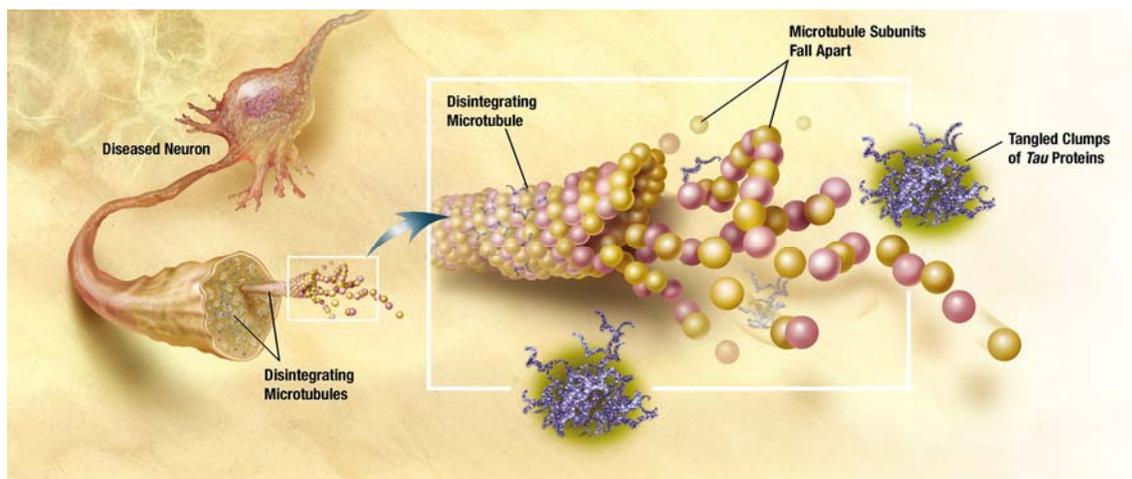


Figura 8. Degeneración de los microtúbulos en una neurona enferma y formación de los ON.

Después de una larga controversia⁴⁸, actualmente está claro que la hipótesis amiloide está más en el origen de EA que la hipótesis de tau⁴⁹. También hay total evidencia de una estrecha relación entre ambas patologías, amiloide y tau⁵⁰, pero no está bien definida esta relación pese a que es un tema de estudio desde hace bastante tiempo⁵¹. Es un campo de máxima actualidad, fomentado por la cada vez más amplia disponibilidad de ratones transgénicos y que da lugar a diferentes hipótesis basadas en algunos resultados experimentales, como la formación de un complejo soluble entre el péptido amiloide y tau⁵² o la activación de GSK-3 β por óxido nítrico⁵³. Sin duda es un aspecto que, cuando esté descifrado, supondrá un gran paso adelante en el conocimiento de EA y sus posibles tratamientos, y no es aventurado suponer que, dado el esfuerzo que se está haciendo en este campo, no está demasiado lejano el momento en que esta relación quede aclarada.

⁴⁸ Mudher, A.; Lovestone, S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?. *Trends Neurosci.* **2002**, *25*, 22-6.

⁴⁹ Oddo, S.; Billings, L.; Kesslak, J. P.; Cribbs, D. H.; LaFerla, F. M. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron.* **2004**, *43*, 321-32.

⁵⁰ Oddo, S.; Caccamo, A.; Tran, L.; Lambert, M. P.; Glabe, C. G.; Klein, W. L.; LaFerla, F. M. Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1599-604.

⁵¹ Busciglio, J.; Lorenzo, A.; Yeh, J.; Yankner, B. A. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron*, **1995**, *14*, 879-88.

⁵² Guo, J. P.; Arai, T.; Miklossy, J.; McGeer, P. L. Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 1953-8.

⁵³ Zhang, Y. J.; Xu, Y. F.; Liu, Y. H.; Yin, J.; Wang, J. Z. Nitric oxide induces tau hyperphosphorylation via glycogen synthase kinase-3beta activation. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6230-6.

2.3.4. Procesos oxidativos.

Otras posibles causas que se ha sugerido puedan estar en el origen de la EA son los procesos inflamatorios⁵⁴, colesterol⁵⁵ y, sobre todo, los agentes oxidantes. En la fosforilación oxidativa mitocondrial una célula utiliza 10^{13} moléculas de oxígeno al día, de las que el 1% se transforma en el anión radical superóxido $O_2^{\cdot-}$, lo que implica que se producen aproximadamente 10^{11} radicales libres por célula al día. En las neuronas la generación de estas especies es aún más elevada debido a su alto consumo de oxígeno, puesto que el cerebro utiliza el 20% del oxígeno basal a pesar de constituir solamente el 2-3% de la masa corporal total, como se dijo anteriormente. En un principio las especies reactivas oxidantes (ROS) se consideraban perjudiciales para las células por su relación con diversas enfermedades, pero actualmente se sabe que también están implicadas en la modulación de diversas funciones biológicas: activación de la cascada de las MAP-quinasas, transporte de iones, movilización de calcio, apoptosis, etc.

Normalmente, existe un equilibrio entre la generación de ROS y su neutralización. Este equilibrio se rompe cuando la cantidad de radicales supera la capacidad de los sistemas enzimáticos endógenos antioxidantes, dando lugar al estrés oxidativo.

Está fuera de duda que el estrés oxidativo aumenta con la edad y que los radicales libres y la disfunción mitocondrial pueden desencadenar enfermedades neurodegenerativas como la EA⁵⁶. Además se produce un círculo vicioso ya que al ser la mitocondria la mayor productora de ROS (H_2O_2 , OH^{\cdot} , y $O_2^{\cdot-}$) su exposición a estas especies sería mayor, aumentando sus lesiones oxidativas⁵⁷. Normalmente, el radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ generado es neutralizado por la enzima mitocondrial superóxido dismutasa que lo transforma en H_2O_2 , que a su vez es reducida a H_2O mediante la glutatión peroxidasa o la catalasa. Sin embargo, el H_2O_2 puede ser convertida en el radical hidroxilo en

⁵⁴ Pasinetti, G. M. Inflammatory mechanisms in neurodegeneration and Alzheimer's disease: the role of the complement system. *Neurobiol. Aging*. **1996**, *17*, 707-16.

⁵⁵ Canevari, L.; Clark, J. B. Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 739-50.

⁵⁶ Leuner, K.; Hauptmann, S.; Abdel-Kader, R.; Scherping, I.; Keil, U.; Strosznajder, J. B.; Eckert, A.; Müller, W.E. Mitochondrial dysfunction: the first domino in brain aging and Alzheimer's disease?. *Antioxid Redox Signal*. **2007**, *9*, 1659-1675.

⁵⁷ Boveris. A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1997**, *78*, 67-82.

presencia de metales de transición reducidos (principalmente, cobre y hierro) a través de la reacción de Fenton⁵⁸. Las ROS también se pueden generar por interacción directa del oxígeno con iones metálicos o con metaloproteínas como el mismo Abeta, superóxido dismutasa (SOD), α -sinucleína o α -cristalina, como se representa en la *Figura 9*⁵⁹. En cualquier caso, está perfectamente demostrado el papel de los iones metálicos, en especial cobre y hierro, en la disfunción que conduce al estrés oxidativo.

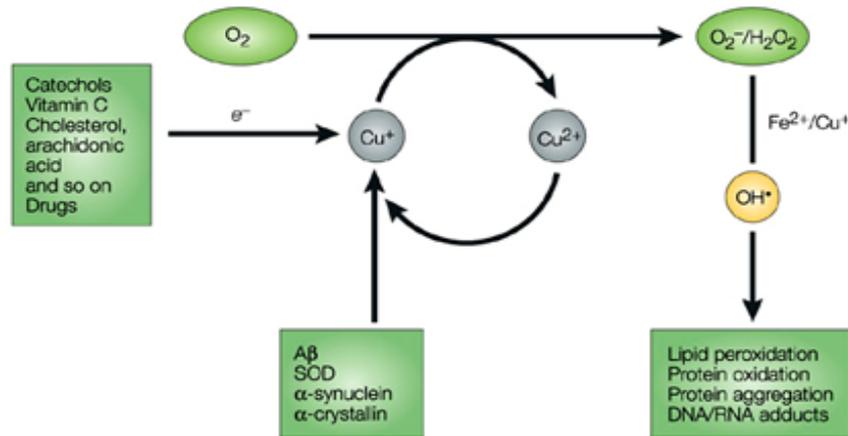


Figura 9. Generación de ROS por una reacción anormal del O_2 con proteínas que coordinan con Fe y Cu.

De especial importancia es el ataque de los radicales a los dobles enlaces de los lípidos, lo que produce radicales peroxilipídicos que a su vez generan una cascada de ataque a otros lípidos insaturados. Como producto final, se forma 4-hidroxi-2,3-nonanal (HNE), del que se observa un alto nivel en pacientes con las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson. El HNE modifica proteínas en residuos de lisina, histidina y cisteína originando una multitud de efectos con el resultado final de un fuerte aumento de la concentración de calcio intracelular, induciéndose la muerte celular.

En apartados anteriores se comentó la relación de Abeta con AChE y con la fosforilación de tau. También existe una estrecha relación de Abeta con los procesos

⁵⁸ Castellani, R.; Hirai, K.; Aliev, G.; Drew, K.; Nunomura, A.; Takeda, A.; Cash, A.; Obrenovich, M.; Perry, G.; Smith, M. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *J. Neurosci. Res.* **2002**, 70, 357-360.

⁵⁹ Barnham, K.; Masters, C.; Bush, A. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, 3, 205-214.

oxidativos y la disfunción de la homeostasis de Ca^{2+} , que confirma el papel central de Abeta en la patología de EA y la estrecha relación entre los distintos procesos patológicos que existen en EA representados en la *Figura 10*⁶⁰. Con el envejecimiento natural, el cerebro acumula metales como cobre, hierro y zinc⁶¹, controlados por la presencia de abundantes antioxidantes que evitan la formación de ROS por reducción de estos metales y activación de oxígeno molecular (la reacción de Fenton ya citada)⁶². En este aspecto, Abeta muestra una doble personalidad: en principio Abeta posee una serie de propiedades tróficas, derivadas de que pertenece al grupo de proteínas capaces de complejar metales redox, en especial Cu, controlando su concentración y evitando que participen en procesos redox no deseados. Por otra parte, el estrés oxidativo promueve la formación de más Abeta del fisiológicamente aceptable, de forma que cuando los mecanismos antioxidantes no son capaces de controlar las especies radicálicas aparece un aumento de Abeta, posiblemente como un intento de eliminar el exceso de ROS⁶³.

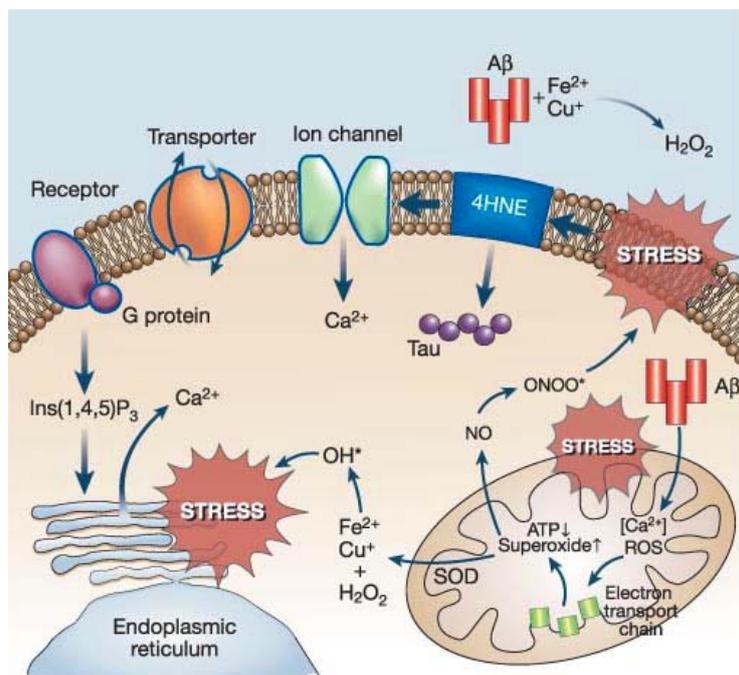


Figura 10. Relaciones entre estrés oxidativo y otros procesos patológicos de la EA.

- ⁶⁰ Mattson, M. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. **2004**, 420, 631-639.
- ⁶¹ Castellani, R. J.; Moreira, P. I.; Liu, G.; Dobson, J.; Perry, G.; Smith, M. A.; Zhu, X. Iron: the Redox-active center of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurochem Res*. **2007**, 32, 1640-1645.
- ⁶² Smith, D. G.; Cappai, R.; Barnham, K. J. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta*. **2007**, 1768, 1976-1990.
- ⁶³ Atwood, C. S.; Obrenovich, M. E.; Liu, T.; Chan, H.; Perry, G.; Smith, M. A.; Martins, R. N. Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res Rev*. **2003**, 43, 1-16.

2.3.5. Ca^{2+} y enfermedad de Alzheimer.

Las células en general utilizan un sistema de comunicación basado en señales eléctricas y químicas. Desde hace muchos años se conoce que los iones Ca^{2+} juegan un papel fundamental en ambos mecanismos, por ejemplo manteniendo la correcta polarización de las distintas membranas celulares o como moduladores de las múltiples enzimas Ca^{2+} -dependientes implicadas en múltiples procesos del ciclo celular.

La concentración de Ca^{2+} citosólico es muy inferior a la del medio extracelular, de forma que el equilibrio u homeostasis entre ambas concentraciones es crucial para el correcto funcionamiento de los procesos celulares. Esta homeostasis del Ca^{2+} viene controlada por la entrada de iones a través de los llamados canales de calcio, dependientes del voltaje, modulados por el distinto grado de polarización de la membrana⁶⁴ o por liberación de Ca^{2+} a partir de depósitos intracelulares en el retículo endoplásmico, y por la salida de intercambiadores y bombas de la membrana plasmática.

Ya en 1994 se propuso la hipótesis de que la desregulación de la homeostasis del calcio juega un papel central⁶⁵, equivalente en importancia a la proteína amiloide, y que fue muy pronto avalada por datos experimentales que mostraban alteraciones en el sistema de señales del calcio, tanto en la EA esporádica como familiar⁶⁶. Actualmente está fuera de toda duda una estrecha relación entre alteraciones en la concentración de Ca^{2+} y el metabolismo de APP, y también hay claras evidencias de la implicación del calcio en la fosforilación de tau⁶⁷. Esto significa que la disfunción de la homeostasis de Ca^{2+} se encuentra muy en el origen de EA, al mismo nivel de la neurotoxicidad inducida por

⁶⁴ Tsien, R. W.; Lipscombe, D.; Madison, D. V.; Bley, K. R.; Fox, A. P. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* **1988**, *11*, 431-438.

⁶⁵ Khachaturian, Z. S. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci.* **1994**, *747*, 1-11.

⁶⁶ La Ferla, F. M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* **2002**, *3*, 862-872.

⁶⁷ Bojarski, L.; Herms, J.; Kuznicki, J. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* **2008**, *52*, 621-633.

Abeta o tal vez, como comienzan a proponer algunas hipótesis recientes, en una fase anterior⁶⁸.

2.4. Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

Como se ha dicho en apartados anteriores, la EA es una enfermedad asociada al envejecimiento y por tanto presenta una alta prevalencia en los países desarrollados, con una esperanza de vida muy alta. Además, su peculiar sintomatología genera unos enormes gastos económicos y sociales en el cuidado de los pacientes, por otro lado sin esperanza de recuperación. Con estas premisas es fácil entender que en las últimas décadas se haya hecho una enorme inversión en trabajo y fondos para encontrar algún tratamiento de la enfermedad, al menos paliativo, capaz de aliviar los síntomas o retrasar su aparición. No se ha encontrado este tratamiento definitivo y actualmente sólo existen en mercado unos pocos fármacos que proporcionan una mejoría sintomática temporal, que no es poco dadas las terribles características de la enfermedad.

Para lo que sí ha servido este gran trabajo de investigación es para ir teniendo un mayor conocimiento del complejo carácter multifuncional de la enfermedad, en que una serie de factores (oxidación, amiloide, calcio, proteína tau, transmisión colinérgica.... entre otros) parecen guardar una estrecha relación entre si.

En este apartado se va a comentar los tratamientos ya existentes y los potenciales en un futuro, atacando una o más de las disfunciones o factores causantes de la enfermedad. Comenzando por un subapartado dedicado al diagnóstico o, mejor dicho, la falta de diagnóstico de la enfermedad y las aproximaciones que se siguen para encontrar un biomarcador fiable y de aplicación rutinaria.

2.4.1. Diagnóstico.

Hoy por hoy no existe un marcador que permita el diagnóstico de la enfermedad, ni en las primeras fases ni en fases avanzadas, y el único diagnóstico definitivo es *post mortem*, la autopsia del cerebro. Esto representa una enorme desventaja respecto de otras enfermedades a la hora de encontrar un tratamiento, pues se acepta en general que

⁶⁸ Stutzmann, G. E. The pathogenesis of Alzheimers disease. Is it a lifelong "calciumopathy"?. *Neuroscientist*. **2007**, *13*, 546-559.

pasan bastantes años (entre 8 y 20 según distintas hipótesis y pacientes) entre las primeras disfunciones moleculares (oxidación, amiloide, calcio...) y la aparición de los primeros síntomas. En la actualidad, los únicos diagnósticos disponibles de la EA están basados en criterios clínicos, es decir, cuando ya han aparecido los primeros síntomas⁶⁹. El método empleado se denomina MMSE (*Mini Mental Score Examination*)⁷⁰, posteriormente mejorado en el llamado 3MS (*Modified Mini-Mental State Exam*)⁷¹, que evalúan aspectos de orientación, atención, memoria, lenguaje y habilidad para realizar tareas sencillas. Se sigue trabajando en conseguir métodos clínicos que ofrezcan una mayor precisión y, sobre todo, sean capaces de detectar la enfermedad en los niveles más bajos posible, como el nuevo método BST (*Block Suppression Test*) que parece conseguir diagnósticos más precisos que los métodos anteriores⁷², pero siempre cuando los síntomas ya se han manifestado.

Un marcador realmente funcional sería aquel que pudiera obtenerse de forma sencilla y fuera cuantificable con precisión de manera rutinaria, como los marcadores que aparecen en los análisis de sangre u orina (glucosa, colesterol, etc). Lo más parecido a este marcador ideal que se conoce en la actualidad sería el análisis de Abeta y/o tau en el fluido cerebroespinal (CSF)^{73,74}. También se han hecho estudios de proteómica, buscando diferencias en el modelo proteico presente en CSF entre pacientes de EA e individuos sanos, con muy buenos resultados⁷⁵, pero el problema reside en la punción medular necesaria para obtener la muestra, con las dificultades y riesgos que implica. Teniendo en cuenta el papel central que juega el cerebro en el organismo, no es de extrañar que la propia evolución lo haya protegido de forma especial y así es en todo el SNC en general y en el cerebro en particular, que aparece como un órgano blindado,

⁶⁹ Holzer, C.; Warshaw, G. Clues to early Alzheimer dementia in the outpatient setting. *Arch. Fam. Med.* **2000**, *9*, 1066-70.

⁷⁰ Folstein, M. F.; Folstein, S. E.; McHugh, P. R. Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* **1975**, *12*, 189-98.

⁷¹ Teng, E. L.; Chui, H. C. The Modified Mini-Mental State (3MS) examination. *J. Clin. Psychiatry.* **1987**, *48*, 314-8.

⁷² Toepper, M.; Beblo, T.; Thomas, C.; Driessen, M. Early detection of Alzheimer's disease: a new working memory paradigm. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* **2008**, *23*, 272-278 .

⁷³ Blennow, K.; Zetterberg, H.; Minthon, L.; Lannfelt, L.; Strid, S.; Annas, P.; Basun, H.; Andreasen, N. Longitudinal stability of CSF biomarkers in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* **2007**, *419*, 18-22.

⁷⁴ Yamamori, H.; Khatoon, S.; Grundke-Iqbal, I.; Blennow, K.; Ewers, M.; Hampel, H. Iqbal K. Tau in cerebrospinal fluid: a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using tyramide signal amplification. *Neurosci Lett.* **2007**, *418*, 186-189.

⁷⁵ Finehout, E. J.; Franck, Z.; Choe, L. H.; Relkin, N.; Lee, K. H. Cerebrospinal fluid proteomic biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **2007**, *61*, 120-129.

muy delicado de manipular, de forma que obtener muestras biológicas donde se encuentre ese hipotético marcador no es tarea sencilla. Es decir, que aunque el procedimiento se demostrara eficaz sería difícil que llegara a ser considerado como análisis de rutina, si bien podría tener aplicación para evaluar la actividad de moléculas candidatas en pruebas clínicas.

Otra línea de investigación en diagnóstico es la obtención de imágenes cerebrales mediante MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) y PET (*Positron Emission Tomography*) mediante acumulación de imágenes (ver *Figura 4*)⁷⁶. También en este campo se está haciendo un gran esfuerzo investigador, en particular en el descubrimiento de ligandos marcados capaces de unirse a Abeta y que actúen como trazadores. Se puede aventurar que, debido al alto costo de la técnica, este sistema de análisis quede reducido, igual que los análisis de CSF, al estudio de mecanismos de acción y para evaluar la eficacia de potenciales medicamentos.

Sin embargo, en 2007 aparecieron dos trabajos realmente esperanzadores en los que se describían sendos estudios de proteínas plasmáticas en pacientes de demencia vascular⁷⁷ y EA⁷⁸ en comparación con individuos sanos. La hipótesis de partida es que una serie de procesos inmunes e inflamatorios, centrales y periféricos, asociados a la EA y otras EN son controlados por el cerebro mediante la emisión de proteínas de señal, por lo que los procesos patológicos presintomáticos que conducen a la EA producirían cambios característicos en la concentración de estas proteínas-señal en sangre respecto de un cerebro no enfermo, generando un fenotipo detectable, específico de la enfermedad. Si bien aun es pronto para hacer previsiones reales, el hallazgo de estos biomarcadores podría idealmente conducir a un test rápido, sencillo y económico para detectar la EA en sus fases presintomáticas en que se manifiesta un leve deterioro cognitivo (*Mild Cognitive Impairment, MCI*), como en general se conoce esta etapa.

⁷⁶ Nestor, P. J.; Scheltens, P.; Hodges, J. R. Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 34-41.

⁷⁷ Bibl, M.; Esselmann, H.; Mollenhauer, B.; Weniger, G.; Welge, V.; Liess, M.; Lewczuk, P.; Otto, M.; Schulz, JB.; Trenkwalder, C.; Kornhuber, J.; Wiltfang, J. Blood-based neurochemical diagnosis of vascular dementia: a pilot study. *J Neurochem.* **2007**, *103*, 467-474.

⁷⁸ Bibl, M.; Esselmann, H.; Mollenhauer, B.; Weniger, G.; Welge, V.; Liess, M.; Lewczuk, P.; Otto, M.; Schulz, JB.; Trenkwalder, C.; Kornhuber, J.; Wiltfang, J. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med.* **2007**, *13*, 1359-1362.

2.4.2. Aproximación colinérgica. Productos en mercado.

En casi cualquier enfermedad, un potencial tratamiento será más eficaz cuanto más temprana sea la fase en que se aplique. Esto también es válido para la EA pero se encuentra con dos graves inconvenientes, entre otros: 1) inexistencia de diagnóstico en las fases iniciales que se supone dura un buen número de años y 2) carácter multifactorial de la EA. Esto unido a los terribles efectos de la enfermedad, para el paciente y también para su entorno, permite comprender la importancia de un tratamiento aunque solo sea sintomático pero capaz de retrasar durante algún tiempo las fases más severas de la enfermedad. Esta tremenda necesidad de conseguir un tratamiento, por limitado que sea, ha dado lugar a los productos comercializados para el tratamiento de la EA, cuatro inhibidores de AChE y un antagonista de NMDA (*Figura 11*):

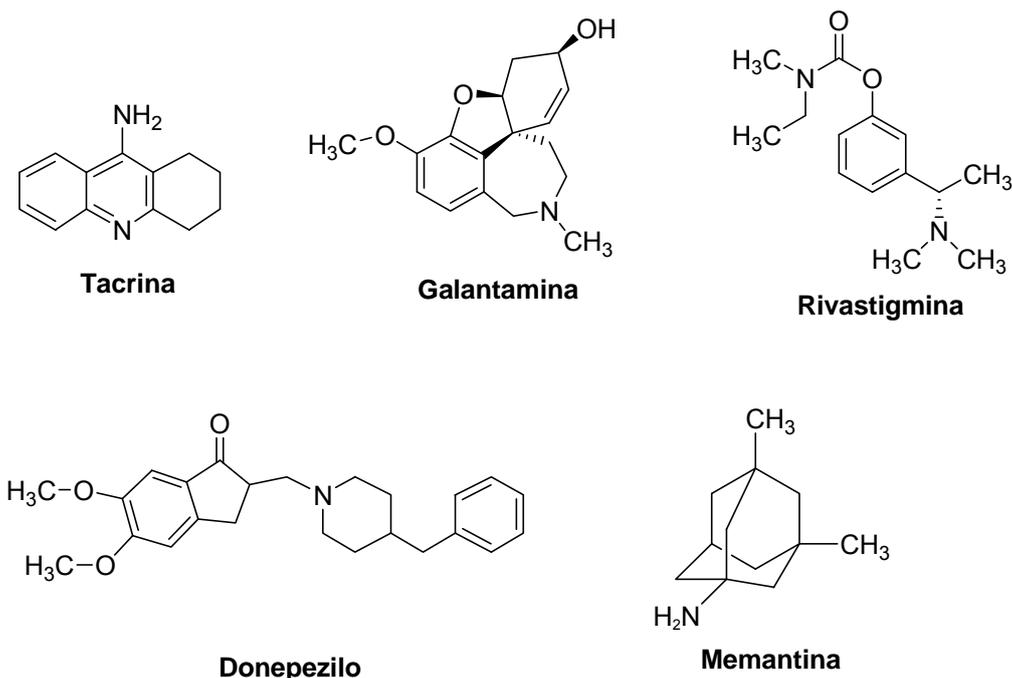


Figura 11. Fármacos actualmente en mercado para el tratamiento de EA.

Tacrina⁷⁹, actualmente en desuso debido a su baja eficacia y hepatotoxicidad si bien se sigue trabajando mucho en la obtención y evaluación de derivados suyos.

Donepezilo⁸⁰, que pese a haber sido aprobado por la FDA a mediados de los 90 sigue siendo el fármaco más utilizado⁸¹.

Galantamina⁸², un alcaloide utilizado desde hace mucho tiempo en la medicina tradicional del este de Europa como anestésico.

Rivastigmina⁸³, inhibidor de AChE y BChE.

Memantina⁸⁴, antagonista no competitivo del receptor NMDA.

Actualmente se conoce que el sistema colinérgico en general y AChE en particular juegan un papel en la EA mucho más amplio que la simple hidrólisis de ACh en la sinapsis, como pueden ser las rutas de señales mediadas por receptores colinérgicos que favorecen el procesado no amiloidogénico de APP, disminuyen la fosforilación de tau y decrecen la agregación de Abeta⁸⁵. También se conoce que en una zona en la entrada de la garganta que conduce al centro catalítico de la enzima se encuentra el llamado sitio periférico (PAS, *peripheral anionic site*), capaz de interactuar con oligómeros y fibrillas de Abeta, promoviendo su agregación⁸⁶. Esto abre el camino para moléculas que presenten más de una acción farmacológica, por ejemplo inhibición de AChE y de la agregación de Abeta, que serán comentadas en un próximo apartado.

⁷⁹ Malaguarnera, M.; Pistone, G.; Vinci, M.; Motta, M.; di Fazio, I.; Rampello, L. Tacrine treatment of Alzheimer's disease: many expectations, few certainties. *Neuropsychobiology*. **1998**, *38*, 226-31.

⁸⁰ Doody, R. S. Clinical profile of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease. *Gerontology*. **1999**, *45*, 23-32.

⁸¹ Boada-Rovira, M.; Brodaty, H.; Cras, P.; Baloyannis, S.; Emre, M.; Zhang, R.; Bahra, R. Efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a global, multinational, clinical experience study. *Drugs Aging*. **2004**, *21*, 43-53.

⁸² Villarroja, M.; García, A.G.; Marco-Contelles, J.; López, M. G. An update on the pharmacology of galantamine. *Expert Opin Investig Drugs*. **2007**, *16*, 1987-98.

⁸³ Grossberg, G.; Irwin, P.; Satlin, A.; Mesenbrink, P.; Spiegel, R. Rivastigmine in Alzheimer disease: efficacy over two years. *Am. J. Geriatr. Psychiatry*. **2004**, *12*, 420-31.

⁸⁴ Rogawski, M. A.; Wenk, G. L. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug. Rev.* **2003**, *9*, 275-308.

⁸⁵ Hellström-Lindahl, E. Modulation of beta-amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation by acetylcholine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *393*, 255-263.

⁸⁶ Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol.* **2003**, *65*, 407-416.

Una segunda enzima, la butirilcolinesterasa (BuChE)⁸⁷, también hidroliza ACh, si bien de forma más lenta y menos específica que AChE. En cerebros sanos la AChE hidroliza en torno al 80 % de ACh mientras que la BuChE juega un papel secundario. En cerebros con EA la actividad de AChE decrece mientras la de BuChE aumenta en un intento por parte de las neuronas de mantener los niveles de ACh.

Sin duda los inhibidores de AChE y BuChE siguen siendo moléculas potencialmente interesantes como lo demuestra el mucho trabajo que se sigue haciendo y la gran variedad de estructuras activas descubiertas^{88,89}.

2.4.3. Aproximaciones relacionadas con el péptido amiloide.

Observando las *Figuras 6 y 7* se puede deducir que existen dos aproximaciones: favorecer la no formación de Abeta o, una vez que se ha formado, impedir que se agregue para formar las especies neurotóxicas. A su vez, (ver *Figura 6*) la no formación de Abeta se puede conseguir de dos formas, favoreciendo la ruta no amiloidogénica por activación de la α -secretasa o inhibiendo la ruta amiloidogénica por inhibición de las β - o γ -secretasas.

- **Activación de α -secretasa**

Sobre el papel sería el tratamiento ideal pues esta enzima no sólo rompe la molécula de APP por mitad de la secuencia de Abeta, impidiendo por completo su formación, sino que además el fragmento soluble que libera, conocido como sAPP α posee propiedades neurotróficas bien conocidas desde hace tiempo⁹⁰. Es decir, un tratamiento centrado en la activación de α -secretasa reforzaría factores de neuroprotección naturales del

⁸⁷ Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4* 1, 31-138.

⁸⁸ Camps, P.; Muñoz-Torrero, D. Cholinergic drugs in pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Mini Rev Med Chem.* **2002**, *2*, 11-25.

⁸⁹ Choi, B. W.; Ryu, G.; Park, S.H.; Kim, E. S.; Shin, J.; Roh, S. S.; Shin, H. C.; Lee, B.H. Anticholinesterase activity of plastoquinones from *Sargassum sagamianum*: lead compounds for Alzheimer's disease therapy. *Phytother Res.* **2007**, *21*, 423-426.

⁹⁰ Furukawa, K.; Sopher, B. L.; Rydel, R. E.; Begley, J. G.; Pham, D. G.; Martin, G. M.; Fox, M.; Mattson, M. P. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J. Neurochem.* **1996**, *67*, 1882-1896.

organismo. Esta enzima no está plenamente identificada y parece ser un grupo de metaloproteínas pertenecientes a las llamadas ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*)⁹¹. Muy probablemente, la α -secretasa sea en un futuro una eficaz diana terapéutica para el tratamiento de EA presintomático⁹² pero en la actualidad, quizás debido a la dificultad de su evaluación farmacológica, son muy pocas las moléculas que se han mostrado capaces de activar la enzima y siempre por medios indirectos, como forbol⁹³, que activa la proteína quinasa C que a su vez activa la α -secretasa, o el agonista de los receptores 5-HT₄ prucalopride⁹⁴ que muestra el mismo efecto. Recientemente han aparecido varios artículos sobre el principal componente polifenólico del te verde, el galato de 3-(-)-epigallocatecol (EGCG)^{95,96} (Figura 12), para el que describen propiedades de reducción de Abeta por aumento de los niveles del fragmento neuroprotector sAPP α mediante activación de PKC, siendo activo incluso por vía oral en ratones transgénicos.

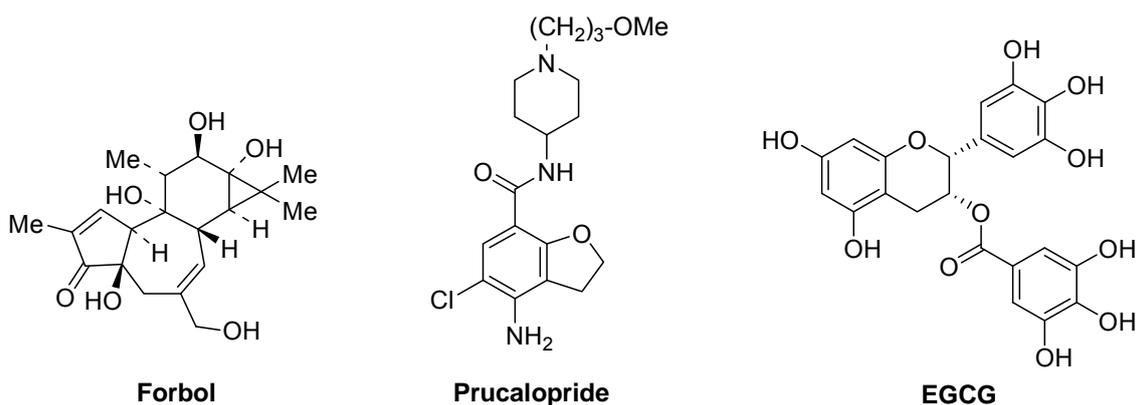


Figura 12. Activadores indirectos de α -secretasa

- ⁹¹ Postina, R. A closer look at alpha-secretase. *Curr. Alzheimer Res.* **2008**, *5*, 179-186.
- ⁹² Fahrenholz, F.; Postina, R. Alpha-secretase activation--an approach to Alzheimer's disease therapy. *Neurodegener. Dis.* **2006**, *3*, 255-61.
- ⁹³ Kozikowski, A. P.; Nowak, I.; Petukhov, P.A.; Etcheberrigaray, R.; Mohamed, A.; Tan, M.; Lewin, N.; Hennings, H.; Pearce, L.L.; Blumber, P.M. New Amide-Bearing Benzolactam-Based Protein Kinase C Modulators Induce Enhanced Secretion of the Amyloid Precursor Protein Metabolite sAPP. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 364-373.
- ⁹⁴ Cachard-Chastel, M.; Lezoualc'h, F.; Dewachter, I.; Deloménie, C.; Croes, S.; Devijver, H.; Langlois, M.; Van Leuven, F.; Sicsic, S.; Gardier, A. M. 5-HT₄ receptor agonists increase sAPP α levels in the cortex and hippocampus of male C57BL/6j mice. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 883-892.
- ⁹⁵ Levites, Y.; Amit, T.; Mandel, S.; Youdim, M. B. Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J.* **2003**, *17*, 952-954.
- ⁹⁶ Rezaei-Zadeh, K.; Arendash, G.W.; Hou, H.; Fernandez, F.; Jensen, M.; Runfeldt, M.; Shytle, R. D.; Tan, J. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res.* **2008**, *1214*, 177-187.

- **Inhibición de β - y γ -secretasas.**

La primera enzima que participa en la ruta amiloidogénica (ver *Figura 6*) es la β -secretasa, también llamada BACE (*β -site APP cleaving enzyme*), descrita en 1999⁹⁷. Si bien desde su descubrimiento se la considerará una diana terapéutica obvia, hasta hace poco tiempo no había despertado demasiada atención con pocos inhibidores descritos, en general oligopéptidos. La situación parece haber cambiado⁹⁸ y recientemente se han registrado algunas patentes de moléculas no peptídicas, como fenil carboxamidas de Merck⁹⁹, azolilacilguanidinas de Wyeth¹⁰⁰ o la sorprendente actividad de ácidos poliinsaturados, concretamente linoléico y araquidónico patentada por la empresa española NeuroPharma (actualmente llamada Noscira)¹⁰¹ (*Figura 13*).

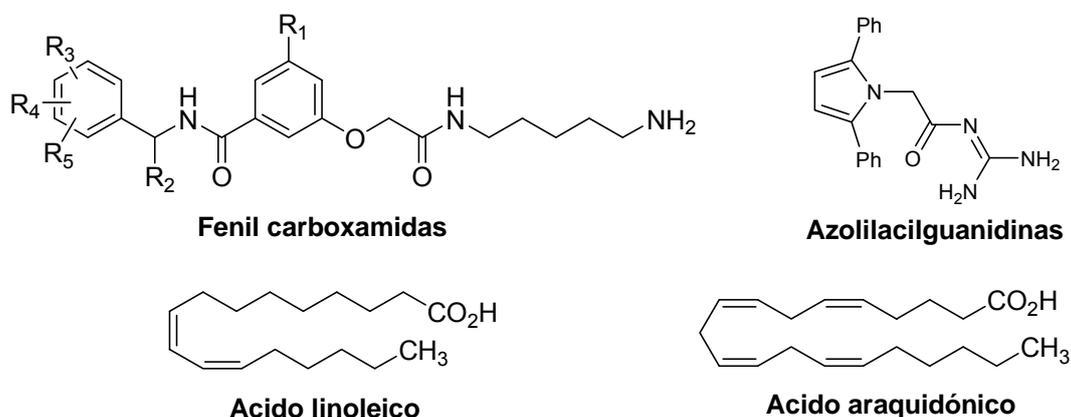


Figura 13. Inhibidores de β -secretasa patentados recientemente.

La segunda proteasa implicada en la hidrólisis de PPA, con la consiguiente liberación de Abeta, es la γ -secretasa (ver *Figura 6*), en realidad un complejo formado por varias enzimas e identificado hace relativamente poco tiempo¹⁰². De nuevo nos encontramos

⁹⁷ Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Loeloff, R.; Luo, Y.; Fisher, S.; Fuller, J.; Edenson, S.; Lile, J.; Jarosinski, M. A.; Biere, A. L.; Curran, E.; Burgess, T.; Louis, J. C.; Collins, F.; Treanor, J.; Rogers, G.; Citron, M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. **1999**, *286*, 735-41.

⁹⁸ Hills, I. D.; Vacca, J. P. Progress toward a practical BACE-1 inhibitor. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2007**, *10*, 383-91.

⁹⁹ Cia. Merck & Co. Pat WO05113484 (2005).

¹⁰⁰ Cia. Wyeth Co. Pat WO2006088711 (2006).

¹⁰¹ Cia. NeuroPharma S.A. Pat WO07039592 (2007).

¹⁰² Kimberly, W. T.; Wolfe, M. S. Identity and function of gamma-secretase. *J Neurosci Res.* **2003**, *74*, 353-60.

ante un objetivo lógico, pero tanto la propia enzima como su producto de hidrólisis C-terminal participan en alguna cascada de señales¹⁰³ y su inhibición podría producir efectos secundarios incontrolados de forma que unos inhibidores potencialmente útiles deberían ser muy selectivos hacia el proceso de hidrólisis de PPA¹⁰⁴, lo que dificulta considerablemente su obtención.

- **Inhibición de la agregación de Abeta**

Recordando la *Figura 6*, cada vez hay mayores evidencias de que, pese a lo llamativo de las placas seniles, las especies neurotóxicas implicadas en los procesos patológicos de EA son realmente los sucesivos pequeños oligómeros en que se va transformando el Abeta soluble en su camino hacia las placas seniles, posiblemente no tóxicas. Este proceso no es bien conocido y seguramente es menos simple de lo que se pensaba¹⁰⁵. Se han descrito numerosas pequeñas moléculas inhibidoras de la agregación pero, posiblemente debido a la complejidad del proceso, parece bastante difícil no sólo encontrar inhibidores de la agregación con verdadera utilidad terapéutica, sino que es difícil hablar de procedimientos de evaluación biológica generales, aplicables al proceso en general¹⁰⁶. Estos inhibidores (últimamente se están estudiando mucho los derivados de curcumina) se utilizan como herramienta en estudios de mecanismos de acción¹⁰⁷. Sí ha despertado gran interés la relación entre la AChE y la agregación de Abeta que revisaremos en el apartado siguiente.

- **Moléculas con mas de una actividad farmacológica**

Según se va profundizando en el conocimiento de la EA va quedando cada vez más patente una característica: su compleja etiología como enfermedad producida por una

¹⁰³ Lleo, A.; Berezovska, O.; Ramdya, P.; Fukumoto, H.; Raju, S.; Shah, T.; Hyman, B. T. Notch1 competes with the amyloid precursor protein for gamma-secretase and down-regulates presenilin-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47370-5.

¹⁰⁴ Pissamitski, D. Advances in gamma-secretase modulation. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2007**, *10*, 392-402.

¹⁰⁵ Merlini, G.; Bellotti, V.; Andreola, A.; Palladini, G.; Obici, L.; Casarini, S.; Perfetti, V. Protein Aggregation. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2001**, *39*, 1065-1075.

¹⁰⁶ LeVine, H 3rd. Small molecule inhibitors of Abeta assembly. *Amyloid.* **2007**, *14*, 185-197.

¹⁰⁷ Reinke, A.A.; Gestwicki, J. E. Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility. *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *70*, 206-15.

serie de procesos patológicos relacionados entre sí formando una red aun desconocida en su mayor parte. Esta combinación de procesos interrelacionados acaba desembocando, años después de su desconocido origen, en los dramáticos síntomas que sí son bien conocidos. Ante esta situación conviene replantearse el axioma de la química médica de “una molécula, una actividad” y sustituirlos por “una molécula, múltiples acciones”¹⁰⁸.

Es conocido que la AChE, en particular su llamado sitio aniónico periférico (PAS), favorece la agregación de Abeta^{109,110}. Poco después se consiguió poner a punto un método indirecto pero simple y fiable para medir la interacción de los distintos compuestos con el PAS, en concreto por desplazamiento del catión propidio, un ligando de dicho sitio fácilmente evaluable¹¹¹. A partir de aquí se centró el trabajo en conseguir moléculas que inhibieran la enzima en el sitio catalítico pero además fueran capaces de interaccionar con el sitio periférico y se desarrollaron un buen número de moléculas, muchas de ellas con actividades prometedoras. A diferencia de apartados anteriores, aquí sí presentan alguna característica estructural común; en general presentan dos farmacóforos o grupos farmacofóricos, unidos por algún tipo de cadena o espaciador (*linker*) de una longitud adecuada para que cada grupo interaccione con uno de los centros. Por supuesto, cada uno de los dos grupos está diseñado de acuerdo con el centro sobre el que pretende actuar y hay coincidencia en situar grupos aromáticos en el grupo que vaya a unir con el sitio periférico, además de que con frecuencia estos grupos también presentan propiedades antioxidantes.

La *Figura 14* representa la estructura de alguno de estos compuestos de acción dual o, en general, multifuncionales recientemente descritos, además de la estructura del mismo catión propidio, base del método indirecto para la evaluación de inhibidores de la agregación de Abeta favorecida por AChE.

¹⁰⁸ Zhang, H. Y. One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5260-5264.

¹⁰⁹ Alvarez, A.; Opazo, C.; Alarcon, R.; Garrido, J.; Inestrosa, N. C. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 348-361.

¹¹⁰ Bartolini, M.; Bertucci, C.; Cavrini, V.; Andrisano, V. beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 407-16.

¹¹¹ Johnson, G.; Moore, S. W. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *258*, 758-62.

Para inhibir el centro catalítico se ha utilizado con frecuencia la misma tacrina o un derivado suyo, creando moléculas híbridas con, por ejemplo, propidio (Universidad de Bolonia, 2005)¹¹² e indol (Cia. NeuroPharma, actualmente Noscira, 2004)^{113,114}. Muy próximo estructuralmente a este último es un híbrido de derivados de tacrina y melatonina publicado por el Instituto de Química Médica en 2006 para el que también se describe su capacidad antioxidante y su habilidad para atravesar la barrera hematoencefálica¹¹⁵. De nuevo el grupo del Prof. Melchiorre de la Universidad de Bolonia ha presentado en 2007 un nuevo producto llamado memoquina, al cual describe con propiedades antioxidantes como captador de radicales libres, AChEI, inhibidor de la agregación de amiloide inducida por AChE en PAS, inhibidor de β -secretasa y modulador de la hiperfosforilación de la proteína tau¹¹⁶. Si bien en principio puede parecer exagerado, puede no serlo si tenemos en cuenta las cada vez más evidentes y demostradas interrelaciones entre sistemas oxidativos, AChE, amiloide y activación de GSK3. También nuestro grupo ha presentado recientemente una familia de compuestos en los que el ácido (*S*)-glutámico actúa como *linker* y presenta diversas actividades como AChEI y BChEI mediante el grupo farmacofórico del donepezilo, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica gracias al ester hexílico¹¹⁷ y, finalmente, el grupo N-acilante que llamamos P.G., convenientemente elegido, es capaz no sólo de desplazar al catión propidio del PAS, sino también de mostrar propiedades antioxidantes¹¹⁸.

¹¹² Bolognesi, M. L.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Banzi, R.; Melchiorre, C. Propidium-based polyamine ligands as potent inhibitors of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced amyloid-beta aggregation. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 24-7.

¹¹³ Cia. NeuroPharma S.A. Pat WO04032929 (2004).

¹¹⁴ Muñoz-Ruiz, P.; Rubio, L.; García-Palomero, E.; Dorransoro, I.; del Monte-Millán, M.; Valenzuela, R.; Usan, P.; de Austria, C.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J.; Medina, M.; Martínez, A. Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: new disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7223-33.

¹¹⁵ Rodríguez-Franco, M. I.; Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Hernández-Ledesma, B.; Bartolomé, B. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 459-62.

¹¹⁶ Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Capsoni, S.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Margotti, E.; Cattaneo, A.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. A small molecule targeting the multifactorial nature of Alzheimer's disease. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 3689-92.

¹¹⁷ Prokai-Tatrai, K.; Nguyen, V.; Zharikova, A. D.; Braddy, A. C.; Stevens, Jr. S. M.; Prokaib, L. Prodrugs to enhance central nervous system effects of the TRH-like peptide pGlu-Glu-Pro-NH₂. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1011-1014.

¹¹⁸ (a) Arce, M. P. Moléculas multifuncionales con propiedades neuroprotectoras y colinérgicas dirigidas a un potencial tratamiento de la enfermedad de Alzheimer Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, **2008**. (b) Conde, S.; Rodríguez-Franco, M. I.; Arce, M. P.; González-Muñoz, G. C.; Villarroja, M.; López, M. G.; García, A. G. Nuevos derivados de aminoácidos dicarboxílicos y su

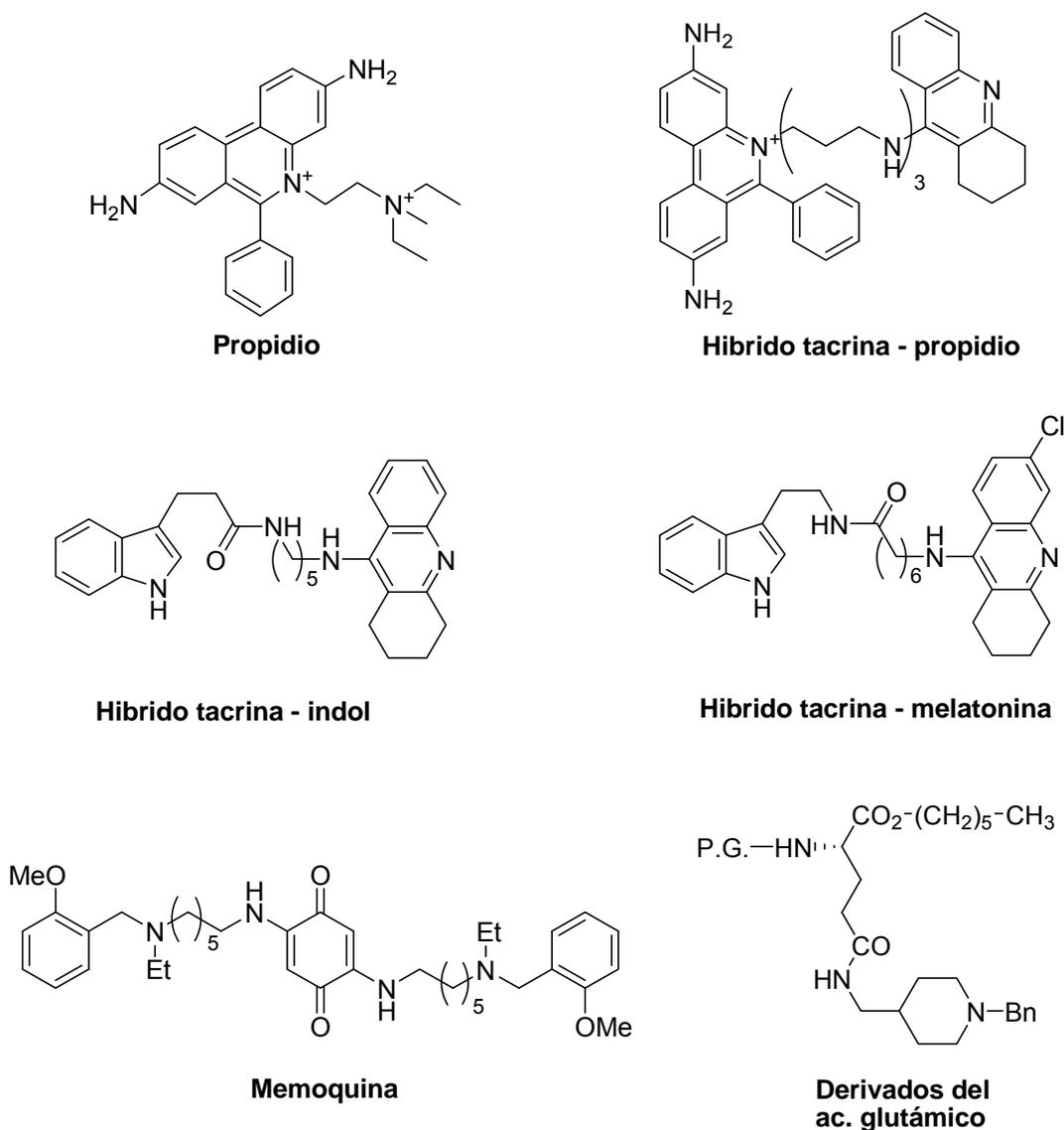


Figura 14. Moléculas multiactividad capaces de interactuar con los centros catalítico y PAS de AChE.

2.4.4. Ovillos neurofibrilares, inhibición de GSK3 β

Si bien esta actividad no ha sido buscada en el presente trabajo, sí conviene resaltar la importancia de disponer de inhibidores de GSK3 β , que deben ser altamente selectivos, teniendo en cuenta el papel que juega la fosforilación catalizada por quinasas en muchas cascadas de señales celulares¹¹⁹. Estos inhibidores de GSK-3 β serían de gran utilidad no

aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Pat. Esp. P200703264 (10 Dic 2007), PCT/ES2008/070221 (27 Nov 2008).

¹¹⁹ Martínez, A.; Castro, A.; Medina, M. Eds. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) and Its Inhibitors. Drug Discovery and Development. Wiley series in drug discovery and development. Ed. by Wang, B.

la vitamina E y los alimentos que la contienen como el aceite de oliva¹²⁵. Otros elementos descritos como preventivos son los ácidos poliinsaturados presentes en el pescado azul¹²⁶, el resveratrol, presente en el vino tinto, que reduce los niveles de Abeta intra y extraneuronal¹²⁷ y cafeína y derivados del ácido caféico¹²⁸.

También un posible tratamiento con antioxidantes, hablando en términos generales, puede tener distintas aproximaciones. Por ejemplo, se han descrito bastantes moléculas como inhibidoras de las distintas sintasas del óxido nítrico pero, como en el caso de GSK-3 β , deben tener una exquisita selectividad, dadas las múltiples funciones del óxido nítrico en el organismo¹²⁹. Sin duda pueden ser excelentes herramientas para el estudio de los mecanismos moleculares de distintos procesos¹³⁰, pero sin aplicación directa, al menos a corto plazo.

Más prácticos parecen los captadores (*scavengers*) de radicales libres, compuestos que directamente disminuyen la concentración de especies oxidantes disminuyendo el estrés oxidativo. Algunos ejemplos de estos compuestos se muestran en la Figura 17: derivados de *N*-hidroxianilina unidos a un sistema de aminopiridina¹³¹, los clásicos β -bloqueantes como el atenolol (*Figura 16*), metoprolol, propranolol y otros¹³², unos

¹²⁵ Morris, M. C.; Evans, D. A.; Bienias, J. L.; Tangney, C. C.; Wilson, R. S. Vitamin E and cognitive decline in older persons. *Arch. Neurol.* **2002**, *59*, 1125-32.

¹²⁶ Morris, M. C.; Evans, D. A.; Bienias, J. L.; Tangney, C. C.; Bennett, D. A.; Wilson, R. S.; Aggarwal, N.; Schneider, J. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **2003**, *60*, 940-6.

¹²⁷ Marambaud, P.; Zhao, H.; Davies, P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37377-82.

¹²⁸ Arendash, G. W.; Schleif, W.; Rezai-Zadeh, K.; Jackson, E. K.; Zacharia, L. C.; Cracchiolo, J. R.; Shippy, D.; Tan, J. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience.* **2006**, *142*, 941-52.

¹²⁹ de la Torre, J. C.; Stefano, G. B. Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* **2000**, *34*, 119-36.

¹³⁰ Goodyer, C. L.; Chinje, E. C.; Jaffar, M.; Stratford, I. J.; Threadgill, M. D. Time-dependence and preliminary SAR studies in inhibition of nitric oxide synthase isoforms by homologues of thiocitrulline. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3679-80.

¹³¹ Kim, K. M.; Kim, K. H.; Kang, T. C.; Kim, W. Y.; Lee, M.; Jung, H. J.; Hwang, I. K.; Ko, S. B.; Koh, J. Y.; Won, M. H.; Oh, E.; Shin, I. Design and biological evaluation of novel antioxidants containing *N*-t-Butyl-*N*-hydroxylaminophenyl moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2273-5.

¹³² Gomes, A.; Costa, D.; Lima, J. L.; Fernandes, E. Antioxidant activity of beta-blockers: an effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species? *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4568-77.

derivados de tacrina que además actúan como inhibidores de acetilcolinesterasa¹³³ y, finalmente, un quelante de iones hierro derivado de clioquinol¹³⁴.

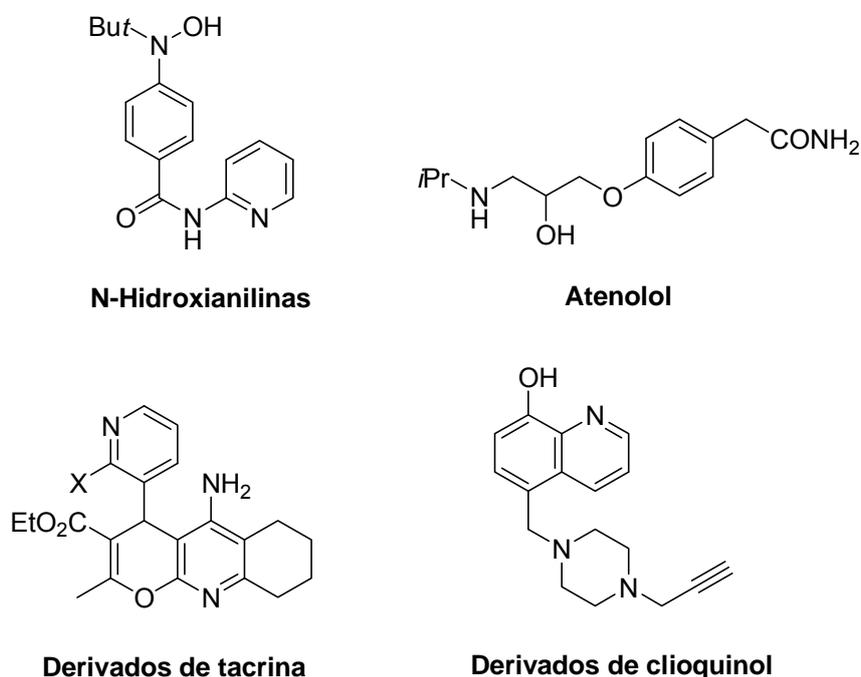


Figura 16. Algunos captadores de radicales libres.

2.4.6. Bloqueantes de los canales de calcio voltaje dependientes

Como en casos anteriores, cualquier molécula que afecte a la homeostasis del Ca^{2+} debe ser extremadamente selectiva, dado el gran número de procesos celulares que regulan los iones Ca^{2+} , lo que implica un delicado control de las concentraciones. Pocas son las estructuras descritas que presentan esta actividad. Hoy por hoy no tienen utilidad práctica previsible a corto plazo, aunque sí son excelentes herramientas para estudios de mecanismos.

Entre las estructuras descritas figura un derivado híbrido de tacrina y nimodipino (*Figura 17*)¹³⁵, conocido ligando de los canales de calcio voltaje dependientes de tipo L.

¹³³ Marco-Contelles, J.; Leon, R.; López, M. G.; García, A. G.; Villarroja, M. Synthesis and biological evaluation of new 4H-pyrano[2,3-b]quinoline derivatives that block acetylcholinesterase and cell calcium signals, and cause neuroprotection against calcium overload and free radicals. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1464-9.

¹³⁴ Zheng, H.; Weiner, L. M.; Bar-Am, O.; Epsztejn, S.; Cabantchik, Z. I.; Warshawsky, A.; Youdim, M. B.; Fridkin, M. Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 773-83.

Esta familia de compuestos ha sido desarrollada conjuntamente por el Instituto de Química Orgánica del CSIC y el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UAM, y presentan una excelente actividad dual como AChEI y bloqueantes de canales de Ca^{2+} . También recientemente la compañía NeuroPharma ha patentado una familia de derivados de bis(bencenocarboxamidas) para los que describen una excelente actividad¹³⁶.

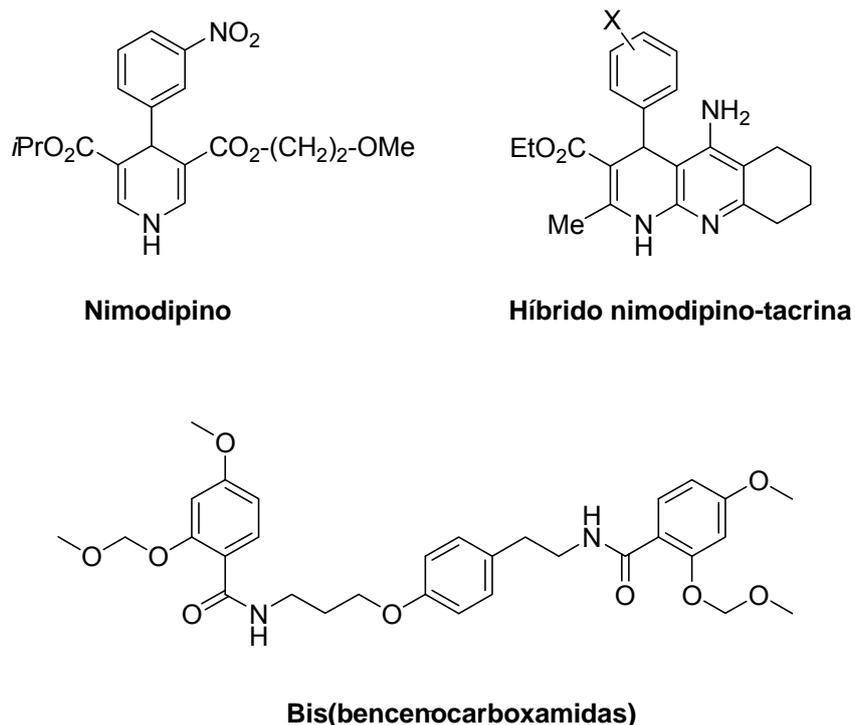


Figura 17. Bloqueantes de los canales de calcio voltaje dependientes

¹³⁵ Marco-Contelles, J.; Leon, R.; de Los Rios, C.; Guglietta, A.; Terencio, J.; Lopez, M. G.; Garcia, A. G.; Villarroya, M. Novel multipotent tacrine-dihydropyridine hybrids with improved acetylcholinesterase inhibitory and neuroprotective activities as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7607-7610.

¹³⁶ PCT Pat WO 2007068754.

3. Fenotiazinas.

Diferentes derivados de fenotiazina son conocidos desde la segunda mitad del siglo XIX en el campo de tintes y colorantes. Aproximadamente en 1876 se obtuvieron los colorantes violeta de Lauth y azul de metileno, y en 1883 se sintetizó la misma fenotiazina (*Figura 18*).

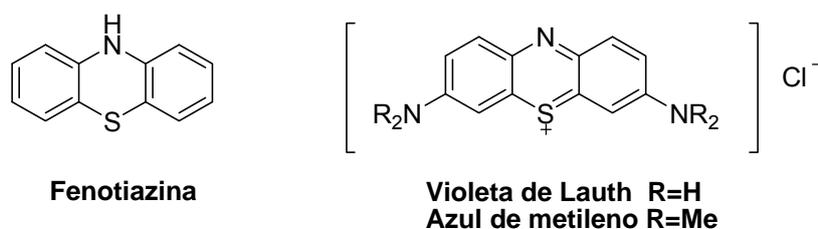


Figura 18.

En el campo de la farmacopea, la presencia de derivados de fenotiazina ha sido siempre importante y abundante, comenzando por el propio azul de metileno, el primer antimalárico y antiséptico de síntesis, descrito como tal por Ehrlich en 1891, además de su permanente uso en la tinción de muestras para microscopio. Siguiendo con el mismo azul de metileno, recientemente se ha publicado su potencial utilidad como vasoconstrictor¹³⁷.

En la década de los 40 del pasado siglo, las fenotiazinas fueron objeto de gran interés por parte de los laboratorios Rhône-Poulenc. Se sintetizó un gran número de derivados de fenotiazinas en distintas series que fueron inicialmente estudiados como antimaláricos, para a continuación pasar a sus propiedades como antagonistas de la histamina y, a partir de aquí, como antipsicóticos y agentes que actuaban sobre el sistema nervioso central^{138,139}.

En el Merck Index versión 13.2 digital se encuentran nada menos que 64 monografías referidas a moléculas derivadas de fenotiazina. De éstas, la mayor parte (31) vienen catalogadas en la categoría terapéutica de antipsicóticos, seguida de antieméticos (11),

¹³⁷ Shanmugam, G. Vasoplegic syndrome-the role of methylene blue. *Eur. J. Cardiothorac. Sur.* **2005**, 28, 705-710.

¹³⁸ Halpern, B.; Wood, D. The action of promethazine (Phenergan) in protecting mice against death due to histamine. *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* **1950**, 5, 510-516.

¹³⁹ Kopera, K.; Armitage, A. Comparison of some pharmacological properties of chlorpromazine, prometazine and pethidine. *Brit. J. Pharmacol. Chemother.* **1954**, 9, 392-401.

tranquilizantes (10) y antihistamínicos (9). También aparecen 2 derivados como antiparkinsonianos, es decir, indicados para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. La misma fenotiazina se comercializa como antihelmíntico de uso veterinario. Muchos de estos fármacos están en mercado desde hace más de 50 años e incluso algunos de ellos son muy conocidos a nivel popular (*Figura 19*).

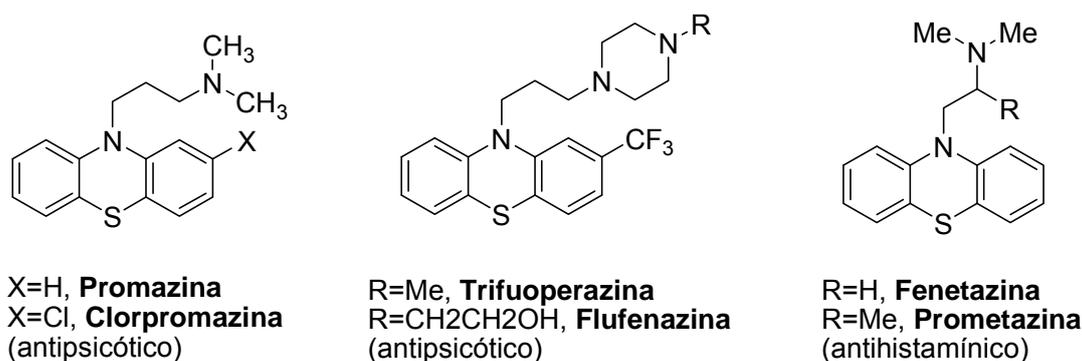


Figura 19. Algunos derivados comerciales de fenotiazinas.

La promazina, todavía en mercado (Prazina, Protactil,...), fue originalmente objeto de una patente de los laboratorios Rhône-Poulenc de 1950. También Rhône-Poulenc patentó en 1953 su derivado más conocido, la clorpromazina (Cloractil, Clorazina,...). Trifluoperazina (Eskazina, Terfluzina,...) y flufenazina (Tensofin, Moditen,...) son conocidos antipsicóticos, patentados ambos por Smith, Kline & French en torno a 1960. En el campo de los antihistamínicos merece citarse la fenetazina (Anergan, Lysergan,...) y prometazina, el conocido Fenergan, patentados ambos por Rhône-Poulenc en 1950, si bien las propiedades antihistamínicas de esta última eran conocidas desde varios años atrás.

En tiempos más recientes se están estudiando nuevas actividades para moléculas ya conocidas. La compañía francesa Neuro3D ha patentado el uso de derivados de fenotiazina, centrados en la flufenazina, como neuroprotectores y neurotróficos¹⁴⁰. Un

¹⁴⁰ Eur Pat **2004** EP1470818.

reciente trabajo describe la actividad de una serie de *N*-acilfenotiazinas como inhibidores selectivos de butirilcolinesterasa respecto de la acetilcolinesterasa¹⁴¹.

Como resumen, parece razonable esperar que los derivados de este conocido sistema heterocíclico muestren actividades hasta ahora no estudiadas en el campo del sistema nervioso central, con posibles nuevas aplicaciones en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Por el contrario, no existe referencia alguna sobre actividad biológica del sistema dibenzotiadiazepina, si bien puede considerarse como un sistema muy próximo al de fenotiazina y es razonable esperar que presente propiedades farmacológicas que merece la pena estudiar, dada la novedad del sistema.

¹⁴¹ Darvesh, S.; McDonald, R.; Penwell, A.; Conrad, S.; Darvesh, K.; Mataija, D.; Gomez, G.; Caines, A.; Walsh, R.; Martin, E. Structure-activity relationships for inhibition of human cholinesterases by alkyl amide phenothiazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 211-222.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS.

El trabajo que se presenta está referido al descubrimiento y estudio de compuestos que muestren propiedades farmacológicas relacionadas con neuroprotección. Este trabajo forma parte de un proyecto más amplio de química médica, dedicado al estudio de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo es la búsqueda de nuevas cabezas de serie de posible aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Consta de dos partes bien separadas (*Figura 20*):

- Selección de estructuras a evaluar, empleando una quimioteca propia de nuestro grupo de investigación. Las estructuras elegidas serán derivados de fenotiazinas y de dibenzotiadiazepina, de acuerdo con las razones que se expusieron en la Introducción de esta Memoria. Los productos seleccionados serán purificados y su estructura confirmada por los métodos cromatográficos y espectroscópicos habituales antes de proceder a su evaluación biológica.
- Evaluación biológica de los productos seleccionados, siguiendo un protocolo previamente establecido. Un primer ensayo consistirá en medir su actividad como inhibidores de acetil y butirilcolinesterasa (AChEIs y BuChEIs, respectivamente). A continuación, se realizarán estudios de neuroprotección, tanto para medir el nivel de actividad como para conocer su mecanismo de acción.

Las dos partes de este trabajo se realizarán en centros diferentes, la primera en el Instituto de Química Médica del CSIC, y la segunda en los laboratorios del Instituto Teófilo Hernando, en la Facultad de Medicina de la UAM.

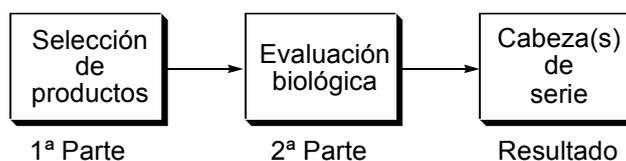


Figura 20. Desarrollo del trabajo.

Si los resultados obtenidos fueran positivos y suficientemente prometedores, se seleccionarían uno o más cabezas de serie, que serían desarrollados en una fase posterior siguiendo aproximadamente un esquema típico en química médica como el representado en la *Figura 21*. De forma ideal, a partir de los cabezas de serie se procedería a la síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados, análisis de los resultados en un estudio de la relación entre estructura química y actividad biológica que conduciría a la síntesis de nuevos derivados. Este ciclo se repetiría hasta encontrar una serie de compuestos con la actividad adecuada como para pasar a estudios farmacológicos posteriores.

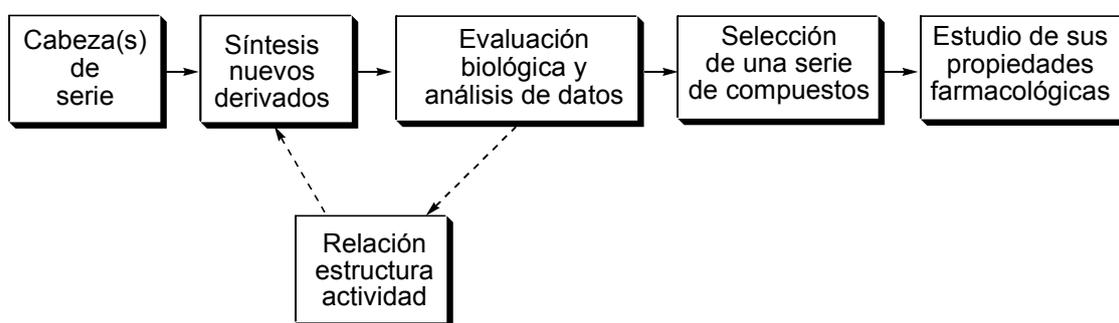


Figura 21. Fases de continuación del trabajo que se presenta.

III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

1. Búsqueda de cabezas de serie en la familia de las fenotiazinas y de las dibenzotiadiazepinas.

A partir de una quimioteca propia de nuestro grupo de investigación, se seleccionaron seis compuestos para su evaluación farmacológica (*Figura 22*), por su analogía estructural con moléculas de probada actividad biológica, como ha quedado explicado en la introducción. Se trata de cinco fenotiazinas con diferentes sustituyentes (**1-5**) y una dihidrodibenzotiadiazepina (**6**). Estos productos habían sido sintetizados por el grupo de los Dres. Corral y Lissavetzky en la década de los 70 como análogos de antipsicóticos. Se publicaron varios trabajos sobre su síntesis^{142,143,144,145}, pero no se llegaron a realizar pruebas farmacológicas sobre los mismos. Así pues, al inicio de esta Tesis Doctoral nos propusimos estudiar la farmacología de estos compuestos, para lo que fue necesario proceder a su purificación mediante técnicas cromatográficas y a la comprobación de las estructuras mediante métodos espectroscópicos.

¹⁴² Corral, C.; Lissavetzky, J.; Madroñero, R. Analogues of antipsychotic phenothiazines 10-(2-*N',N'*-disubstituted hydrazinoethyl)phenothiazines. *Eur. J. Med. Chem.* **1978**, *4*, 389-391.

¹⁴³ Corral, C.; Lissavetzky, J.; Quintanilla, G. 10-(2'-Dialquilamino)etilaminofenotiazinas análogos de fenotiazinas antipsicótica. *J. Heterocycl. Chem.* **1978**, *15*, 969-975.

¹⁴⁴ Corral, C.; Lissavetzky, J.; Quintanilla, G. Synthesis of 10-aminophenothiazines and derivatives. *J. Heterocyclic. Chem.* **1978**, *15*, 1137- 1140.

¹⁴⁵ Corral, C.; Lissavetzky, J.; Quintanilla, G. New method for the synthesis of chloro-substituted dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazepines and their 5,6-dihydro derivatives. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2214-2215.

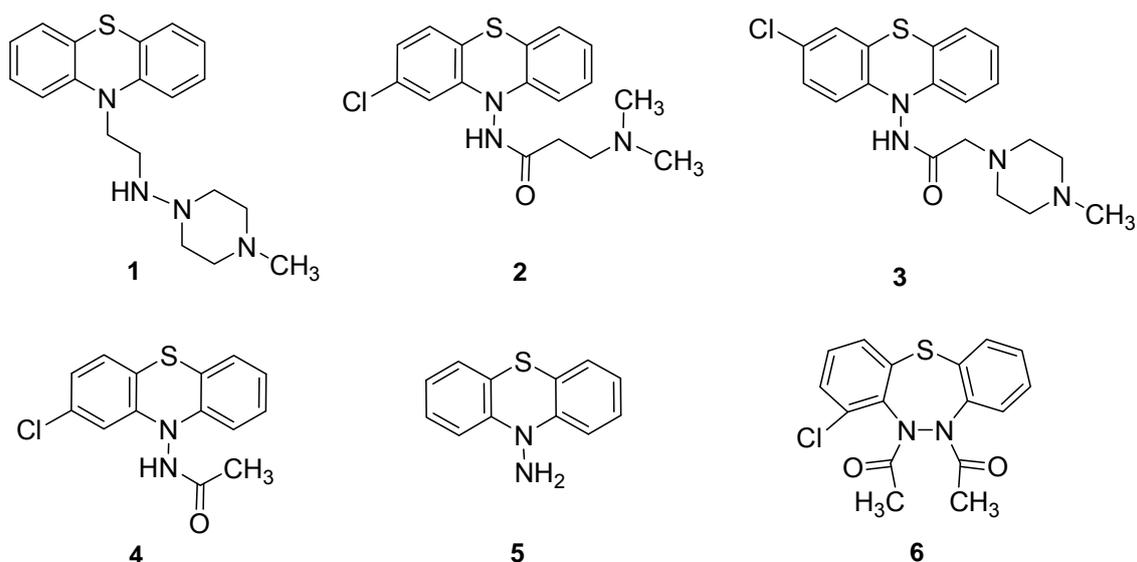


Figura 22. Productos seleccionados de la quimioteca de nuestro grupo de investigación.

1.1. Caracterización de los compuestos.

Los productos elegidos para ser ensayados biológicamente fueron purificados por cromatografía sobre gel de sílice empleando columnas de vidrio y una moderada presión. En todos los casos se obtuvieron en forma de sólidos con puntos de fusión en concordancia con los descritos y su pureza fue determinada mediante HPLC (*Tabla 3*).

Tabla 3. Puntos de fusión y pureza de los productos.

Producto	Punto de fusión (°C)		HPLC ^a
	Exper.	Bibl.	Pureza (%)
1	207-209	205	99
2	179-181	175-177	99
3	176-178	(b)	98
4	213-215	220-222	99
5	123-125	119-121	100
6	146-149	151-152	99

^aColumna Delta Pack C₁₈; eluyente: CH₃CN : H₂O / CF₃CO₂H (0.05%) (50:50). ^bProducto no descrito.

La estructura de los productos fue confirmada a partir de sus espectros de masas y de resonancia magnética nuclear de protón y carbono.

Los espectros de masas fueron obtenidos por ionización con electronebulización en modo positivo (*electrospray ionization*, ESI). Por lo general, se observó el ion molecular protonado MH^+ y el aducto formado por dos moléculas del producto y un átomo de sodio M_2Na^+ (Tabla 4). En el caso de la 2-cloro-10-acetilaminofenotiazina **4** no se observó el ion molecular, pero sí los aductos con sodio MNa^+ y M_2Na^+ . Además, en los derivados que tienen un átomo de cloro en su estructura, se pudo comprobar la existencia del pico isotópico $(MH+2)^+$ con una intensidad aproximada de un 32% con respecto a la que presentaba el ion molecular protonado MH^+ , debido a la abundancia relativa de los isótopos ^{35}Cl y ^{37}Cl .

Tabla 4. Espectrometría de masas por electronebulización en modo positivo (*electrospray ionization*, ESI). Señales más significativas.

Comp.	Fórmula	M^+	MH^+	$(MH+2)^+$	MNa^+	M_2Na^+
1	$C_{19}H_{24}N_4S$	–	341	–	–	–
2	$C_{17}H_{18}ClN_3OS$	–	348	350	–	717
3	$C_{19}H_{21}ClN_4OS$	–	389	391	–	799
4	$C_{14}H_{11}ClN_2OS$	–	–	–	313	603
5	$C_{12}H_{10}N_2S$	214	–	–	–	–
6	$C_{16}H_{13}ClN_2O_2S$	–	333	335	355	687

La asignación de los desplazamientos químicos de protón y carbono se realizó sobre los espectros obtenidos en equipos que operan a 400 MHz en 1H -RMN y 100 MHz en ^{13}C -RMN. En algunos casos, se han empleado experimentos bidimensionales de correlación heteronuclear protón – carbono de tipo HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) y HBMC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).

A modo de ejemplo, a continuación se explica de forma detallada la asignación de las señales de **2** (Figura 23), que se inició con la resolución del sistema de espines de la zona aromática. La señal a 6.63 ppm fue asignada al protón situado en la posición 1 de la fenotiazina, ya que es el único que se muestra como un doblete con una constante de acoplamiento de 7.6 Hz, típica de una interacción H-H a tres enlaces. El doblete que sale a 6.98 ppm con un acoplamiento pequeño (2.3 Hz) fue atribuido al protón en la posición 4 ya que, debido a la presencia del átomo de cloro en 3, sólo puede establecer

un acoplamiento a través de cuatro enlaces con el protón 2. El doble doblete a 7.00 ppm, en el que se observan las anteriores constantes de acoplamiento, fue consecuentemente asignado al protón situado en la posición 2. Los protones del anillo C de la fenotiazina se muestran como un conjunto de dos doble dobletes y dos triple dobletes, con acoplamientos de tipo *orto* de 7.7 Hz y de tipo *meta* de 1.2 Hz. Teniendo en cuenta los valores de ^1H -RMN descritos para fenotiazinas,¹⁴⁶ el doble doblete más desapantallado ($\delta = 7.03$ ppm) fue asignado al protón en 6 y el más apantallado ($\delta = 6.72$ ppm) al de la posición 9. Análogamente, el triple doblete a 7.07 ppm fue atribuido al protón de la posición 8 y el que resuena a 6.91 ppm al situado en 7. En la zona alifática del espectro se observan tres señales: un singlete a 2.43 ppm, que integra para seis protones y que corresponde a los dos metilos, y dos tripletes a 2.89 y 2.71 ppm, que integra cada uno de ellos para dos protones y que pertenecen a los dos grupos metileno de la molécula.

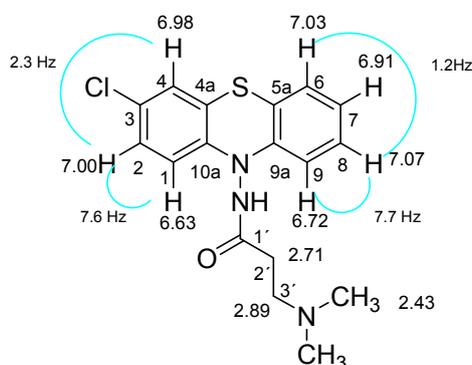


Figura 23. Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de los protones de **2**.

Una vez conocido el desplazamiento químico de todos los protones de **2**, se realizó la asignación de los carbonos protonados empleando un experimento HSQC, que proporciona correlaciones a través de acoplamiento escalar entre un protón y el carbono al que está directamente unido (*Tabla 5*). La asignación de los carbonos 4 y 6 es incierta, debido a la proximidad de desplazamientos químicos de las dos señales (127.2 y 127.3 ppm).

¹⁴⁶ Pretsch, E.; Clero, T.; Seibl, J.; Simon, W. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Editorial: ALHAMBRA S. A.

Tabla 5. Correlaciones entre los desplazamientos químicos de protón (δ_H) y de carbono (δ_C) observadas en **2** mediante un experimento HSQC.

Asignación	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	6.63 (d, 1H, $J_{1,2}= 7.6$ Hz)	114.0
2	7.00 (dd, 1H, $J_{1,2}= 7.6$ Hz, $J_{2,4}= 2.3$ Hz)	126.5
4	6.98 (d, 1H, $J_{2,4}= 2.3$ Hz)	127.2 ^a
6	7.03 (dd, 1H, $J_{6,7}= 7.7$ Hz, $J_{6,8}=1.2$ Hz)	127.3 ^a
7	6.91 (td, 1H, $J_{6,7}= J_{7,8}= 7.7$ Hz, $J_{7,9}= 1.2$ Hz)	123.9
8	7.07 (td, 1H, $J_{7,8} = J_{8,9}= 7.7$ Hz, $J_{6,8}= 1.2$ Hz)	127.8
9	6.72 (dd, 1H, $J_{8,9}= 7,7$ Hz, $J_{7,9}= 1.2$ Hz)	113.2
2'	2.71 (t, 2H, $J_{2',3'}= 5.7$ Hz)	32.2
3'	2.82 (t, 2H, $J_{2',3'}= 5.7$ Hz)	54.8
CH ₃	2.43 (s, 6H)	44.7

^a Pueden estar intercambiados.

Por último, la asignación de los carbonos cuaternarios se realizó empleando un experimento HMBC, que proporciona la conectividad protón – carbono a dos y tres enlaces. Los protones de las posiciones 1 y 4 presentan correlaciones con señales a 121.9, 128.5 y 142.1 ppm, lo que indica que estos desplazamientos químicos corresponden a los carbonos cuaternarios del anillo (carbonos 3, 4a y 10a) (Tabla 6). Puesto que el protón de la posición 2 no puede dar conectividad con el carbono 4a al estar situado a cuatro enlaces (ver la estructura en la Figura 23), el hecho de que este protón presente dos puntos de cruce con las señales a 128.5 y 142.1 ppm indica que la frecuencia con la que no presenta correlación ($\delta = 121.9$ ppm) corresponde inequívocamente al carbono 4a. Aunque a partir del diagrama HMBC las señales de los carbonos 3 y 10a no podrían ser asignadas, por comparación con los datos de ¹³C-RMN disponibles en la bibliografía para fenotiazinas¹⁴⁷, la frecuencia a $\delta = 128.5$ ppm fue atribuida al carbono 3, que está unido al cloro, y la señal a $\delta = 142.1$ ppm al carbono 10a. Por último, los carbonos cuaternarios del anillo C fueron inequívocamente asignados a partir de las correlaciones con los protones de las posiciones 7 y 8. Así, el hidrógeno de la posición 7 presenta un punto de cruce con la señal a 119.2 ppm, lo que

¹⁴⁷ Jovanovic, M.; Biehl, E. ¹³C Nuclear magnetic resonance of some derivatives of phenothiazines, pyridobenzothiazines and phenoxazines. *Org. Magn. Res.* **1984**, 22, 491-504.

indica que se trata del carbono 5a, mientras que el protón en 8 lo hace con la frecuencia de 142.9 ppm que fue atribuido al carbono 9a.

Tabla 6. Correlaciones entre los desplazamientos químicos de protón (δ_H) y de carbono (δ_C) observadas en la parte aromática de **2** mediante un experimento HBMC.

Protón	δ_H (ppm)	Carbonos cuaternarios conectados, δ_C (ppm)				
		3	4a	5a	9a	10a
1	6.63 (d)	128.5	121.9	—	—	142.1
2	7.00 (dd)	128.5	—	—	—	142.1
4	6.98 (d)	128.5	121.9	—	—	142.1
7	6.91 (dt)	—	—	119.2	—	—
8	7.07 (dt)	—	—	—	142.9	—

1.2. Evaluación biológica.

1.2.1. Medida de la actividad como inhibidores de acetil y butirilcolinesterasa (AChEI, BuChEI).

Como ya comentamos en la Introducción, existen dos tipos principales de colinesterasas (ChEs), estrechamente relacionadas en su estructura molecular, pero con distinta distribución, especificidad de sustrato y funciones¹⁴⁸. La BuChE tiene una amplia distribución y se encuentra en tejidos como hígado, piel, cerebro y músculo liso gastrointestinal, así como bajo forma soluble en plasma. No está especialmente asociada con las sinapsis colinérgicas y es menos específica en cuanto a sustrato que la AChE. La función de esta enzima no es del todo conocida, aunque actualmente se cree que su papel ha sido infravalorado al pensar que su inhibición tan sólo producía efectos colinérgicos periféricos¹⁴⁹. Recientemente, se ha probado que la BuChE tiene, además, una importante función en la hidrólisis constitutiva de la ACh en el sistema nervioso central (SNC), lo cual podría conferir a esta enzima un papel mucho más importante en

¹⁴⁸ Chatonnet, A.; Locckridge, O. Comparasion of butylcholinesterase and acetylcholinesterase. *J. Biochem.* **1989**, *260*, 625-634.

¹⁴⁹ Benzi, G.; Moretti, A. Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease?. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *346*, 1-13.

la neurotransmisión colinérgica de lo que se pensó inicialmente¹⁵⁰. AChE y BuChE difieren en el volumen del bolsillo acilo que acomoda al grupo de esta naturaleza del sustrato, siendo más grande en el caso de la BuChE, lo cual explicaría el hecho de que la AChE hidrolize ACh pero no butirilcolina (BuCh), mientras que la BuChE puede hidrolizar ambos sustratos, así como diversos ésteres más.

Los seis compuestos elegidos de nuestra quimioteca se evaluaron como inhibidores de AChE y BuChE, utilizando el método de Ellman ¹⁵¹ (Tabla 7).

Tabla 7. Inhibición de AChE bovina y BuChE equina.

Comp.	AChE CI ₅₀ (μM) ^a	BuChE CI ₅₀ (μM) ^a
1	>100	50
2	>100	0.7
3	>100	0.5
4	>100	>100
5	>100	>100
6	>100	>100

^a Media de tres experimentos independientes.

Como puede observarse, las fenotiazinas **1**, **2** y **3** presentaron inhibición selectiva de BuChE, en los rangos micro y sub-micromolar, mientras que en AChE todos resultaron ser inactivos.

¹⁵⁰ Greig, N.; Utsuki, T.; Yu, Q.; Zhu, X.; Holloway, H.; Perry, T.; Lee, B.; Ingram, D.; Lahiri, D. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* **2001**, *17*, 159-165.

¹⁵¹ Ellman, G.; Courtney, K.; Valentino, A.; Featherstone, R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase inhibitors activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-90.

1.2.2. Ensayos en cultivos celulares: neuroprotección frente al estrés oxidativo.

Posteriormente se realizaron ensayos de neuroprotección utilizando la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. El uso de líneas celulares para el análisis de funciones neuronales se ha convertido en los últimos años en una alternativa a los cultivos primarios, particularmente en el campo de la muerte celular. La línea celular SH-SY5Y constituye un buen sistema experimental para estudiar procesos neuronales, incluyendo rutas de señalización y mecanismos de muerte neuronal. Una de las ventajas que proporcionan estas células es la existencia de procedimientos bien establecidos y sencillos para su mantenimiento. Asimismo, su alta tasa proliferativa garantiza el suministro de un número elevado de células.

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y expresa la mayoría de las propiedades de las neuronas noradrenérgicas¹⁵² incluida la capacidad para liberar noradrenalina en respuesta a la despolarización y activación de receptores muscarínicos¹⁵³. Este hecho hace que esta línea celular sea un buen modelo para estudiar la función neuronal simpática humana. Las células SH-SY5Y también expresan receptores nicotínicos¹⁵⁴ que, como es sabido, son permeables a Ca^{2+} y que cuando son activados producen una despolarización parcial de la membrana que puede llevar a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L o N, provocando la liberación de neurotransmisores u otros procesos. También se ha demostrado que esta línea celular presenta una gran densidad de canales de calcio dependientes de voltaje del subtipo L¹⁵⁵. Los canales de calcio dependientes de voltaje están extensamente distribuidos en el sistema nervioso¹⁵⁶ y cada vez se les da más importancia como posibles dianas para el desarrollo de fármacos, para la EA, con diferentes mecanismos de acción.

¹⁵² Pahlman, S.; Ruusala, A. I.; Abrahamsson, L.; Mattsson, M. E.; Esscher, T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-12-myristate-13-acetate-induced differentiation. *Cell. Differ.* **1984**, *14*, 135-44.

¹⁵³ Murphy, N. P.; Ball, S.G.; Vaughan, P.F. Potassium- and carbachol-evoked release of [³H]noradrenaline from human neuroblastoma cells, SH-SY5Y. *J. Neurochem.* **1991**, *56*, 1810-5.

¹⁵⁴ Pahlman, S.; Ruusala, A. I.; Abrahamsson, L.; Mattsson, M. E.; Esscher, T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-12-myristate-13-acetate-induced differentiation. *Cell. Differ.* **1984**, *14*, 135-44.

¹⁵⁵ Hirota, K.; Lambert, D.G. A comparative study of L-type voltage sensitive Ca^{2+} channels in rat brain regions and cultured neuronal cells. *Neurosci. Lett.* **1997**, *223*, 169-72.

¹⁵⁶ Spedding, M.; Lepagnol, L. Pharmacology of sodium and calcium channel modulation in neurons. Implications for neuroprotection. *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 633-6.

Dentro de los estudios de neuroprotección, nos planteamos probar el potencial de los compuestos en un modelo experimental de estrés oxidativo. Es conocido que el sistema antioxidante endógeno decrece con la edad y existen numerosas evidencias de la implicación del estrés oxidativo en el origen y progresión de la EA¹⁵⁷. Estudios recientes han demostrado que el daño oxidativo precede a otras lesiones histopatológicas de la enfermedad, como las placas seniles y los ovillos neurofibrilares¹⁵⁸. Por lo tanto, las moléculas capaces de neutralizar el estrés oxidativo podrían tener aplicación terapéutica en la EA¹⁵⁹ y en los últimos años se han realizado estudios clínicos con varios antioxidantes¹⁶⁰.

Descendiendo al nivel molecular, es un hecho contrastado que la exposición continuada a agentes pro-oxidantes, que se generan durante el metabolismo normal, causa daños en las biomoléculas. Así por ejemplo, la oxidación de lípidos insaturados de membrana provoca cambios en la fluidez de la bicapa lipídica, incrementa su permeabilidad iónica, produce enlaces covalentes entre las proteínas de transmembrana y los lípidos de cadena larga constituyentes de la membrana. También se produce inactivación de enzimas y receptores de membrana, daños en el ADN y mutagénesis¹⁶¹.

¹⁵⁷ (a) Zhu, X.; Lee, H. G.; Perry, G.; Smith, M. A. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1772*, 494-502. (b) Nunomura, A.; Castellani, R. J.; Zhu, X.; Moreira, P. I.; Perry, G.; Smith, M. A. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, 631-641.

¹⁵⁸ (a) Gu, F.; Zhu, M.; Shi, J.; Hu, Y.; Zhao, Z. Enhanced oxidative stress is an early event during development of Alzheimer-like pathologies in presenilin conditional knock-out mice. *Neurosci. Lett.* **2008**, *440*, 44-48. (b) Moreira, P. I.; Santos, M. S.; Oliveira, C. R.; Shenk, J. C.; Nunomura, A.; Smith, M. A.; Zhu, X.; Perry, G. Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **2008**, *7*, 3-10.

¹⁵⁹ (a) Nunomura, A.; Perry, G.; Smith, M. A. Prospects for antioxidant therapy in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. In *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*, 1st ed.; Qureshi, G. A., Parvez, S. H., Eds.; Elsevier: Amsterdam, **2007**; pp. 451-466. (b) Shi, Q.; Gibson, G. E. Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2007**, *21*, 276-291. (c) Zhang, H. Y.; Yang, D. P.; Tang, G. Y. Multipotent antioxidants: from screening to design. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 749-754.

¹⁶⁰ (a) Hager, K.; Kenkies, M.; McAfoose, J.; Engel, J.; Münch, G. Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer's disease – a 48 months follow-up analysis. *J. Neural. Transm. Suppl.* **2007**, 189-93. (b) Kontush, K.; Schekatolina, S. Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* **2004**, *1031*, 249-262. (c) Quinn, J.; Suh, J.; Moore, M. M.; Kaye, J.; Frei, B. Antioxidants in Alzheimer's disease-vitamin C delivery to a demanding brain. *J. Alzheimer Dis.* **2003**, *5*, 309-313. (d) Klatte, E. T.; Scharre, D. W.; Nagaraja, H. N.; Davis, R. A.; Beversdorf, D. Q. Combination therapy of donepezil and vitamin E in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2003**, *17*, 113-116.

¹⁶¹ Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free. Rad. Biol. Med.* **1991**, *11*, 81-128.

El anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) es el primer radical libre que se forma en el interior de la célula por la reducción de oxígeno molecular¹⁶². La dismutación espontánea o catalizada por enzimas de este anión radical genera H_2O_2 que puede transformarse por reacciones posteriores en el radical hidroxilo (OH), potente oxidante que puede causar la oxidación de lípidos.

Para este estudio se han empleado dos condiciones tóxicas que producen radicales libres cuando se aplican a una línea celular de neuroblastoma. Por una parte H_2O_2 , que es un generador exógeno de radicales libres, y por otra la mezcla de rotenona¹⁶³ y oligomicina A¹⁶⁴ que bloquean los complejos I y V de la cadena respiratoria mitocondrial, originando radicales libres mitocondriales (Figura 24).

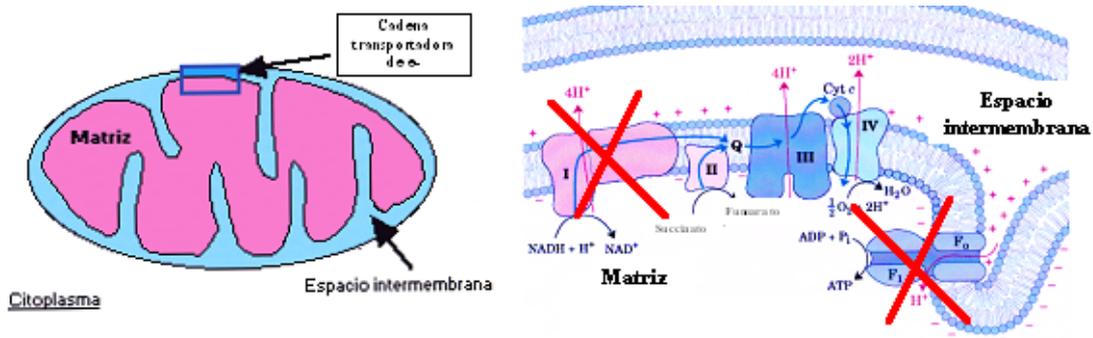


Figura 24. Cadena transportadora de electrones en la mitocondria y puntos donde actúan rotenona (complejo I) y oligomicina A (complejo V).

En todos los ensayos se evaluó la muerte celular midiendo la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH), que es una enzima que se libera al medio extracelular cuando la célula muere¹⁶⁵, empleando un conjunto comercial de reactivos (kit de muerte celular de Roche-Boehringer). Este kit contiene una sal de tetrazolio de color amarillo que se

¹⁶² Freeman, B. A.; Crapo, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **1982**, *47*, 412-426.

¹⁶³ Newhouse, K.; Hsuam, S. L.; Chang, S. H.; Cai, B.; Wang, Y.; Xia, A. Rotenone-induced Apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP Kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicol. Sci.* **2004**, *79*, 137-146.

¹⁶⁴ Liu, L.; Li, Y.; Du, G.; Chen, J. Increasing glycolytic flux in torulopsis glabrata by redirecting ATP production from oxidative phosphorylation to substrate-level phosphorylation. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 1043-1053.

¹⁶⁵ Arias, E.; Gallego, S.; Villarroya, M.; Garcia, A.; Lopez, M. Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitor galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: Role of nicotinic receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1346-1353.

reduce al reaccionar con el $\text{NADH}+\text{H}^+$, obtenido de la reacción que cataliza la LDH, formándose al final una sal de tetrazolio de color rojo (Figura 25).

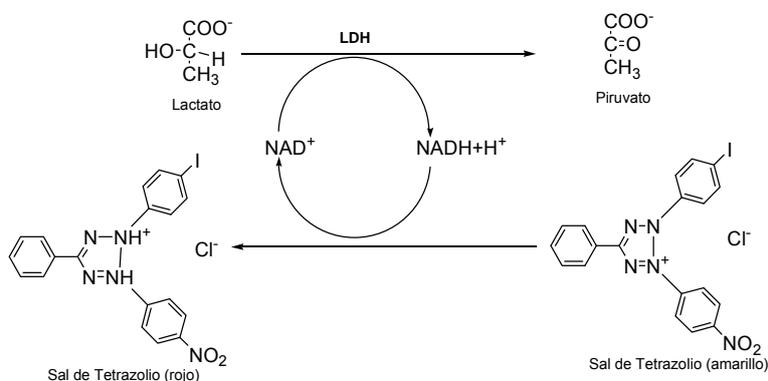


Figura 25. Mecanismo de reacción del kit de LDH.

1.2.2.1. Neuroprotección frente a agua oxigenada.

Para determinar la neuroprotección de las moléculas seleccionadas frente a agua oxigenada, se siguió el siguiente protocolo. Las células se preincubaron durante 24 h con cada uno de los compuestos en medio de cultivo (DMEM, ver composición en parte experimental) a las concentraciones de 1, 3, 30, 60 y 100 μM . Tras este periodo de tiempo, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por uno nuevo al cual se añadió H_2O_2 a la concentración final de 60 μM y el compuesto objeto del estudio (1, 3, 30, 60 y 100 μM). En este medio se suprimió el suero fetal bovino con el fin de evitar la interacción en la medida posterior de LDH (Figura 26). Los productos fueron disueltos en DMSO y posterior dilución en DMEM de forma que la cantidad de DMSO final en el pocillo no superase el 0.5%. Pasado dicho tiempo, la mortalidad celular total se determinó por el método de valoración de la actividad de LDH. El agua oxigenada produjo un aumento de la LDH liberada en torno al 45-50% respecto a la LDH total.

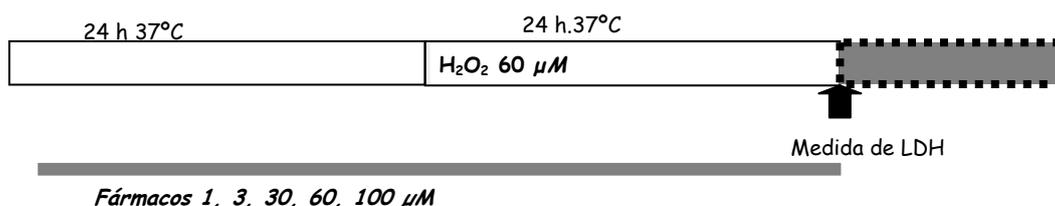


Figura 26. Esquema del protocolo empleado para evaluar el efecto neuroprotector de los compuestos seleccionados frente a la lesión inducida por H_2O_2 .

En estos ensayos se utilizó como control positivo trolox, el fragmento antioxidante de la vitamina E¹⁶⁶, a las mismas concentraciones que el resto de los productos. Los resultados de muerte celular se muestran en la *Figura 27*, donde se ha representado el porcentaje de LDH liberada frente a las concentraciones crecientes de cada compuesto. Los resultados son la media de cuatro experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por triplicado, y se sometieron a un análisis estadístico empleando el programa ANOVA.

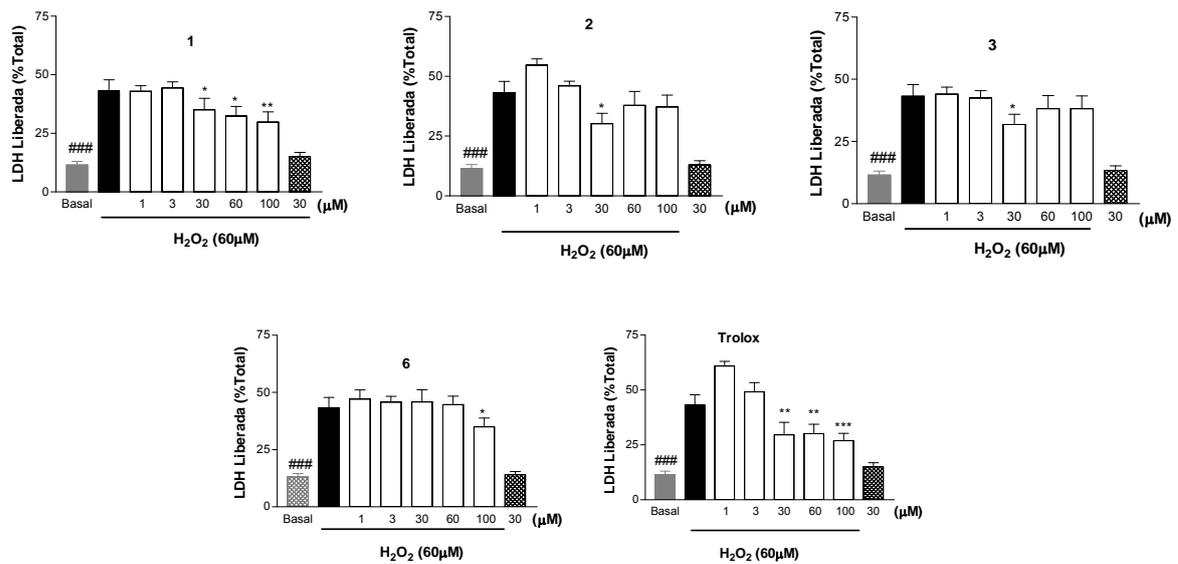


Figura 27. Porcentaje de LDH liberada respecto de la total (muerte celular) empleando H₂O₂ (60 μM) como tóxico. Media de 4 experimentos independientes (cada uno de ellos por triplicado) ± SEM. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, ###*p*<0.001, respecto al tóxico.

En las gráficas de barras, la primera de la izquierda (color gris) representa la LDH basal, es decir, la muerte celular que se produce de manera natural en el cultivo neuronal en ausencia de tóxico. La segunda barra (color negro) es la muerte celular provocada por el tóxico y las cinco siguientes (color blanco) representan la muerte provocada por el tóxico en presencia de cantidades crecientes del producto ensayado. En la última barra de la derecha (de rombos) se ha expresado la liberación de LDH provocada por cada uno de los compuestos ensayados a 30 μM en ausencia de tóxico, con el fin de determinar su

¹⁶⁶ Petersen, R.; Thomas, R.; Grundman, M.; Bennet, D.; Doody, R.; Ferris, S.; Galasko, D.; Jin, S.; Kaye, J.; Levey, A.; Pfeiffer, E.; Sano, M.; Van-Dyck, C.; Thal, L. Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *New. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2379-2388.

posible toxicidad. Como puede apreciarse en las gráficas, los productos **1**, **2**, **3** y **6** disminuyen la muerte provocada por el tóxico y no presentan toxicidad a 30 μM .

En la *Tabla 8* se muestran los porcentajes de neuroprotección, teniendo en cuenta la muerte basal en ausencia de tóxico (ver parte experimental).

Tabla 8. Porcentaje de neuroprotección frente a H_2O_2 (60 μM) de los compuestos seleccionados a cinco concentraciones (1 – 100 μM).

Comp.	Concentraciones ensayadas				
	1 μM	3 μM	30 μM	60 μM	100 μM
1	0	0	22.1 *	36.9 *	42.1 **
2	0	0	44.4 *	18.6	20.1
3	0	6.3	37.9 *	18.4	18.8
4	0	0	0	0	0
5	0	6.7	0	0	0
6	0	0	0	0	41.0 *
Trolox	0	0	57.7 **	55.7 **	64.2 **

Los resultados se expresan como media de 4 experimentos independientes (por triplicado). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

De los seis compuestos evaluados, cuatro (**1**, **2**, **3** y **6**) presentan neuroprotección en el rango comprendido entre 30 y 100 μM , destacando la fenotiazina **1** que muestra un efecto protector dosis-dependiente a partir de 30 μM . Para los compuestos **2**, **3** y **6** no se observó una respuesta dependiente de la dosis, con valores de protección máxima a las concentraciones de 30, 30 y 100 μM , respectivamente.

A la vista de estos primeros resultados y teniendo en cuenta que las fenotiazinas **2** y **3** eran estructuralmente muy parecidas, se eligieron los derivados **1**, **2** y **6** para realizar ensayos de neuroprotección frente a radicales libres mitocondriales.

1.2.2.2. Neuroprotección frente a la mezcla de rotenona y oligomicina A.

A continuación, los tres productos seleccionados (**1**, **2** y **6**) fueron evaluados como neuroprotectores frente a los radicales libres mitocondriales, empleando una mezcla de rotenona (30 μM) y oligomicina A (10 μM). Como ya se ha explicado con anterioridad, estos tóxicos inhiben los complejos I y V de la cadena respiratoria mitocondrial, aumentando la concentración de radicales libres intracelulares, disminuyendo la síntesis de ATP y provocando finalmente la muerte celular. Los compuestos fueron ensayados a 3, 10 y 30 μM y el protocolo utilizado es semejante al anterior. Los resultados de muerte celular se muestran en la *Figura 28* y el porcentaje de neuroprotección de cada uno de los compuestos ensayados se encuentra en la *Tabla 9*.

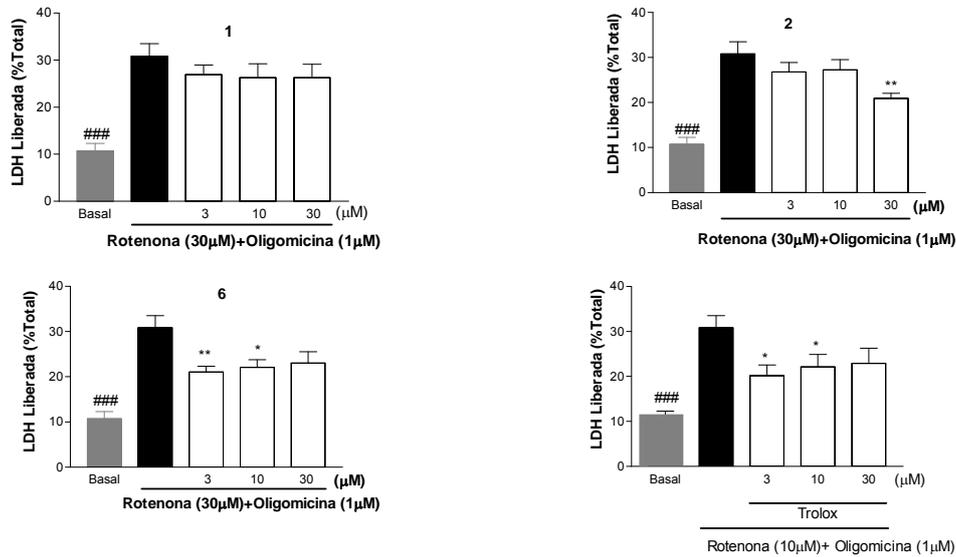


Figura 28. Porcentaje de LDH liberada respecto de la total (muerte celular) empleando rotenona (30 μM) + oligomicina A (10 μM) como tóxico. Media de 6 experimentos independientes (cada uno de ellos por cuadruplicado) \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, respecto al tóxico.

Tabla 9. Porcentaje de neuroprotección frente a la mezcla rotenona (30 μM) y oligomicina A (10 μM) de **1**, **2** y **6** a tres concentraciones (3 – 30 μM).

Comp.	Concentraciones ensayadas		
	3 μM	10 μM	30 μM
1	19.4	22.5	22.6
2	21.4	18.9	52.9 **
6	48.5 **	43.4 *	38.9
Trolox	52.9 *	43.2 *	39.3

Los resultados se expresan como media de 6 experimentos independientes (por cuadruplicado). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Como puede apreciarse, se obtuvieron valores interesantes de neuroprotección, que en el caso de los compuestos **2** y **6** están en torno al 50% para las concentraciones de 30 y de 3 μM respectivamente.

A la vista de estos interesantes resultados, a continuación se trató de dilucidar los mecanismos biológicos implicados en dicho efecto protector. Cabía la posibilidad de que nuestras moléculas actuaran como captadores de radicales o que pudiesen influir en la entrada de Ca^{2+} al interior celular actuando como bloqueantes o potenciadores de canales de calcio voltaje dependientes (CCVD).

1.2.3. Medida de propiedades antioxidantes de los compuestos: captación de peróxido de hidrógeno.

Con el fin de determinar si nuestros compuestos presentaban propiedades antioxidantes, se midió su capacidad de captura de peróxido de hidrógeno en células de neuroblastoma humano, empleando la sonda fluorescente DCFH-DA (diacetato de 2,7-diclorofluoresceína). Esta sonda atraviesa la membrana celular y es hidrolizada por esterasas celulares pasando a su forma no fluorescente DCFH₂, la cual sufre una reacción de oxidación con los radicales de oxígeno pasando a su forma fluorescente

DCF (ver *Figura 29*)¹⁶⁷. La disminución de fluorescencia en presencia de nuestros compuestos, añadidos inmediatamente antes de H₂O₂, indicaría un efecto secuestrador de radicales libres. Si la disminución tuviese lugar tras una preincubación de 24 h, indicaría la posible activación de mecanismos involucrados en la supervivencia celular.

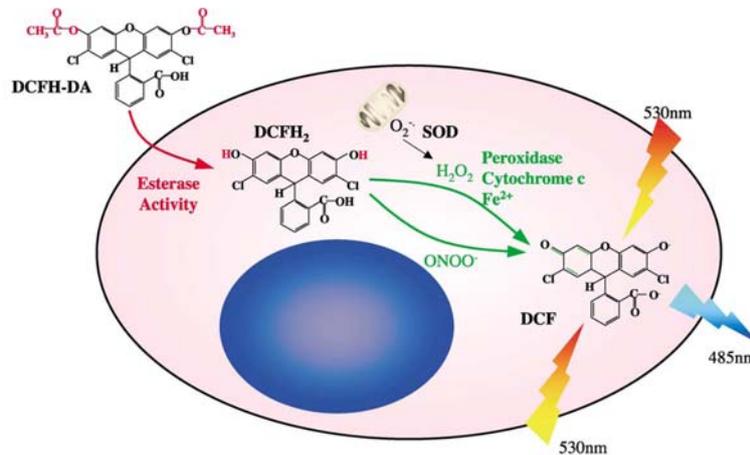


Figura 29. Reacciones de la sonda DCFH-DA en el interior celular.

El protocolo seguido fue el siguiente: las células se preincubaron durante 10 min ó 24 h con cada uno de los compuestos seleccionados en medio de cultivo DMEM a las concentraciones de mayor protección en los experimento previos. Simultáneamente, también se realizaron ensayos en los que el producto se preincubó durante 24 h en presencia de nimodipino a 10 μ M. Tras este periodo de tiempo, se añadió 10 μ M de DCFH-DA a las células, dejándolo en incubación durante 45 min. Se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por uno nuevo al cual se añadió H₂O₂ a la concentración final de 60 μ M y el compuesto objeto del estudio (concentración de mayor protección), incubando durante 24 h adicionales. Transcurrido este tiempo se midió la fluorescencia de la muestra (*Figura 30*).

¹⁶⁷ Molina, M.; Sánchez, M. I.; Cascales, M.; Benedi, J. Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Brain Res.* **2004**, *1009*, 9-16.

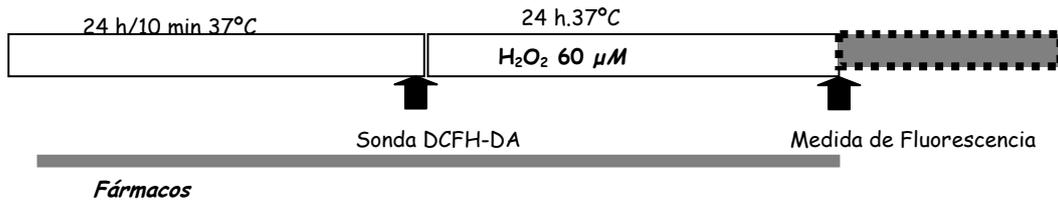


Figura 30. Esquema del protocolo empleado para evaluar el efecto antioxidante de los compuestos **1**, **2** y **6** frente a la lesión inducida por H_2O_2 .

Los resultados obtenidos se encuentran en la *Figura 31*, donde se muestra la capacidad antioxidante de los compuestos a las concentraciones de mayor neuroprotección de los mismos, sin preincubar (0 h), preincubando 24 h y preincubando 24 h en presencia de nimodipino (24 h + n). Estos datos se analizaron con el programa de estadística Prisma 3 y se sometieron a un análisis estadístico con el programa ANOVA.

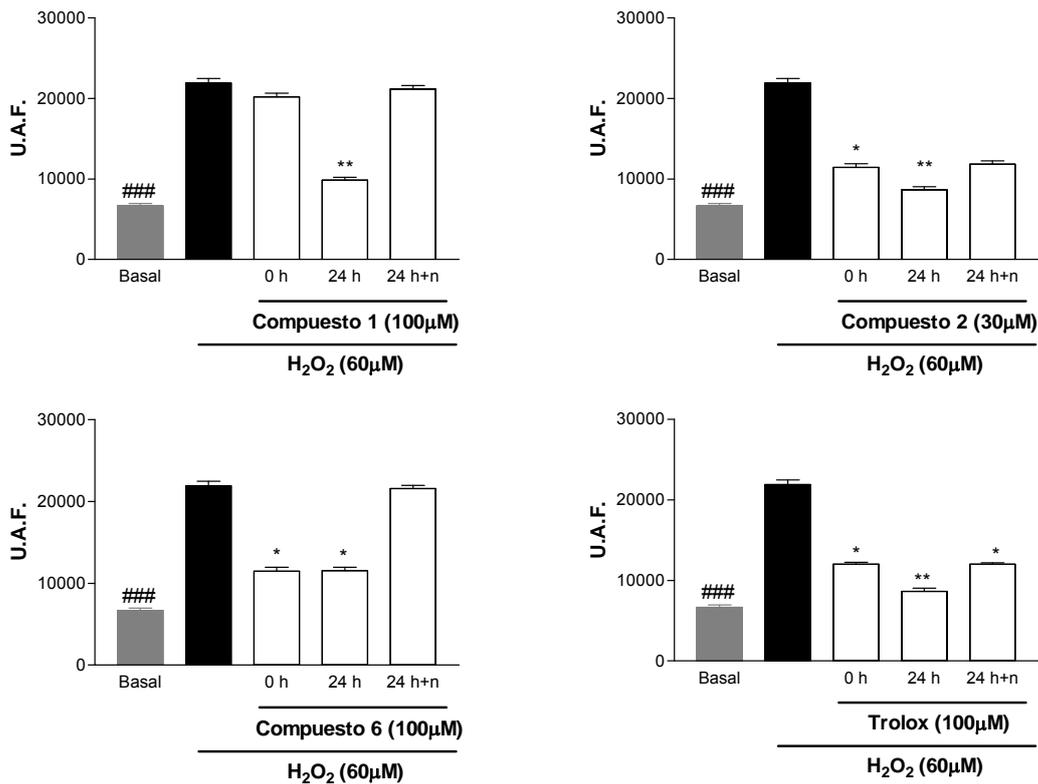


Figura 31. Capacidad antioxidante de los compuestos sin preincubar (0 h), preincubando 24 h y preincubando 24 h en presencia de nimodipino (24 h + n). Media de 4 experimentos independientes (cada uno de ellos por cuadruplicado) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, respecto al tóxico.

El compuesto **1** sin preincubación no disminuyó significativamente la fluorescencia emitida en presencia de H₂O₂, pero sí lo hizo cuando el compuesto se preincubaba durante 24 h, disminución que se revertía en presencia de nimodipino. Esto parece indicar que este compuesto no es secuestrador de radicales libres, sino que su efecto neuroprotector estaría ligado probablemente a su interacción con canales de calcio.

Los compuestos **2**, **6** y trolox indujeron una disminución de la fluorescencia tanto sin preincubación como con preincubación durante 24 h, con valores de fluorescencia muy próximos a los basales. En el caso de la fenotiazina **2** y del trolox este efecto no revierte en presencia de nimodipino, lo que sugiere que ambos compuestos actúan mayoritariamente mediante un mecanismo de captación de radicales. Por el contrario, en el caso de la dibenzotiadiazepina **6** la disminución de fluorescencia revierte en presencia de nimodipino, lo que apunta a un doble mecanismo de acción: secuestro de radicales libres y protección mediada por calcio.

1.2.4. Medida de la concentración de calcio citosólico.

El ion calcio (II) juega un papel fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria, además de estar involucrado en la supervivencia y muerte neuronal. La incapacidad de las neuronas para regular la homeostasis del Ca²⁺ es un aspecto de gran importancia en la patogénesis de la EA, que parece estar íntimamente relacionada con la disfunción y la muerte de las neuronas¹⁶⁸. Estudios realizados en enfermos de Alzheimer sobre la actividad patógena de la proteína APP, de las mutaciones en el gen PS1, demuestran la desregulación del calcio en la EA. El procesamiento anómalo de la proteína APP puede desestabilizar la homeostasis del calcio en neuronas mediante el incremento de la producción de Aβ₄₂ y la disminución de los niveles de sAPPα. El péptido Aβ puede perturbar la regulación del calcio mediante la inducción de estrés oxidativo, que produce daños en la membrana que afectan a los mecanismos que regulan la entrada de calcio; además, induce la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje (CCVD)¹⁶⁹.

¹⁶⁸ Gabuzda, D.; Busciglio, J.; Chen, L. B.; Matsudaira, P.; Yankner, B. A. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13623-8.

¹⁶⁹ Mattson, M. P.; Chan, S. L. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell. Calcium.* **2003**, *34*, 385-97.

Teniendo en cuenta estos hechos y conociendo que la principal vía de entrada de calcio al lumen celular son los CCVD, nos propusimos estudiar el efecto de los compuestos seleccionados sobre la entrada de calcio al citosol. Asimismo, se estudió la capacidad de nuestras moléculas para bloquear o potenciar (si fuera el caso) la corriente de calcio inducida por un estímulo despolarizante.

Para determinar la $[Ca^{2+}]_c$ se utilizó la sonda fluorescente fluo-4/AM, que es un derivado del quelante de calcio BAPTA unido covalentemente a un fluorocromo, la fluoresceína, que al unirse al Ca^{2+} emite fluorescencia. Este marcador fluorescente puede atravesar la membrana celular, en forma de éster de acetoximetilo (fluo-4/AM), entrando en las células, donde las esterasas endógenas hidrolizan el acetometilester transformándolo en la forma ácida de fluo-4, que queda atrapado en el citosol.

Los ensayos que se realizaron en presencia de nuestros compuestos, nos permitieron medir la $[Ca^{2+}]_c$ que inducían las concentraciones más neuroprotectoras, comparándolas con potasio (70mM). El protocolo seguido en este experimento se encuentra reflejado en la parte experimental de esta memoria y los resultados se muestran en la *Figura 32*.

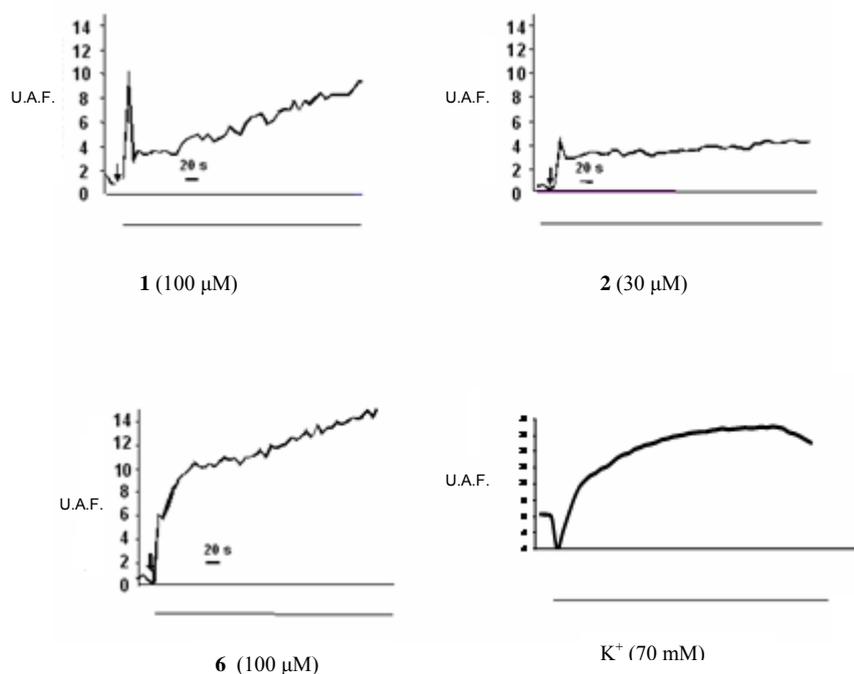


Figura 32. Porcentaje de fluorescencia (incremento de calcio) frente al tiempo. Las flechas indican el momento (50 segundos) en el que se inyectan los compuestos en las células. Los resultados se obtienen en U.A.F. (unidades arbitrarias de fluorescencia), que son normalizadas para dar el % de fluorescencia. Media de cuatro experimentos independientes por cuadruplicado.

Como podemos ver en la *Figura 12*, los compuestos, al ser inyectados en las células, inducen por sí mismos un aumento de la $[Ca^{2+}]_c$, muy notable en el caso de **1** y **6**. Para el compuesto **2** su aumento es bastante menor, parecido al producido por los bloqueantes de canales de calcio, por lo que podría actuar como bloqueante. Sin embargo, a partir de estos experimentos no podemos deducir si este aumento se produce por la entrada a través de canales de Ca^{2+} o bien por salida de los depósitos intracelulares como el retículo endoplásmico. Para tratar de dilucidarlo se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

1.2.5. Medida de la $[Ca^{2+}]_c$ inducida por los compuestos en presencia de nimodipino

La línea celular de neuroblastoma humano posee gran densidad de canales de calcio del subtipo L, por lo que decidimos usar un bloqueante específico de dichos canales, el nimodipino¹⁷⁰, para comprobar si en su presencia se reducía o anulaba la elevación de $[Ca^{2+}]_c$ inducida por nuestros compuestos. Se midió el porcentaje de fluorescencia (entrada de calcio) en el pico máximo frente a cada compuesto a las concentraciones más neuroprotectoras, con y sin nimodipino, utilizando potasio como control positivo (*Figura 33*).

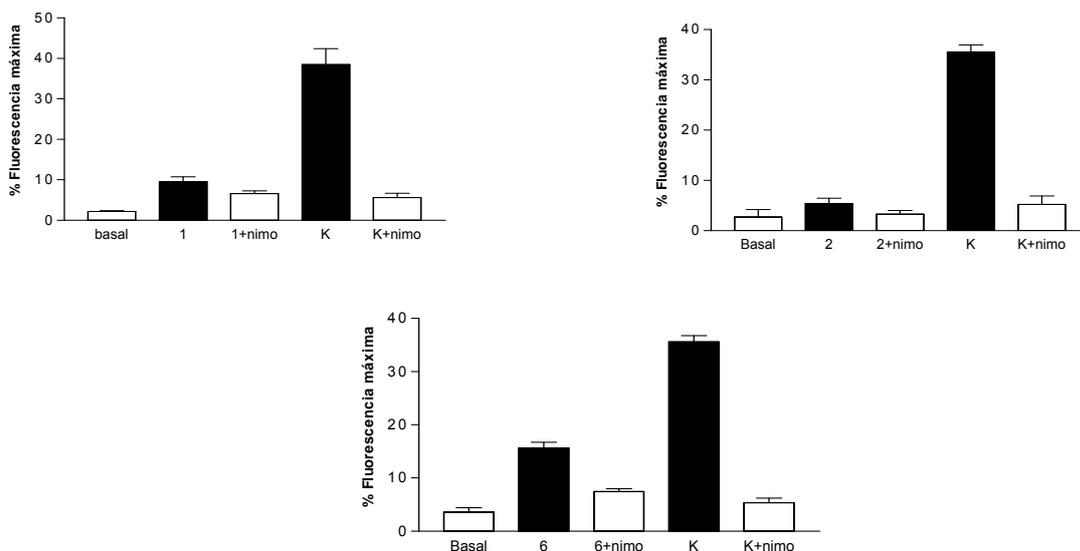


Figura 33. Porcentaje de fluorescencia en el pico máximo de cada compuesto, con y sin nimodipino. Media de 4 experimentos independientes (por cuadruplicado).

¹⁷⁰ Jonge, M.; Traber, J. Nimodipine: cognition, aging, and degeneration. *Clin. Neuropharm.* **1993**, *16*, S25-30.

Como puede observarse, el incremento de calcio inducido por los compuestos disminuía parcialmente cuando, tras incubar las células durante 10 min con nimodipino (10 μM), éstos se aplicaban en presencia de dicho bloqueante. Esto nos permite deducir que el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ producido por los compuestos tiene su origen, al menos en parte, en la entrada a través de canales voltaje dependientes del subtipo L.

Nos preguntamos a continuación si esta reversión de la señal de calcio observada en presencia de nimodipino tendría lugar igualmente en la neuroprotección obtenida con nuestros compuestos. Para comprobarlo llevamos a cabo los experimentos recogidos en el siguiente epígrafe.

1.2.6. Medida de la neuroprotección frente a H_2O_2 inducida por los compuestos en presencia de nimodipino.

Las células de neuroblastoma se incubaron previamente durante 10 min con nimodipino (10 μM) y seguidamente se trataron con los compuestos, a las concentraciones más neuroprotectoras, durante 24 horas según lo descrito en el punto 3.2.2 de esta Memoria. Paralelamente, se realizaron experimentos similares en los que no se incorporó nimodipino. Los resultados se muestran en la *Figura 34* como LDH liberada % total al cabo de 24 horas de incubación.

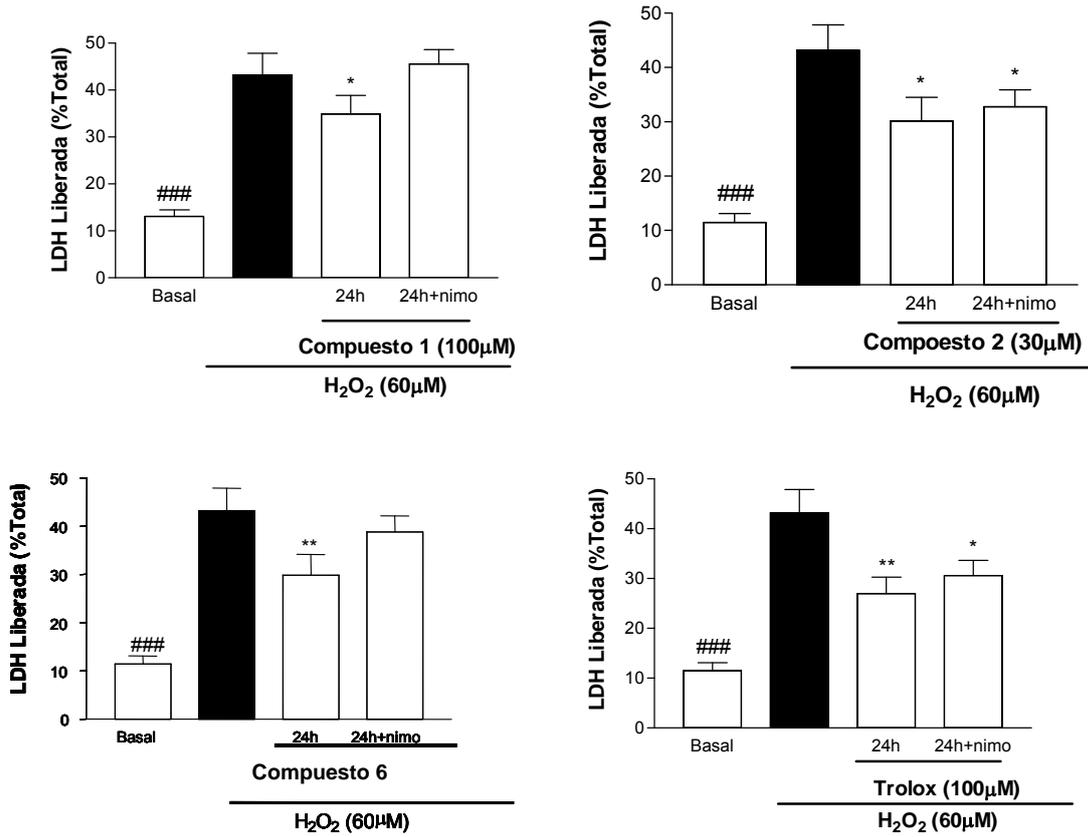


Figura 34. Porcentaje de LDH liberada con respecto a la total (muerte celular) empleando agua oxigenada (60 µM) como tóxico, en presencia o ausencia de nimodipino. Media de 6 experimentos independientes (por cuadruplicado) ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, respecto al tóxico.

Teniendo en cuenta el porcentaje de LDH basal, se calculó el porcentaje de neuroprotección (Tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de neuroprotección frente a H₂O₂ (60 µM) en ausencia y en presencia de nimodipino (10 µM).

Comp.	Sin nimodipino	Con nimodipino
1 (a 100 µM)	42.1 *	16.4
2 (a 30 µM)	42.4 *	36.5 *
6 (a 100 µM)	41.0 **	0
Trolox	64.4 **	60.3 *

Los resultados se expresan como media de 4 experimentos independientes (por triplicado). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Como puede observarse, para los compuestos **1** y **6** la neuroprotección frente al agua oxigenada se revertía parcial (fenotiazina **1**) o totalmente (dibenzotiadiazepina **6**) en presencia de nimodipino, lo que indicaría que la entrada de iones calcio por canales L podría intervenir, al menos parcialmente, en el proceso de neuroprotección de estos dos compuestos. No así en el caso de la fenotiazina **2** y del trolox, donde el efecto neuroprotector se debería a su capacidad antioxidante y no a la entrada de calcio, puesto que el nimodipino no es capaz de abolir el efecto neuroprotector.

Por lo tanto, podemos concluir que el posible mecanismo neuroprotector de la *N*-acilaminofenotiazina **1** estaría relacionado con su interacción con canales de calcio de tipo L, mientras que su análogo **2** actuaría principalmente a través de la captación de radicales libres. La dibenzotiadiazepina **6** presentaría un mecanismo neuroprotector mixto: captación de radicales e interacción con canales de calcio.

1.2.7. Capacidad de penetración en el sistema nervioso central.

Por último, se evaluó la capacidad de los derivados **1**, **2** y **6** para atravesar la barrera hematoencefálica, una propiedad imprescindible para que puedan ejercer su acción terapéutica en el sistema nervioso central. Se empleó un método *in vitro* denominado PAMPA-BBB (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay – Blood-Brain Barrier*), descrito por Di y col¹⁷¹ y recientemente optimizado en nuestro grupo de investigación para moléculas con limitada solubilidad acuosa^{115,172,173}.

Los compuestos fueron ensayados empleando una mezcla de tampón fosfato salino a pH 7.4 y etanol en proporción 90:10, por lo que previamente el método tuvo que ser

¹⁷¹ Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier, *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 223-232.

¹⁷² (a) Rodríguez-Franco, M. I.; Abellán, G. Determinación *in vitro* de la absorción oral y de la penetración en SNC de moléculas con solubilidad limitada. XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Química Terapéutica. Bilbao, **2005**. (b) Alonso, M.; Dorronsoro, I.; Castro, A.; Rodríguez-Franco, M. I.; Abellán, G.; Boiani, M.; Vericat, J. A.; Martínez, A., Oral bioavailability and blood-brain barrier penetration properties of TDZDs, the first ATP-non competitive GSK-3 inhibitors. XVIIIth International Symposium on Medicinal Chemistry. Copenhagen, **2004**.

¹⁷³ (a) Pavón, F. J.; Bilbao, A.; Hernández-Folgado, L.; Cippitelli, A.; Jagerovic, N.; Abellán, G.; Rodríguez-Franco, M. I.; Serrano, A.; Macías, M.; Gómez, R.; Navarro, M.; Goya, P.; Rodríguez de Fonseca, F., Antiobesity effects of the novel *in vivo* neutral cannabinoid receptor antagonist 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1*H*-1,2,4-triazole – LH 21, *Neuropharmacology*. **2006**, *51*, 358-366. (b) Reviriego, F.; Rodríguez-Franco, M. I.; Navarro, P.; García-España, E.; Liu-González, M.; Verdejo, B.; Domènech, A., The sodium salt of diethyl 1*H*-pyrazole-3,5-dicarboxylate as an efficient amphiphilic receptor for dopamine and amphetamines. Crystal structure and solution studies., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16458-16459.

validado en las mismas condiciones con productos comerciales de los que se conocía su grado de penetración en el sistema nervioso central (*Tabla 11*), obteniendo una buena relación lineal entre la permeabilidad experimental y la descrita. A partir de esta correlación se pudieron establecer los límites para predecir el paso de la barrera hematoencefálica: las moléculas con una permeabilidad (P_e) mayor de $2.7 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ serían capaces de penetrar en cerebro, mientras que no lo harían cuando su permeabilidad fuera inferior a $1.9 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$. Como puede observarse en la tabla 9, los tres derivados **1**, **2** y **6** presentan permeabilidades superiores a $2.7 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ y por lo tanto, serían capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a sus dianas terapéuticas situadas en el SNC.

Tabla 11. Evaluación in vitro de la penetración en el SNC, empleando la metodología PAMPA-BBB

Compuesto	Permeabilidad P_e ($10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)		Clasificación SNC ^c
	Descrita ^a	Experimental ^b	
Testosterona	17.0	9.7 ± 0.1	SNC +
Verapamilo	16.0	6.9 ± 0.04	SNC +
Imipramina	13.0	5.1 ± 0.2	SNC +
Desipramina	12.0	8.1 ± 0.2	SNC +
Progesterona	9.5	3.9 ± 0.2	SNC +
Promazina	8.8	5.2 ± 0.2	SNC +
Clorpromazina	6.5	2.4 ± 0.1	SNC +
Clonidina	5.3	5.9 ± 0.1	SNC +
Piroxicam	2.5	1.6 ± 0.003	SNC –
Cafeína	1.3	2.2 ± 0.01	SNC –
Aldosterona	1.2	2.4 ± 0.1	SNC –
Lomefloxazina	1.1	1.4 ± 0.03	SNC –
Enoxazina	0.9	1.7 ± 0.01	SNC –
Atenolol	0.8	0.3 ± 0.01	SNC –
Ofloxazina	0.8	0.7 ± 0.01	SNC –
1		9.1 ± 0.3	SNC +
2		7.8 ± 0.2	SNC +
6		6.7 ± 0.2	SNC +

^aDi y col. (Ref 18). ^bMedia \pm desviación estándar.

^cSNC+ indica que el producto sí penetra en el SNC y SNC– que no lo hace.

La conclusión que se extrae de estos resultados es que los productos, al ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, son también capaces de alcanzar sus dianas terapéuticas en el cerebro, una condición casi imprescindible para formar parte de fármacos útiles para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso en general y neurodegenerativas en particular, tales como la enfermedad de Alzheimer.

El trabajo precedente nos ha permitido identificar a las fenotiazinas **1** y **2** y a la dibenzotiadiazepina **6** como buenos cabeza de serie en la búsqueda de agentes neuroprotectores. Las interesantes propiedades farmacológicas que presentan justifican la realización de modificaciones de su estructura con el objeto de optimizar y mejorar las propiedades de estos compuestos. Así en los dos siguientes capítulos de esta Tesis nos centraremos en la síntesis y evaluación biológica de *N*-acilaminofenotiazinas y de dibenzotiadiazepinas.

2. Optimización de la serie de *N*-acilaminofenotiazinas.

Teniendo en cuenta las buenas propiedades neuroprotectoras encontradas para **2**, a continuación nos propusimos el desarrollo y optimización de una serie de *N*-acilaminofenotiazinas. Para ello, se siguieron dos estrategias: la evaluación de productos de nuestra quimioteca estructuralmente relacionados con **2** y que aún no habían sido probados¹⁴²⁻¹⁴⁴, así como la síntesis de nuevas estructuras.

De los productos de la quimioteca, se eligieron las once *N*-acilaminofenotiazinas recogidas en la *Figura 35*, en los que el sistema heterocíclico, o bien no se encuentra sustituido o bien tiene un átomo de cloro, generalmente en las posiciones 2 ó 3. También se consideró probar, además de la cadena lateral de dimetilamina presente en **2**, otras aminas terciarias relacionadas, como piperidina y pirrolidina. Con fines comparativos, se probó la acetamida **17**, carente de la amina terciaria final. A diferencia de **2** que tiene dos metilenos entre el carbonilo y la amina terciaria, en todos estos productos existe un único metileno, o metilo en el caso de **17**.

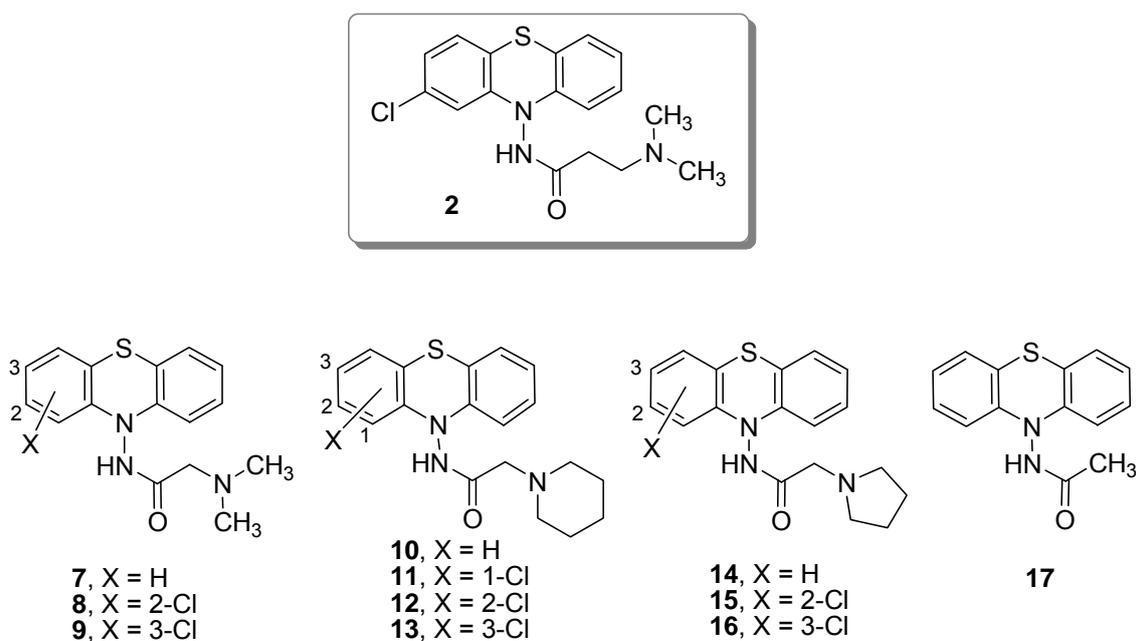


Figura 35. Productos elegidos de la quimioteca para ser evaluados.

Como en el capítulo precedente, estas fenotiazinas elegidas de nuestra quimioteca fueron purificadas empleando cromatografía flash en columnas de gel de sílice. Todos los productos son sólidos cristalinos, cuyos puntos de fusión y su pureza por HPLC se encuentran recogidos en la *Tabla 12*.

Tabla 12. Puntos de fusión y pureza de los productos.

Producto	Punto de fusión (°C)		HPLC ^a
	Exper.	Bibl.	Pureza (%)
7	182-184	190-191	99
8	216-218	210-212	100
9	189-191	176-178	99
10	201-203	205-207	96
11	173-175	183-185	99
12	197-199	192-194	99
13	197-199	203-205	100
14	182-184	187-189	99
15	219-221	211-213	99
16	184-186	182-184	100
17	230-232	226-228	100

^aColumna Delta Pack C₁₈; eluyente: CH₃CN : H₂O / CF₃CO₂H (0.05%).

También nos planteamos la síntesis de nuevas *N*-acilaminofenotiazinas en las que, manteniendo los dos metilenos entre el carbonilo y la amina terciaria como en **2**, se pudieran incorporar sustituyentes activantes y desactivantes en el sistema heterocíclico. Por analogía con los productos de la quimioteca, se planeó incorporar fragmentos de piperazina y pirrolidina en la cadena lateral (*Figura 36*).

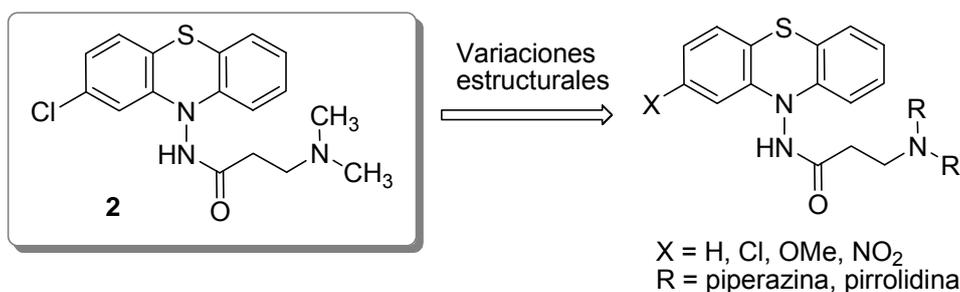
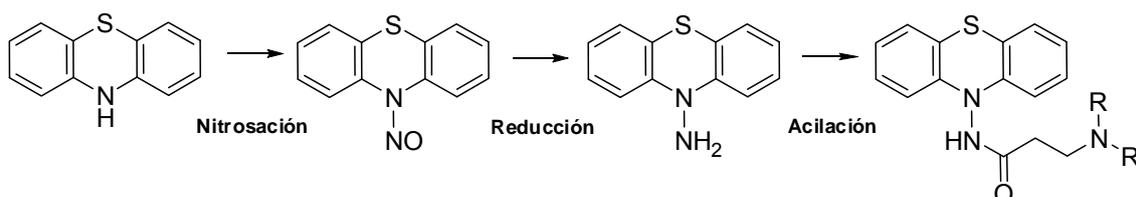


Figura 36. Variaciones propuestas sobre la estructura de 2 para la obtención de nuevas *N*-acilaminofenotiazinas.

2.1. Síntesis de nuevas *N*-acilaminofenotiazinas.

Inicialmente, la síntesis de los compuestos propuestos en la *Figura 37* se planteó por acilación de la *N*-aminofenotiazina, que a su vez podría ser obtenida por nitrosación y posterior reducción de la fenotiazina, esta última de origen comercial (*Esquema 1*).



Esquema 1. Ruta de síntesis propuesta para la obtención de *N*-acilaminofenotiazinas.

El tratamiento durante dos horas de fenotiazina con nitrito sódico a 0 °C empleando diferentes medios de reacción (ácido acético o mezclas de etanol : ácido acético y etanol : ácido clorhídrico)¹⁷⁴ condujo a mezclas complejas, de las que no fue posible aislar la *N*-nitrosfenotiazina.

Un camino alternativo consistiría en el tratamiento de la fenotiazina con el ácido hidroxilamino-*O*-sulfónico (HOSA) en medio básico, que conduciría directamente a la *N*-aminofenotiazina, según lo descrito por Somei y Natsume para la serie de los indoles¹⁷⁵ y por nuestro grupo de investigación para otros heterociclos¹⁷⁶.

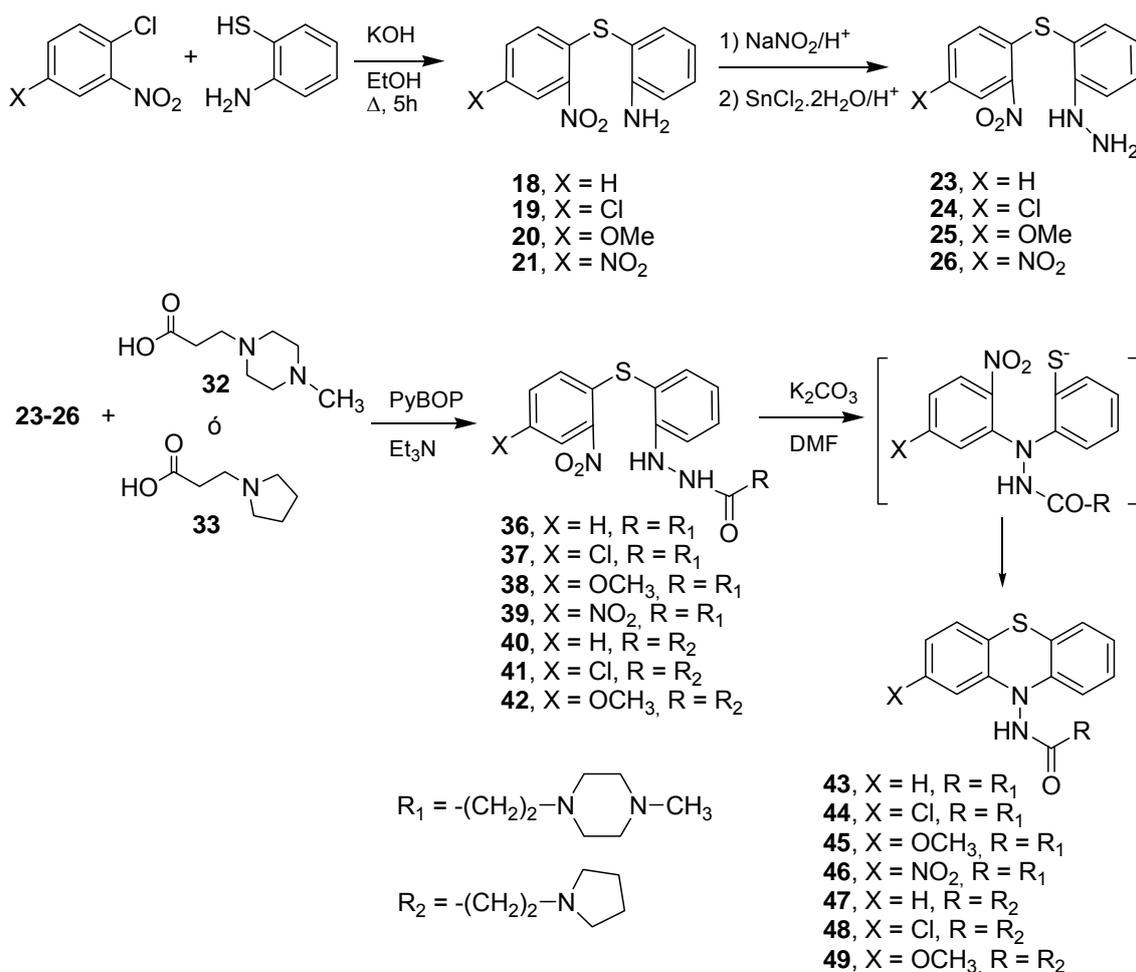
¹⁷⁴ Crumrine, D. S.; Brodbeck, C. M.; Dombrowski, P. H.; Haberkamp, T. J.; Kekstas, R. J.; Nabor, P.; Nomura, G. S.; Padleckas, H. A. Photocleavage of Diarylnitrosamines in Neutral Media. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4246-4249.

¹⁷⁵ Somei, M.; Natsume, M. 1-Aminoindoles. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *5*, 461-462.

Desafortunadamente, el tratamiento de la fenotiazina con HOSA en presencia de carbonato potásico como base y *N,N*-dimetilformamida como disolvente condujo a mezclas complejas de las que no pudo ser aislado el *N*-aminoderivado deseado.

Ante estos resultados negativos, decidimos aplicar el método descrito por Corral y colaboradores para la síntesis de fenotiazinas y sistemas relacionados¹⁴²⁻¹⁴⁴. La reacción entre el *o*-cloronitrobenceno correspondiente y el *o*-aminotiofenol, en presencia de hidróxido potásico como base y etanol como disolvente, condujo a los diarilsulfuro intermedios (**18-21**) con buenos rendimientos (*Esquema 2*). El tratamiento consecutivo de **18-21** con nitrito sódico y cloruro de estaño (II) proporcionó las hidrazinas **22-25**, con rendimientos comprendidos entre el 51 y el 75 %. A continuación, los ácidos **28** y **29**, obtenidos según el *Esquema 3*, fueron activados con PyBOP y acoplados con las hidrazinas intermedias **22-25** en presencia de trietilamina para dar lugar a las hidrazidas **30-36**. Estas últimas, en medio básico sufren una transposición o reagrupamiento de Smile, dando lugar a las *N*-acilaminofenotiazinas deseadas **37-43**.

¹⁷⁶ (a) Rodríguez-Franco, M. I.; Dorronsoro, I.; Martínez, A.; Pérez, C.; Badía, A.; Baños, J. E. Synthesis of New *N*-(4-Pyridyl)-1-Aminopyrazoles and their Muscarinic and Adrenergic Properties. *Arch. Pharm. - Pharm. Med. Chem.* **2000**, *333*, 118-122. (b) Rodríguez-Franco, M. I.; Dorronsoro, I.; Martínez, A.; Castro, A. Hindered Inversion/Rotation in Diheteroaryl Alkyl Amines with a *N*-(1-Pyrazolyl) Group: Dynamic NMR and Molecular Modelling Studies. *Tetrahedron.* **2000**, *56*, 1739-1743.

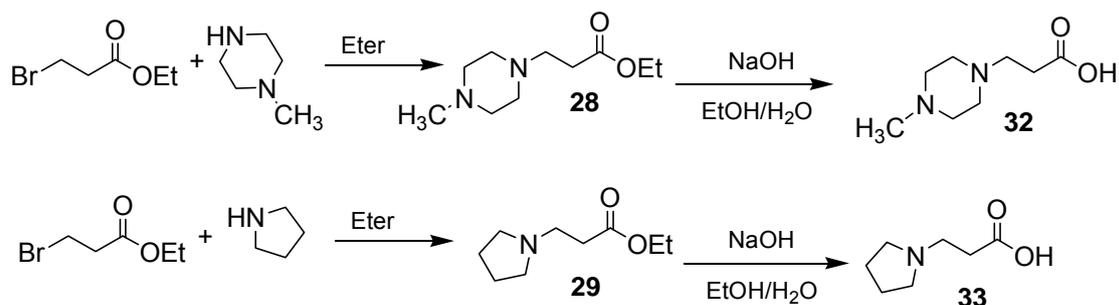


Esquema 2. Síntesis de las *N*-acilaminofenotiazinas

A su vez, para obtener los ácidos **32** y **33** se hizo reaccionar 3-bromopropanoato de etilo con la amina correspondiente, obteniendo el correspondiente éster (**28** y **29**)¹⁷⁷, que fue hidrolizado con hidróxido sódico para formar el ácido deseado (**32** y **33**)¹⁷⁸.

¹⁷⁷ Nicholas, G.; Michael, D.; Malcolm, F. G.; Stevens, D. C., Lisa, M.; Vickers, S. P.; Langdon, J. A.; Andreas, G. Structural Studies on Bioactive Compounds. 4. A Structure-Antitumor Activity Study on Analogues of *N*-Methylformamide. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1051.

¹⁷⁸ Valerie, A.; Vaillancourt, S. D.; Larsen, S. P. Synthesis and Biological Activity of Aminoguanidine and Diaminoguanidine Analogues of the Antidiabetic/Antiobesity Agent 3-Guanidinopropionic Acid. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1231-1248.



Esquema 3. Síntesis de los ácidos 32 y 33.

Las nuevas *N*-acilaminofenotiazinas **43-49** se obtuvieron como sólidos puros y su estructura fue determinada a partir de sus datos espectroscópicos de EM y RMN. En la *Tabla 13* se han recogido sus puntos de fusión, su pureza por HPLC y su espectrometría de masas.

Tabla 13. Puntos de fusión, pureza y EM de las nuevas *N*-acilaminofenotiazinas **43-49**.

X	R ^b	pf (° C)	HPLC ^a		EM		
			Pureza (%)	Fórmula	MH ⁺	MNa ⁺	
43	H	R ₁	176-178	98	C ₂₀ H ₂₄ N ₄ OS	368	390
44	Cl	R ₁	187-189	99	C ₂₀ H ₂₀ ClN ₄ OS	403	425
45	OCH ₃	R ₁	201-203	99	C ₂₁ H ₂₆ N ₄ O ₂ S	399	421
46	NO ₂	R ₁	191-193	98	C ₂₀ H ₂₃ N ₅ O ₃ S	414	436
47	H	R ₂	194-196	97	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ OS	340	362
48	Cl	R ₂	185-187	99	C ₁₉ H ₂₀ ClN ₃ OS	375	397
49	OCH ₃	R ₂	179-181	99	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	370	392

^a Columna Delta Pack C₁₈; eluyente: CH₃CN : H₂O / CF₃CO₂H (0.05%) . ^b ver estructuras en el *esquema 2*.

2.2. Evaluación biológica.

De la misma manera que los productos del capítulo anterior, las *N*-acilaminofenotiazinas **7-17** y **43-49** fueron evaluadas como inhibidores de colinesterasas y como neuroprotectores en células de neuroblastoma humano.

2.2.1. Inhibición de acetil y butirilcolinesterasa (AChEI, BuChEI).

De nuevo, se aplicó el método de Ellman¹⁵¹ empleando enzimas de mamífero que tienen un alto grado de identidad con las enzimas humanas. Como puede observarse, estos compuestos presentan una marcada selectividad hacia la BuChE, con CI_{50} en los rangos micro y sub-micromolar (*Tabla 15*). Destacan las fenotiazinas derivadas de piperidina **13** (X = 3-Cl) y **10** (X = H), de pirrolidina **14** (X = H) y **49** (X = OCH₃), así como la que contiene un fragmento de *N*-metilpiperazina y un átomo de cloro en la posición 2 del heterociclo (**44**).

Tabla 15. Inhibición de AChE bovina y BuChE equina.

Comp.	AChE, CI_{50} (μ M)	BuChE, CI_{50} (μ M)
7	>100	1.7
8	>100	7.0
9	>100	5.0
10	>100	0.4
11	>100	2.2
12	>100	>100
13	>100	0.7
14	>100	0.8
15	>100	4.3
16	>100	1.0
17	>100	>100
43	>100	1.3
44	>100	0.9
45	>100	2.0
46	>100	1.5
47	>100	1.4
48	>100	3.0
49	>100	0.8

Media de tres experimentos independientes.

2.2.2. Ensayos de neuroprotección en cultivos celulares de neuroblastoma humano.

A continuación, las *N*-acilaminofenotiazinas **7-17** y **43-49** fueron evaluadas en células neuronales, determinándose su toxicidad y su capacidad de protección frente a dos estímulos tóxicos relacionados con el estrés oxidativo, agua oxigenada y una mezcla de rotenona y oligomicina A. Como ya se explicó en el capítulo anterior, el agua oxigenada es un generador exógeno de radicales, mientras que la rotenona y la oligomicina A inhiben respectivamente los complejos I y V de la cadena respiratoria mitocondrial^{179,180}, provocando un aumento de la concentración de radicales libres mitocondriales. También, como en casos anteriores, se empleó la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

2.2.2.1. Neuroprotección frente a agua oxigenada.

En primer lugar, todas las fenotiazinas presentadas en este capítulo **7-17** y **43-49** fueron ensayadas a cuatro concentraciones (1, 3, 10 y 30 μM) en neuroblastoma humano SH-SY5Y, empleando agua oxigenada (60 μM) como tóxico y trolox (la parte activa de la vitamina E, que actúa como antioxidante) como control positivo. El protocolo seguido está esquematizado en la *Figura 37*.

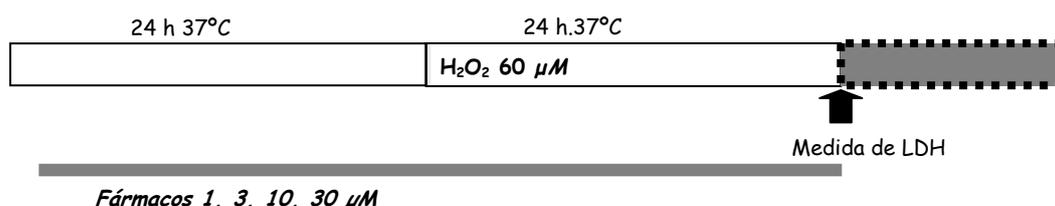
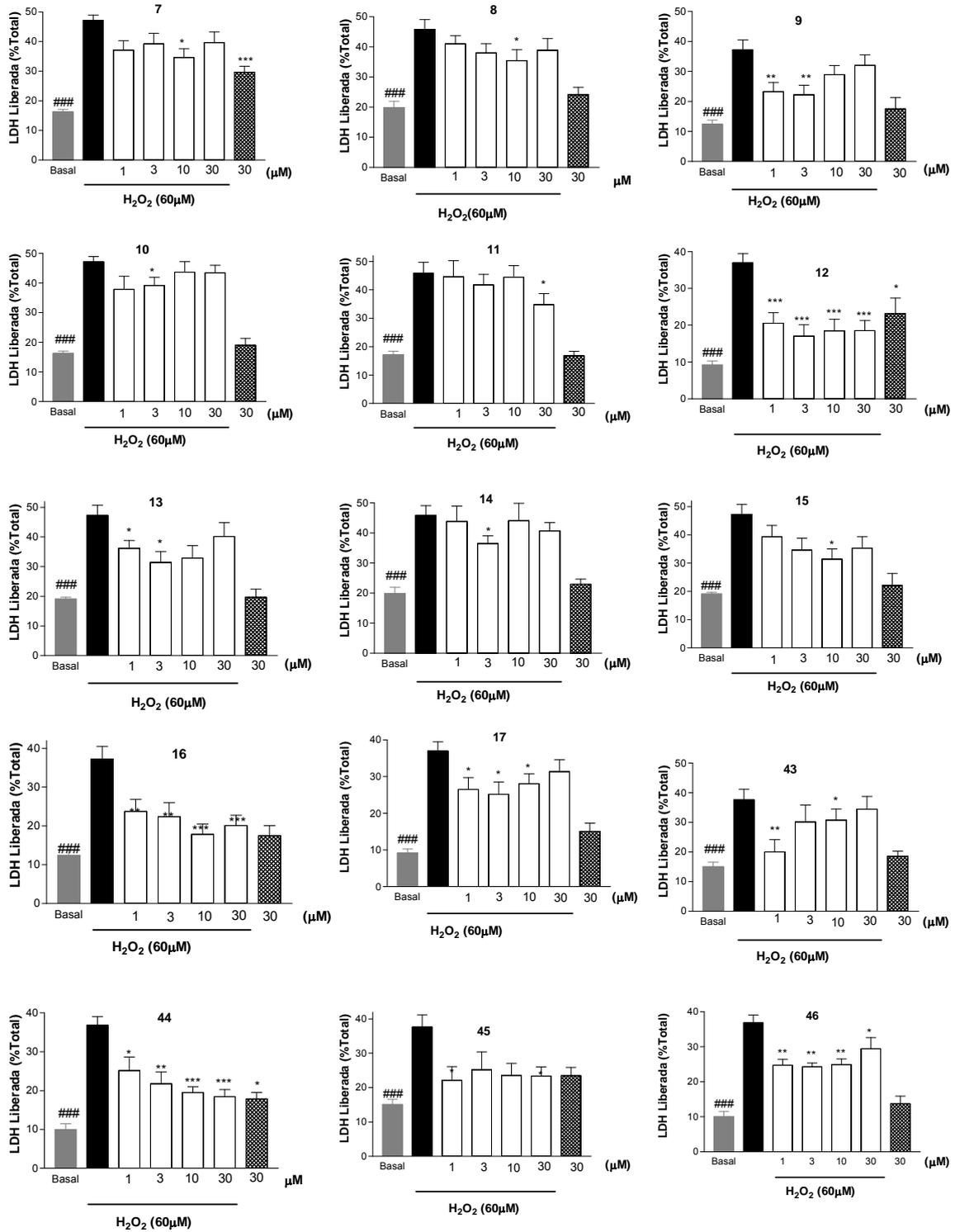


Figura 37. Esquema del protocolo empleado para evaluar el efecto neuroprotector de las fenotiazinas recogidas en este capítulo y trolox frente a la lesión inducida por H_2O_2 .

¹⁷⁹ Newhouse, K.; Hsuan, S. L., Chang, S. H., Cai, B., Wang, Y., Xia, Z. Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicol. Sci.* **2004**, *79*, 137-46.

¹⁸⁰ Liu, L. M., Li, Y., Du, G. C., Chen, J. Increasing glycolytic flux in *Torulopsis glabrata* by redirecting ATP production from oxidative phosphorylation to substrate-level phosphorylation. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 1043-53.

La proporción de muerte celular se calculó a partir de la concentración de lactato deshidrogenasa (LDH)¹⁶⁵ y los resultados se muestran en la *Figura 38*.



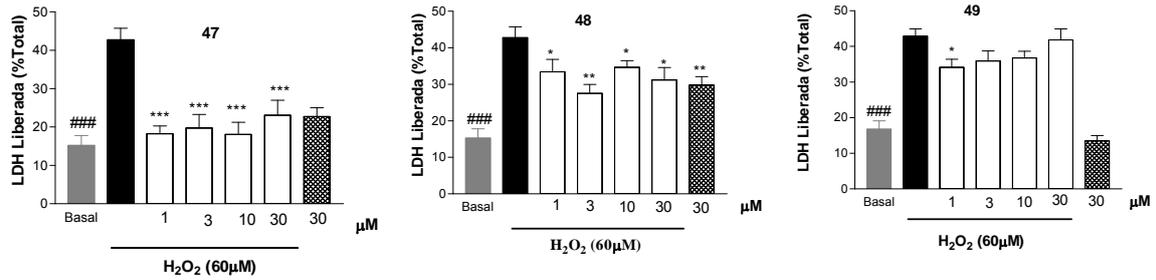


Figura 38. Porcentaje de LDH liberada respecto a la total (muerte celular) empleando H₂O₂ (60 μM) como tóxico. Media de 4 experimentos independientes (cada uno de ellos por triplicado) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, #### $p < 0.001$, respecto al tóxico.

Con el fin de determinar la toxicidad de las fenotiazinas, se midió la proporción de muerte neuronal provocada por cada una de ellas a la máxima concentración empleada (30 μM), en ausencia de tóxico (barra rombos de la derecha). Como puede apreciarse en las gráficas, la mayoría de las *N*-acilaminofenotiazinas no son tóxicas a 30 μM, salvo los derivados **7**, **12**, **44** y **48** que presentan un aumento significativo de la concentración de LDH con respecto al valor basal (barra gris), por lo que fueron descartadas para los estudios posteriores. Esta toxicidad podría ser atribuida a la presencia de un átomo de cloro en la posición 2 de la fenotiazina que presentan tres de estos compuestos (**12**, **44** y **48**).

Teniendo en cuenta la muerte basal en ausencia de tóxico y la provocada por el agua oxigenada a 60 μM (barra negra), se calcularon los porcentajes de neuroprotección de los productos a cada una de las concentraciones ensayadas y los resultados están recogidos en la *Tabla 16*.

Tabla 16. Porcentaje de neuroprotección frente a H₂O₂ (60 μM) de las fenotiazinas 7-17 y 43-49 a cuatro concentraciones (1 – 30 μM).

Comp.	Concentraciones ensayadas			
	1μM	3μM	10μM	30μM
7	30.4	26.2	38.6*	21.9
8	15.6	29.4	42.0*	23.1
9	59.7*	62.6*	28.1	9.6
10	27.2	26.0*	9.6	10.0
11	1.0	9.9	0.0	32.6*
12	66.1***	80.6***	73.8***	76.3***
13	25.4*	55.2*	44.9	17.8
14	13.1	35.5*	18.8	23.2
15	17.3	48.8	54.7*	55.5
16	54.6**	57.7**	79.9***	69.5***
17	40.2*	52.1*	37.2*	21.2
43	82.9**	34.4	22.8*	6.3
44	43.9*	56.6**	68.6***	72.7***
45	49.4*	42.1	66.5	55.0*
46	41.3**	46.4**	46.2**	31.7*
47	90.0***	80.4***	87.9***	72.5***
48	34.4*	57.2**	29.4*	49.0*
49	17.8*	11.8	0.0	0.0
Trolox	n.d.	n.d.	n.d.	57.7

Los resultados se expresan como media de 4 experimentos independientes (por triplicado). *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001. n.d.: no determinado

Como puede comprobarse, los dieciocho productos protegen a las células en mayor o menor medida, frente al daño producido por el agua oxigenada, con valores de neuroprotección que en muchos casos superan o rondan el 50%. A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta la estructura y disponibilidad de los compuestos, se eligieron las fenotiazinas **16**, **43**, **45** y **46** para continuar con su estudio en los modelos de estrés oxidativo mitocondrial. El compuesto **16**, derivado de 3-clorofenotiazina con una pirrolidina en su cadena lateral, fue elegido porque presenta una interesante correlación

dosis-respuesta entre 1 y 10 μM . Los derivados de metilpiperazina **43**, **45** y **46** se eligieron por presentar cada uno de ellos diferentes sustituyentes en el heterociclo (H, OMe y NO_2 , respectivamente).

2.2.2.2. Neuroprotección frente a la mezcla de rotenona y oligomicina A.

Las cuatro fenotiazinas elegidas fueron evaluadas como neuroprotectores frente al estrés oxidativo mitocondrial, empleando como tóxico la combinación de rotenona (30 μM) y oligomicina A (10 μM). Los compuestos fueron evaluados a tres concentraciones empleando condiciones de pre- y de coincubación. En el primer protocolo las células fueron tratadas con el producto a evaluar 24 horas antes de ser sometidas al tóxico, mientras que en las condiciones de coincubación el tóxico y la muestra fueron añadidos de forma simultánea.

Los resultados de muerte neuronal se han recogido en la *Figura 39* y el porcentaje de neuroprotección de cada uno de los compuestos ensayados se encuentra en la *Tabla 17*.

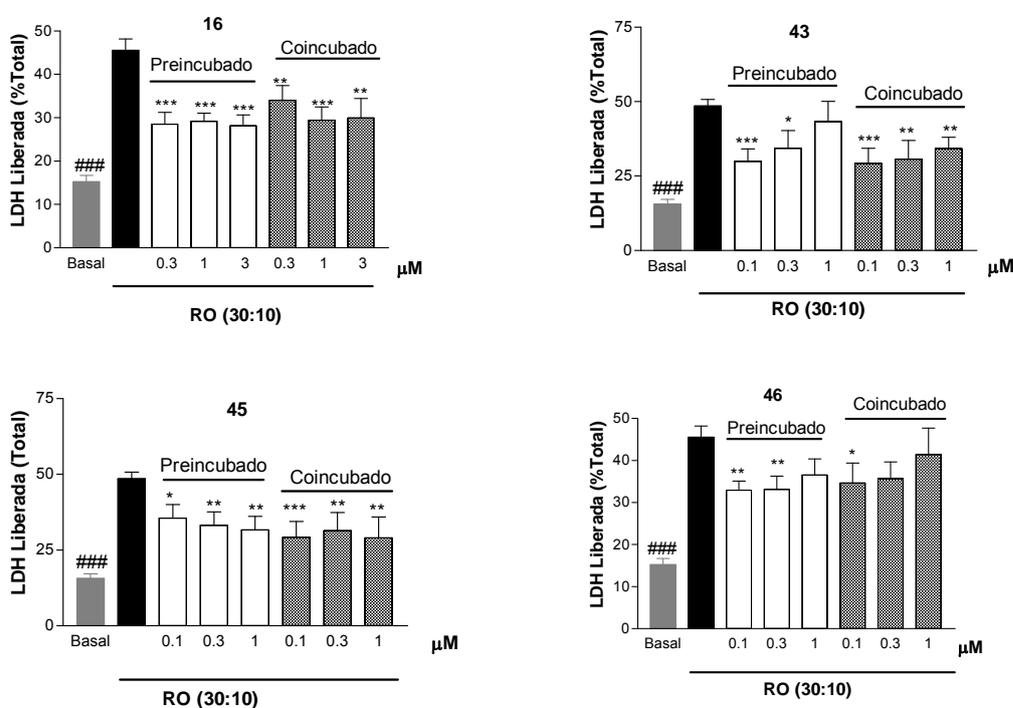


Figura 39. Porcentaje de LDH liberada respecto al total (muerte celular) empleando como tóxico la mezcla de rotenona (30 μM) y oligomicina A (10 μM). Media de 6 experimentos independientes (cada uno de ellos por cuadruplicado) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ### $p < 0.001$, respecto al tóxico.

Tabla 17. Porcentaje de neuroprotección frente a la mezcla de rotenona (30 μ M) y oligomicina A (10 μ M) de las fenotiazinas **16**, **43**, **45** y **46** a tres concentraciones, en condiciones de pre- y coincubación.

	Pre-incubación				Co-incubación			
	0.1 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	0.1 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M
16	n.d.	51.8***	58.9***	38.3***	n.d.	26.6**	44.1***	44.3**
43	58.8***	42.4*	16.5	n.d.	66.1***	63.7**	52.6**	n.d.
45	37.2*	49.3**	50.8**	n.d.	60.3***	57.9**	65.4**	n.d.
46	38.3**	42.0**	21.2	n.d.	29.6*	25.1	4.2	n.d.

Los resultados son la media de 4 experimentos independientes (por triplicado).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Las fenotiazinas **16** y **46** presentan una mayor protección en preincubación que en coincubación, mientras que los derivados **43** y **45** protegen más eficazmente a las neuronas cuando se emplean en condiciones de coincubación. Esto sugiere la existencia de dos mecanismos diferentes de neuroprotección, en el primer caso relacionado con la biosíntesis de moléculas importantes para la supervivencia celular, y en el segundo caso relacionado con la captación de radicales libres.

2.2.3. Medida de propiedades antioxidantes: captación de peróxido de hidrógeno.

Con el objetivo de estudiar si las fenotiazinas seleccionadas (**16**, **43**, **45** y **46**) presentaban propiedades antioxidantes, se determinó su capacidad para neutralizar radicales libres mitocondriales en células de neuroblastoma humano, empleando la sonda fluorescente DCFH-DA. El protocolo utilizado fue muy similar al descrito en el apartado 1.2.3 del capítulo anterior: las células se preincubaron durante 10 min con cada uno de los compuestos a evaluar, a las concentraciones de mayor protección, en medio de cultivo DMEM. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por uno nuevo al cual se añadió la mezcla de rotenona y oligomicina A (30+10 μ M) y el compuesto objeto del estudio (concentración de mayor protección), dejándose durante 2h. Transcurrido este tiempo, se despegaron las células de la placa de cultivo se

centrifugaron y se resuspendieron en medio, en presencia de la sonda DCFH-DA a 10 μ M, dejando actuar a la misma durante 45 min. A continuación se midió la fluorescencia mediante un citómetro de flujo. Como control positivo se utilizó trolox y los resultados se muestran en la *Figura 40*.

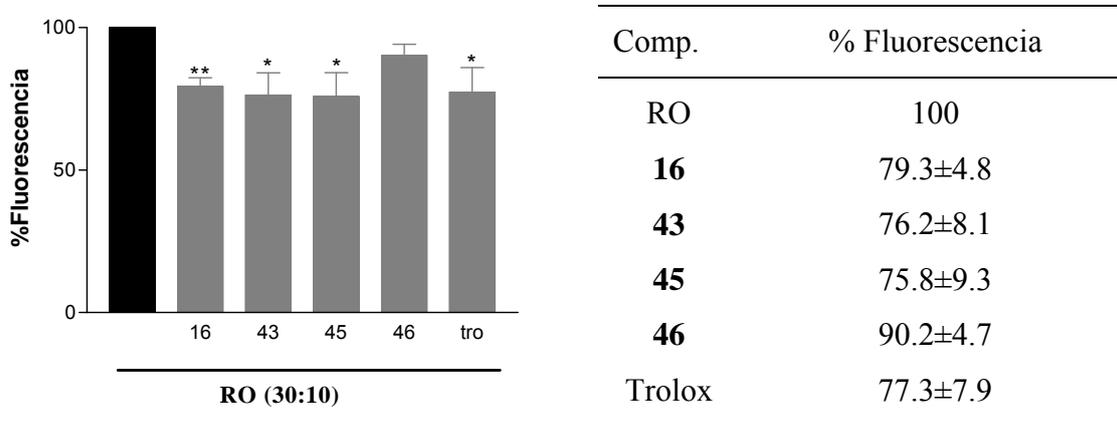


Figura 40. Capacidad antioxidante de los compuestos a las concentraciones de mayor neuroprotección de los mismos frente a la mezcla de rotenona (30 μ M) y oligomicina A (10 μ M). Media de 4 experimentos independientes por cuadruplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, con respecto al tóxico.

Comparando la fluorescencia emitida por la sonda en presencia únicamente del tóxico (barra negra) y la emitida en presencia de la mezcla del tóxico y los compuestos (barras grises), podemos comprobar que todos presentan una disminución de la señal. Mientras que en el caso del compuesto **46** esta disminución es moderada, el resto de las fenotiazinas (**16**, **43** y **45**) presentan valores semejantes a los del trolox, conocido captador de radicales libres, por lo que podemos concluir que estos compuestos actúan, al menos en parte, como antioxidantes neutralizando radicales.

2.2.4. Medida de la concentración de calcio citosólico.

Como ya se explicó con anterioridad, el ion Ca^{2+} juega un papel fundamental en el aprendizaje y la memoria, además de estar involucrado en los procesos de supervivencia neuronal. Por lo tanto, también en este caso se estudió la capacidad de las fenotiazinas **16**, **43**, **45** y **46** para bloquear o potenciar la corriente de calcio inducida por un estímulo despolarizante como es el potasio.

Los ensayos nos permitieron medir la $[Ca^{2+}]_c$ que inducían las fenotiazinas a la concentración de 10 μ M, comparándolas con potasio (70 mM). Como control positivo

se empleó nifedipino, que es un antagonista de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCVD). El protocolo seguido en este experimento se encuentra reflejado en la parte experimental de esta memoria y en el capítulo anterior y los resultados se muestran en la *Figura 41*.

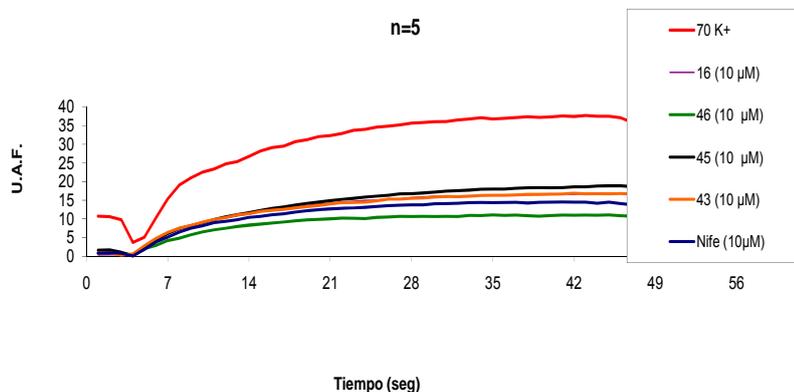
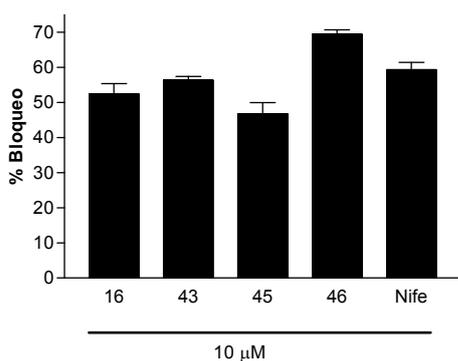


Figura 41. Porcentaje de fluorescencia (incremento de calcio) frente al tiempo. Media de cinco experimentos independientes por cuadruplicado.

Los resultados se obtuvieron en U.A.F. (unidades arbitrarias de fluorescencia), que fueron normalizadas respecto a la fluorescencia inducida por K^+ , tomando como referencia el punto de mayor fluorescencia de K^+ . Los porcentajes de bloqueo se encuentran representados en la *Figura 42*.



Comp.	% Bloqueo
16	55.1±3.4
43	55.4±1.8
45	49.9±3.7
46	76.6±1.6
Nifedipino	61.5±2.2

Figura 42. Porcentaje de bloqueo del incremento de calcio inducido por 70 mM de K^+ .

Como se puede observar, todos los compuestos a la concentración de 10 μ M bloquean la entrada de calcio. Mientras que los derivados **16**, **43** y **45** lo hacen de forma similar con respecto al nifedipino, el compuesto **46** presenta un bloqueo significativo, un 15 %

más que el control. Con estos datos podemos deducir que las *N*-acilaminofenotiazinas disminuyen la señal de calcio citosólica producida por el pulso despolarizante de potasio.

2.2.5. Medida de la capacidad neuroprotectora de los derivados en rodajas de hipocampo.

La isquemia supone un 80% de todos los accidentes cerebrovasculares, y generalmente es el resultado de una oclusión embólica o trombótica de una arteria cerebral importante (con mucha frecuencia es la arteria cerebral media o sus ramificaciones)¹⁸¹, que alcanza un bajo flujo sanguíneo que desestabiliza el funcionamiento normal del cerebro¹⁸².

Tras un daño isquémico en el cerebro, inicialmente ocurre una necrosis en el núcleo del infarto (ver *Figura 43*), mientras que la apoptosis ocurre varios días después en la región alrededor del núcleo, en la región llamada de penumbra¹⁸³. Las células necróticas inducen un daño secundario a las células vecinas, mientras que las células apoptóticas no lo hacen. En este sentido, un cambio en el modo de muerte celular de necrosis a apoptosis podría tener un papel autoprotector, para frenar una invasión de muerte celular en el cerebro.

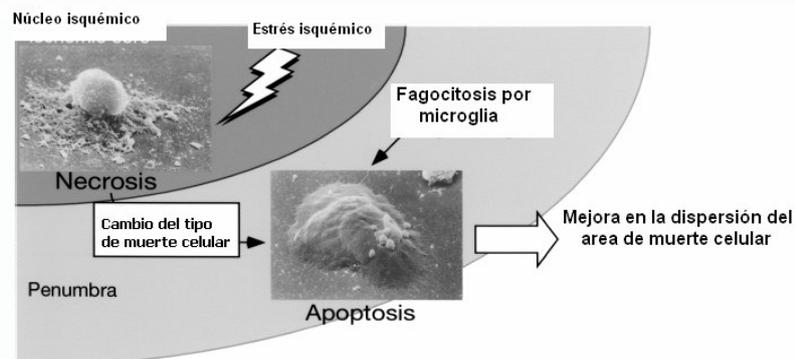


Figura 43 . Modelo de autoprotección mediante el cambio en el modo de muerte celular de neuronas en el cerebro isquémico.

¹⁸¹ Durukan, A.; Tatlisuma, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2007**, *87*, 179-97.

¹⁸² Schwartz-Bloom, R. D.; Sah, R. gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 353-71.

¹⁸³ Dirnagl, U., Iadecola, C.; Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **1999**, *22*, 391-7.

El cerebro es dependiente, casi exclusivamente, del flujo constante de glucosa y oxígeno para la producción de energía, puesto que no tiene suficientes reservas energéticas. La primera consecuencia de la reducción en el flujo sanguíneo es la interrupción en el suministro de oxígeno y glucosa, lo que induce la acumulación de lactato vía la glicólisis anaerobia. La acidosis puede fomentar la formación de ROS, interferir con la síntesis proteica y empeorar el daño isquémico¹⁸⁴. La depleción de energía lleva a un mal funcionamiento de las bombas iónicas Na⁺/K⁺-ATPasas, y Ca²⁺/H-ATPasas; el transportador Na⁺/Ca²⁺ funciona de manera inversa. Como resultado de todo ello, los niveles de potasio aumentan en el medio extracelular y los de sodio, calcio y cloruro aumentan en el medio intracelular. Esta alteración en la homeostasis de los iones ocasiona el subsiguiente edema citotóxico. Otra consecuencia del cambio incontrolado en las concentraciones de iones es la pérdida del potencial de membrana, y tanto las neuronas como la glía entran en la llamada despolarización anóxica¹⁸⁵.

Tras la despolarización anóxica, los aminoácidos excitadores, principalmente el glutamato, se liberan al medio extracelular desde las neuronas presinápticas, aún en las fases tempranas de la isquemia. Además, la activación de los receptores NMDA, AMPA y receptores metabotrópicos llevan a un aumento intracelular del calcio, aumentando conjuntamente el edema celular y los procesos desencadenados por la sobrecarga intracelular de calcio.

Existen evidencias tanto *in vitro* como *in vivo* de que un aumento intracelular del calcio es el mediador del daño neuronal inducido por la isquemia¹⁸⁶. La elevación del calcio intracelular desencadena una serie de eventos que incluyen la activación de enzimas como la fosfolipasa A2, proteasas y endonucleasas, la acumulación de eicosanoides (ácidos grasos insaturados), la generación de especies reactivas de oxígeno y la ruptura de la función mitocondrial.

¹⁸⁴ Mergenthaler, P.; Dirnagl, U.; Meisel, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab. Brain Dis.* **2004**, *19*, 151-67.

¹⁸⁵ Durukan, A.; Tatlisumak, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2007**, *87*, 179-97.

¹⁸⁶ Choi, D. W. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* **1995**, *18*, 58-60.

Quisimos pues estudiar el posible efecto neuroprotector de nuestros compuestos en un modelo más complejo que el celular y que reproduce las condiciones que se dan en la isquemia: las rodajas de hipocampo de rata sometidas a la privación de oxígeno y glucosa, donde se produce una muerte celular valorable midiendo la LDH liberada al medio. Estos experimentos se realizaron en rodajas de hipocampo con ratas Sprague-Dawley, siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental.

Las rodajas de hipocampo se sometieron a un periodo de estabilización de 1 hora, seguido de preincubación con el fármaco durante 30 minutos. A continuación, la privación de glucosa y oxígeno se indujo burbujeando nitrógeno y sustituyendo la glucosa por 2-desoxiglucosa. Posteriormente, se realizó el tratamiento de reoxigenación durante 2 horas (ver *Figura 44*). La viabilidad de las rodajas se evaluó midiendo la liberación de la enzima LDH en el líquido extracelular. Las rodajas control se mantuvieron con un flujo constante de CO₂ durante todo el experimento.

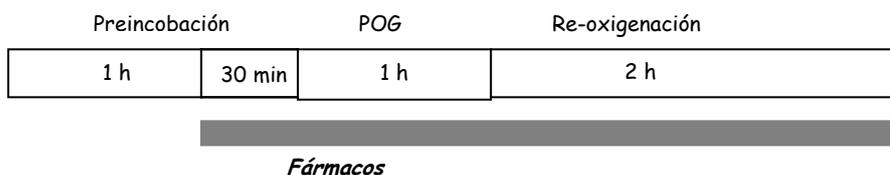


Figura 44. Protocolo experimental de la POG.

Se ha evaluado el posible efecto protector del compuesto **46** a las concentraciones de 3 y 10 μ M en el modelo de POG en rodajas de hipocampo, ya que era la *N*-acilaminofenotiazina que había mostrado mejores propiedades como bloqueante de canales de calcio. Este compuesto, a las concentraciones estudiadas, no mostró toxicidad *per se* en este modelo experimental (ver valores de preincubación: el primer punto antes de la POG, *Figura 45*).

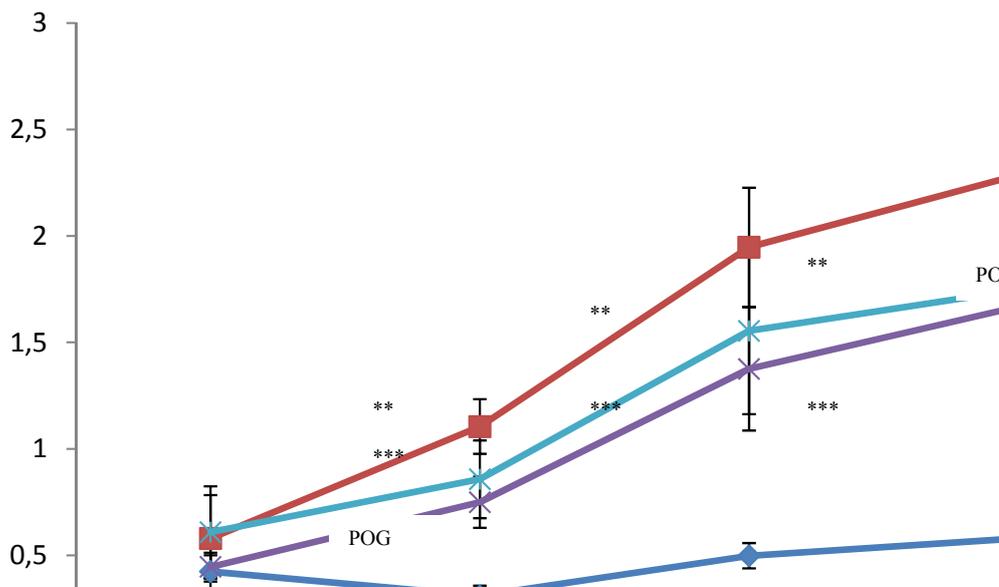


Figura 45. Efecto del derivado **46** en rodajas de hipocampo de rata sometidas a POG. Los valores representan el promedio \pm error estándar de la densidad óptica que corresponde a la lectura de la enzima LDH (lactato deshidrogenasa, indicativo de muerte neuronal). ($n=7$)
 $***P<0.001$ y $**P<0.01$ respecto a los respectivos grupos sometidos a POG.

El compuesto **46** produjo una protección del 34 % tras una hora de POG y de un 28 % en la hora siguiente de re-oxigenación (*Figura 46*). Por lo tanto, podemos decir que esta *N*-acilaminofenotiazina protege frente a un proceso de isquemia provocado en tejido de rata, posiblemente debido a su efecto como bloqueante de canales de calcio por lo que es un buen candidato para su estudio en enfermedades del SNC.

2.2.6. Capacidad de penetración en el sistema nervioso central.

Por último, se evaluó la capacidad de estos compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica, empleando el método *in vitro* detallado con anterioridad en esta memoria (ver apartado 1.2.7 del capítulo precedente) denominado PAMPA-BBB (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay – Blood-Brain Barrier*). Como se recordará, previamente el método se validó con productos comerciales de los que se conocía su grado de penetración en el SNC, evaluando a continuación los productos de interés (*Tabla 18*).

Tabla 18. Evaluación in vitro de la penetración en el SNC, empleando la metodología PAMPA-BBB

Comp.	P _e exp. (10 ⁻⁶ cm s ⁻¹)	Predicción ^b
7	18.3±0.6	SNC+
9	15.5±0.1	SNC+
12	9.1±0.3	SNC+
16	4.9±0.1	SNC+
17	7.8±0.2	SNC+
43	7.0±0.2	SNC+
44	13.8±0.3	SNC+
45	6.8±0.2	SNC+
46	14.6±0.3	SNC+
47	7.3±0.2	SNC+
48	16.4±0.4	SNC+
49	8.7±0.3	SNC+

^a Media de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

^b SNC+ indica que el producto sí penetra en el SNC y SNC- que no lo hace.

Como puede apreciarse en la *Tabla 18*, todas las fenotiazinas ensayadas serían capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar sus dianas terapéuticas situadas en el sistema nervioso central.

A modo de resumen, en este capítulo se ha desarrollado una familia de *N*-acilaminofenotiazinas con interesantes propiedades: inhibición selectiva de butirilcolinesterasa en los rangos micro- y submicromolar, neuroprotección frente a radicales libres exógenos y mitocondriales, capacidad de captación de radicales libres en neuroblastoma y modulación de canales de calcio. Además, presentan neuroprotección en un modelo de isquemia cerebral, no son tóxicos y serían capaces de penetrar en el SNC. Estas interesantes propiedades nos permiten proponer a esta familia de *N*-acilaminofenotiazinas recientemente patentadas¹⁸⁷, como prototipos útiles en el

¹⁸⁷ Conde, S.; Rodríguez-Franco, M. I.; González-Muñoz, G. C.; Arce, M. P.; Villarroya, M.; López, M. G.; García, A. G. Uso de hidrazidas de sistemas heterocíclicos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. ES Pat. P200801900 (25.06.2008).

desarrollo de nuevos fármacos útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de otras dolencias neurodegenerativas.

3. Optimización de una familia de dibenzotiadiazepinas.

Como se recordará, en el primer capítulo de esta memoria se encontraron interesantes propiedades neuroprotectoras en la dibenzotiadiazepina **6**. Por este motivo, nos propusimos el desarrollo y optimización de una familia basada en este sistema heterocíclico, prácticamente desconocido en Química Médica. De hecho, las escasas referencias bibliográficas encontradas tienen un carácter exclusivamente sintético y en ningún caso describen propiedades de interés terapéutico para este heterociclo^{142, 188}.

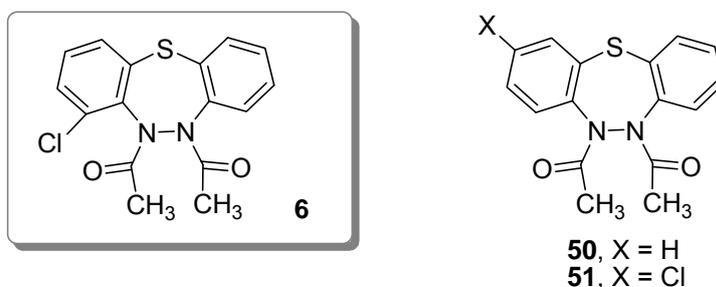


Figura 46. Dibenzotiadiazepinas elegidas de la quimioteca para ser evaluadas.

Como primera medida, se hizo una búsqueda en nuestra quimioteca, eligiéndose los compuestos **50** y **51**, que únicamente se diferencian de **6** en la sustitución de uno de los anillos aromáticos (*Figura 46*). Estos productos fueron purificados mediante cromatografía en columna empleando gel de sílice, obteniéndose sólidos de aspecto cristalino. Sus puntos de fusión y pureza por HPLC se encuentran recogidos en la *Tabla 19*.

¹⁸⁸ (a) Allinger, N. L.; Youngdale, G. A. Aromatic and Pseudoaromatic Non-benzenoid Systems. III. The Synthesis of Some Ten π -Electron Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 1020-1026. (b) Szmant, H. H.; Chow, Y. L. Derivatives of Dibenzo[b,f][1,4,5]thiadiazepine. V. Synthesis of Sulfides and Sulfoxides. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 2887-2889.

Tabla 19. Puntos de fusión y pureza de los productos.

Producto	Punto de fusión (°C)		HPLC ^a
	Exper.	Bibl.	Pureza (%)
50	187-189	(b)	95
51	195-197	150-151	100

^aColumna Delta Pack C₁₈; eluyente: CH₃CN : H₂O / CF₃CO₂H (0.05%).

^bProducto no descrito.

Además, nos planteamos la síntesis de nuevas dibenzotiadiazepinas. Una primera familia estaría formada por compuestos que, manteniendo los dos grupos acetilo en los átomos de nitrógeno como en el compuesto **6**, presentarían en el heterociclo diferentes sustituyentes de carácter activante o desactivante. También se planteó una segunda familia en la que se introdujeran diferentes cadenas laterales con fragmentos de piperidina, piperazina y pirrolidina, de manera análoga a las fenotiazinas obtenidas en el capítulo anterior (Figura 47).

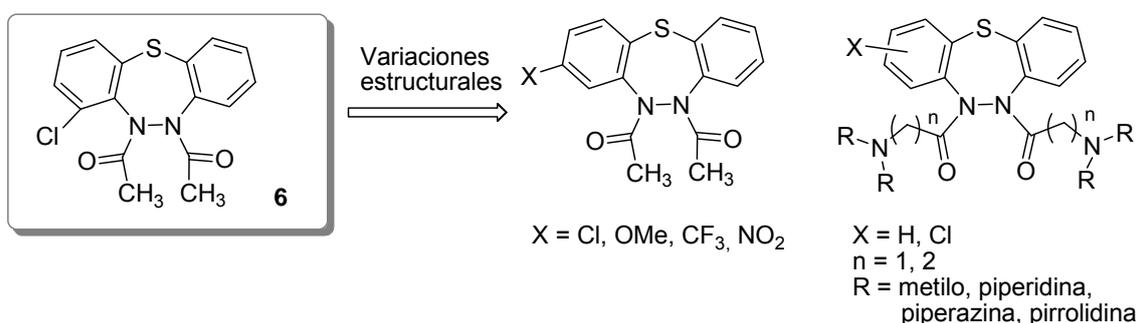
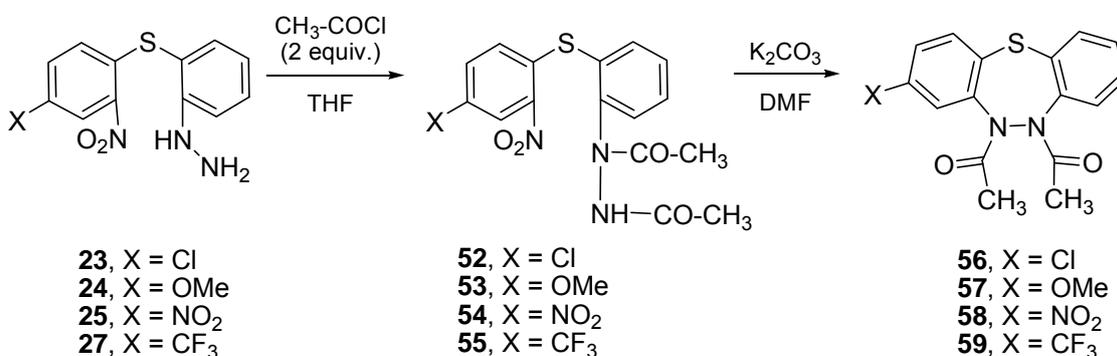


Figura 47. Variaciones propuestas sobre **6** para la obtención de nuevas dibenzotiadiazepinas.

3.1. Síntesis de nuevas dibenzotiadiazepinas.

La síntesis de las *N,N*-diacetil-5,6-dihidrodibenzo[*b,f*][1,4,5]tiadiazepinas se realizó siguiendo el método descrito por Corral y col¹⁴⁵. El tratamiento de las hidrazinas diferentemente sustituidas **23-27**, previamente empleadas en la síntesis de *N*-acilaminofenotiazinas (ver *Esquema 2* en el capítulo anterior), con dos equivalentes de cloruro de acetilo bajo atmósfera inerte condujo a las correspondientes hidrazidas **52-55**

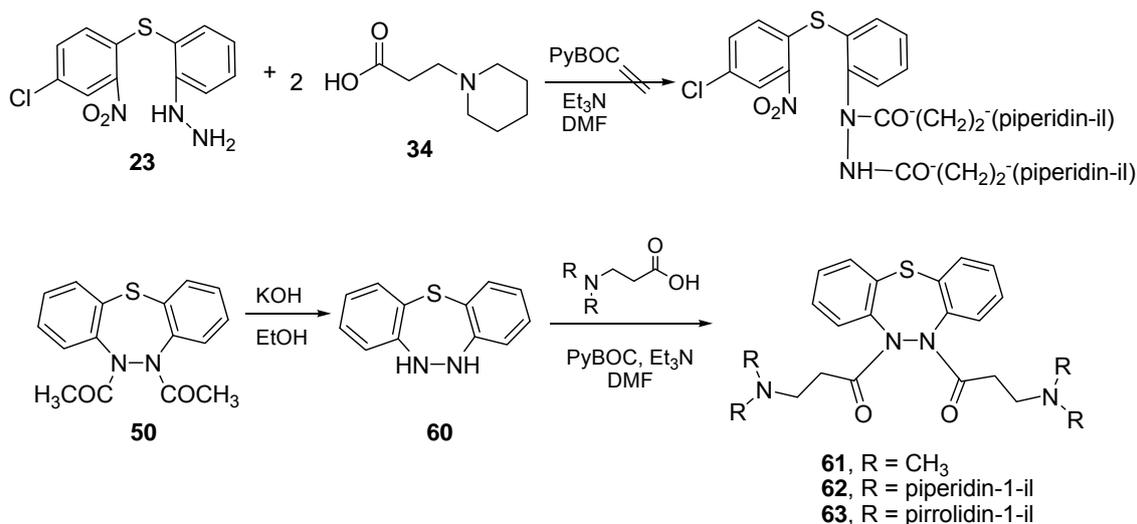
(Esquema 4). Posteriormente, estas hidrazidas fueron tratadas con carbonato potásico en dimetilformamida a reflujo, dando lugar a las *N,N'*-diacetildibenzotiadiazepinas deseadas **56-59** con rendimientos elevados.



Esquema 4. Síntesis de *N,N*-diacetil-5,6-dihidrodibenzo[*b,f*][1,4,5]tiadiazepinas.

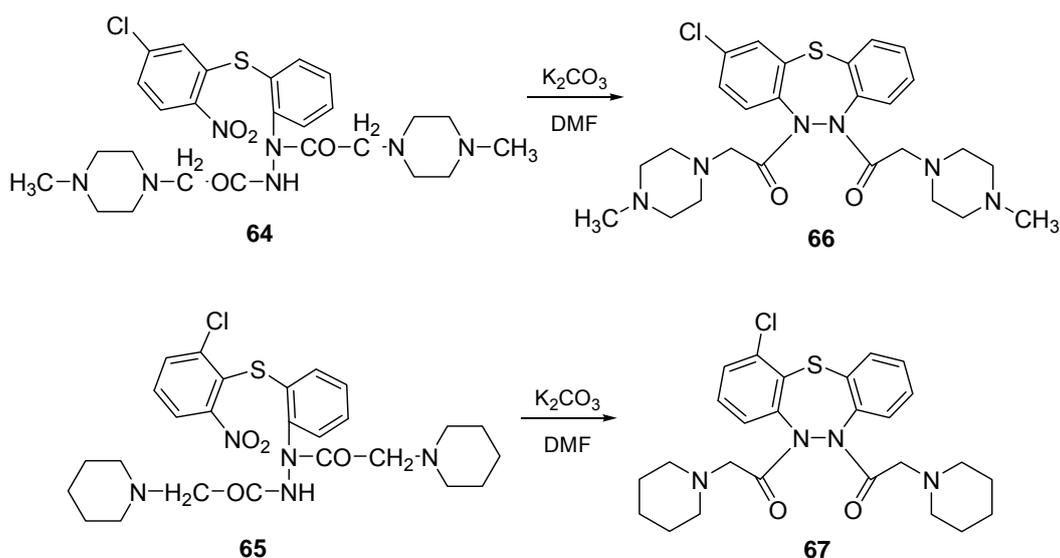
A continuación y siguiendo un esquema sintético similar, nos planteamos la síntesis de dibenzotiadiazepinas con diferentes cadenas laterales. Así, se hizo reaccionar la hidrazina intermedia **23** con dos equivalentes del ácido **34**, empleando PyBOP como agente acoplante y trietilamina como base (Esquema 5). Tras varios intentos en los que se aumentó la temperatura (hasta 150 °C), desafortunadamente no se consiguió obtener el intermedio necesario para la obtención de la dibenzotiadiazepina deseada. Así pues, se planeó una ruta alternativa consistente en la acilación del heterociclo sin sustituyentes en los nitrógenos, que a su vez podría ser obtenido a partir del derivado diacetilado **50**.

El compuesto **50** fue hidrolizado con hidróxido potásico en etanol, dando lugar a la 5,6-dihidrodibenzo[*b,f*][1,4,5]tiadiazepina (**60**) con un 90 % de rendimiento (Esquema 5). A continuación, este heterociclo fue tratado con dos equivalentes de diferentes ácidos en presencia de PyBOC y trietilamina a temperatura ambiente durante 24 horas, para dar lugar a las dibenzotiadiazepinas **61-63** con buenos rendimientos.



Esquema 5. Síntesis de dibenzotiadiazepinas con diferentes cadenas laterales a partir de **50**.

Por otra parte, en la quimioteca existían varios intermedios que permanecían como sólidos puros (**64-65**). Estos intermedios fueron tratados con carbonato potásico en dimetilformamida para dar las dibenzotiadiazepinas **66** y **67** (*Esquema 6*).



Esquema 6. Obtención de las dibenzotiadiazepinas **66** y **67** por ciclación de los intermedios **64** y **65**, obtenidos de nuestra quimioteca.

Todas las dibenzotiadiazepinas fueron obtenidas como sólidos, cuyo grado de pureza fue medido mediante HPLC. Sus estructuras fueron determinadas a partir de sus espectros de RMN de protón y de carbono, así como a partir de sus espectros de masas. En la *Tabla 20* se encuentran recogidas algunas de las características físico-químicas: punto de fusión y porcentaje de pureza por HPLC, fórmula molecular y señales características en espectrometría de masas.

Tabla 20. Puntos de fusión, pureza y EM de las nuevas dibenzotiadiazepinas **56-59**, **61-63**, **66** y **67**.

Comp.	pf (° C)	Pureza (%) ^a	Fórmula	EM (MH ⁺)
56	119-121	100	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂ S	333
57	99-101	97	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	329
58	111-113	95	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	344
59	125-127	99	C ₁₇ H ₁₃ F ₃ N ₂ O ₂ S	367
61	138-140	95	C ₂₂ H ₂₈ N ₄ O ₂ S	365
62	151-153	100	C ₂₈ H ₃₆ N ₄ O ₂ S	493
63	147-149	100	C ₂₆ H ₃₂ N ₄ O ₂ S	413
66	174-176	100	C ₂₆ H ₃₁ ClN ₄ O ₂ S	499
67	181-183	100	C ₂₆ H ₃₃ ClN ₆ O ₂ S	429

^a Por HPLC; columna Delta Pack C₁₈; eluyente: CH₃CN : H₂O / CF₃CO₂H (0.05 %).

3.2. Evaluación biológica.

Siguiendo el protocolo establecido en los capítulos precedentes, todas las dibenzotiadiazepinas de este capítulo fueron evaluadas como inhibidores de colinesterasas y como neuroprotectores en una línea celular de neuroblastoma humano.

3.2.1. Inhibición de acetil y butirilcolinesterasa (AChEI, BuChEI).

Siguiendo el método de Ellman¹⁵¹, se obtuvieron las concentraciones inhibitorias 50 que se encuentran recogidas en la *Tabla 21*.

Tabla 21. Inhibición de AChE bovina y BuChE equina.

Comp.	AChE, CI ₅₀ (μM)	BuChE, CI ₅₀ (μM)
50	>100	>100
51	>100	>100
56	>100	>100
57	>100	>100
58	>100	>100
59	>100	>100
60	>100	3
61	>100	0.7
62	>100	>100
63	>100	>100
66	>100	>100
67	>100	0.9

Media de tres experimentos independientes.

Como era de esperar, la mayoría de los productos no inhiben ninguna de las dos enzimas, como ocurría con el compuesto **6** y únicamente tres de ellos presentan inhibición selectiva de BuChE en el rango micromolar (**60**, **61** y **67**). En el caso de la dibenzotiadiazepina **60** (*N,N'*-no sustituida) este hecho podría deberse a que, debido a su reducido tamaño es capaz de entrar en la garganta catalítica de la enzima. Por el contrario, parece más probable que las dibenzotiadiazepinas **61** y **67** interaccionen con la enzima a través de las cadenas laterales de dimetilamina y de metilpiperazina, respectivamente.

3.2.2. Ensayos de neuroprotección en cultivos celulares.

A continuación, las dibenzotiadiazepinas fueron evaluadas en neuroblastoma humano, determinándose su toxicidad y su efecto citoprotector frente al estrés oxidativo mitocondrial, empleando como tóxico la combinación de rotenona (30 μ M) y oligomicina A (10 μ M). Todos los compuestos fueron evaluados a 0.3, 1 y 3 μ M empleando pre- y coincubación. En el primer protocolo de preincubación las células fueron tratadas con el producto a evaluar 24 horas antes de ser sometidas al tóxico, mientras que en las condiciones de co-incubación el tóxico y la muestra fueron añadidos de forma simultánea (Figura 48).

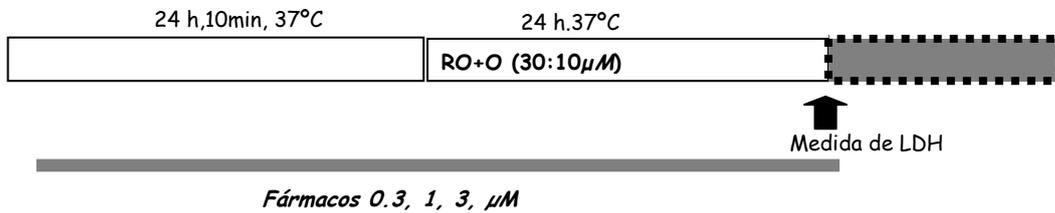
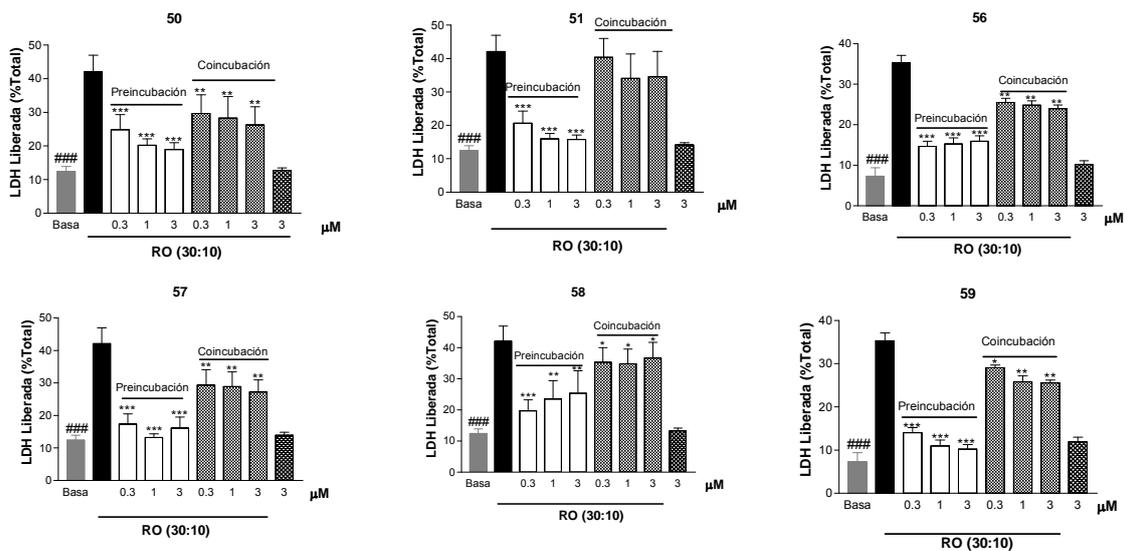


Figura 48. Esquema del protocolo empleado para evaluar el posible efecto citoprotector de las dibenzotiadiazepinas y trolox frente a la lesión inducida por rotenona y oligomicina A.

Como puede apreciarse en la Figura 49, todos los compuestos presentan una interesante neuroprotección frente a rotenona y oligomicina A, encontrándose mejores resultados en las condiciones de preincubación.



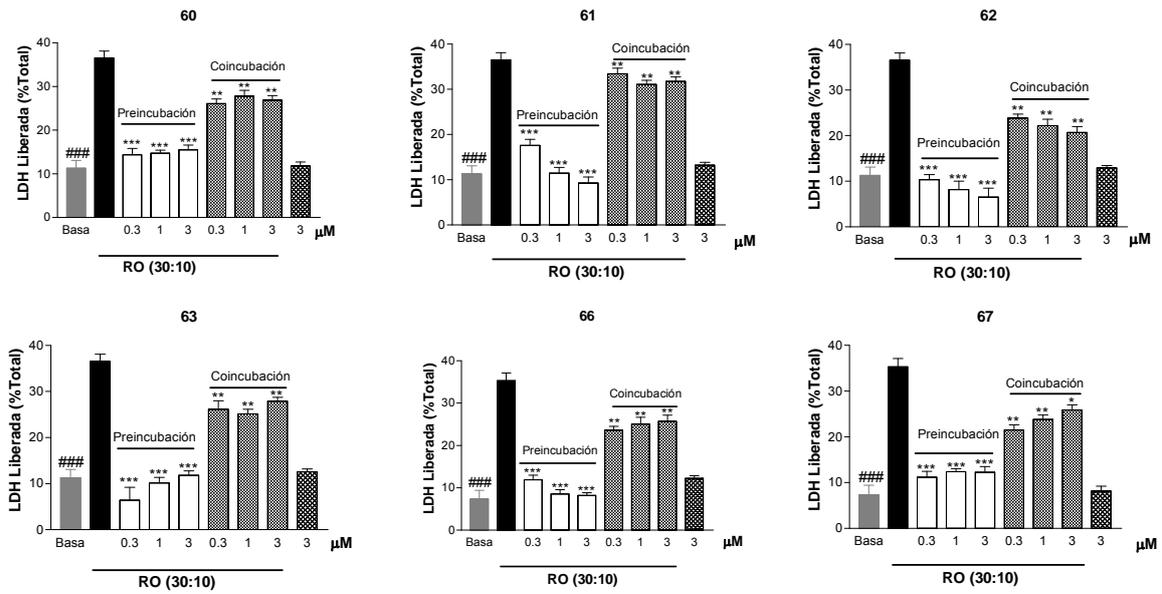


Figura 49. Porcentaje de LDH liberada respecto de la total (muerte celular) empleando la mezcla de rotenona (30 μM) y oligomicina A (10 μM) como tóxico. Media de 4 experimentos independientes (cada uno de ellos por triplicado) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, #### $p < 0.001$ respecto al tóxico.

En ningún caso se observó citotoxicidad, puesto que las dibenzotiadiazepinas a la máxima concentración ensayada (3 μM) no aumentaron significativamente la proporción de muerte basal (comparar la barra de la derecha con la % LDH basal).

En la *Tabla 22* se han recogido los porcentajes de neuroprotección, que en condiciones de pre-incubación arrojan valores comprendidos entre el 80 y el 90 % para la mayoría de los compuestos ensayados, y que rozan el 100 % para los derivados **57** y **66** (a 1 y 3 μM , respectivamente). Por otra parte, en el caso de las dibenzotiadiazepinas **50**, **51**, **59**, **61**, **62** y **66** se observa una interesante relación directa dosis-respuesta.

Tabla 22. Porcentaje de neuroprotección frente a la mezcla de rotenona (30 μ M) y oligomicina A (10 μ M) de las dibenzotiadiazepinas a tres concentraciones, en condiciones de pre- y coincubación.

Comp.	Preincubación			Coincubación		
	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M
50	64.8***	76.6***	81.5***	49.0**	59.2**	63.2**
51	79.8***	88.9***	91.1***	9.3	38.3	38.3
56	75.1***	71.4***	68.8***	34.9**	35.6**	40.8**
57	89.7***	97.0***	95.7***	49.9**	50.1**	53.8**
58	83.8***	75.8**	72.7**	26.2*	27.8*	21.9*
59	76.4***	91.1***	92.2***	20.7*	35.0**	35.8**
60	90.3***	90.2***	84.4***	40.5**	31.4**	38.8**
61	75.9***	92.1***	96.1***	8.1**	20.4**	15.9**
62	84.6***	90.4***	96.4***	53.0**	55.4**	63.0**
63	99.3***	94.6***	92.4***	40.7**	45.9**	32.7**
66	86.0***	96.4***	97.5***	43.3**	38.2**	35.6**
67	90.5***	83.9***	83.4***	50.6**	42.6**	35.7*
Trolox	—	—	56.1***	—	—	55.7***

Media de 4 experimentos independientes (por triplicado). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

El hecho de que la neuroprotección observada en condiciones de co-incubación sea claramente superada cuando se emplean condiciones de pre-incubación parece indicar que el modo de acción de estas dibenzotiadiazepinas está relacionado, no sólo con su capacidad para capturar radicales libres, sino también con rutas de señalización importantes para la supervivencia celular.

A la vista de los resultados anteriores, se eligieron las dibenzotiadiazepinas **50**, **57**, **62** y **66** para ampliar sus estudios farmacológicos, tratando de cubrir las modificaciones estructurales más significativas de la serie, ya sea en la sustitución del heterociclo como en la variación de las cadenas laterales (*Figura 50*).

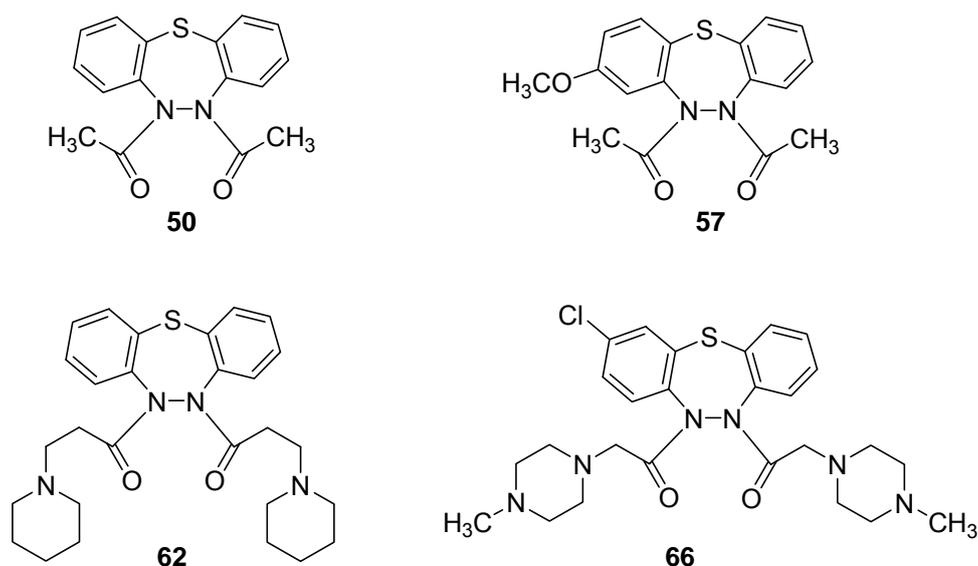


Figura 50. Estructuras de los productos elegidos para estudios adicionales.

3.2.3. Medida de la capacidad antioxidante de los compuestos: Captación de peróxido de hidrógeno.

Con el fin de determinar si los compuestos presentaban capacidad antioxidante, las dibenzotiadiazepinas elegidas fueron evaluadas como captadoras de radicales libres mitocondriales en células de neuroblastoma, empleando la sonda DCFH-DA (diacetato de 2,7-diclorofluoresceína) y siguiendo el protocolo del apartado 1.2.3 del capítulo anterior (ver *Figura 51*). La disminución de fluorescencia en presencia de los compuestos, añadidos a la vez que el tóxico (mezcla de rotenona y oligomicina A), indicaría un efecto secuestrador de radicales libres. Como en el capítulo anterior, también se utilizó el citómetro de flujo.

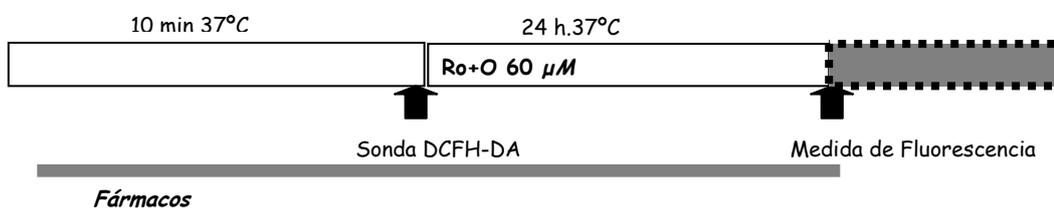


Figura 51. Esquema del protocolo empleado para evaluar el posible efecto citoprotector de los compuestos sintetizados y trolox frente a la lesión inducida por H₂O₂.

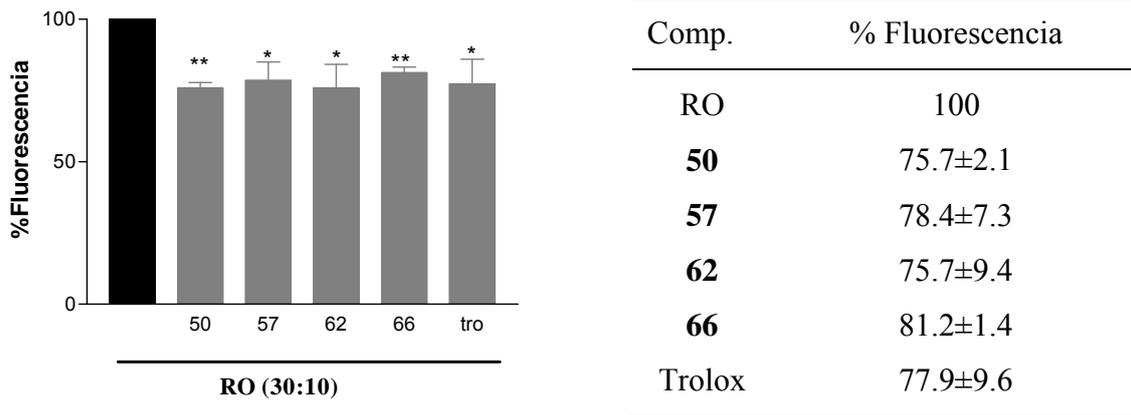


Figura 52. Capacidad antioxidante de los compuestos a las concentraciones de mayor neuroprotección de los mismos frente a la mezcla de rotenona (30 μ M) y oligomicina A (10 μ M). Media de 4 experimentos independientes por cuadruplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Los cuatro compuestos ensayados presentan una disminución significativa de la fluorescencia, semejante a la del trolox, lo que indicaría que estas dibenzotiadiazepinas actúan, al menos en parte, como captadores de radicales libres mitocondriales.

3.2.4. Medida de la concentración de calcio citosólico.

Todos los compuestos fueron evaluados a 10 μ M, siguiendo el mismo protocolo que en el punto 2.2.4 del capítulo anterior y la variación de la fluorescencia en función del tiempo está representada en la *Figura 53*.

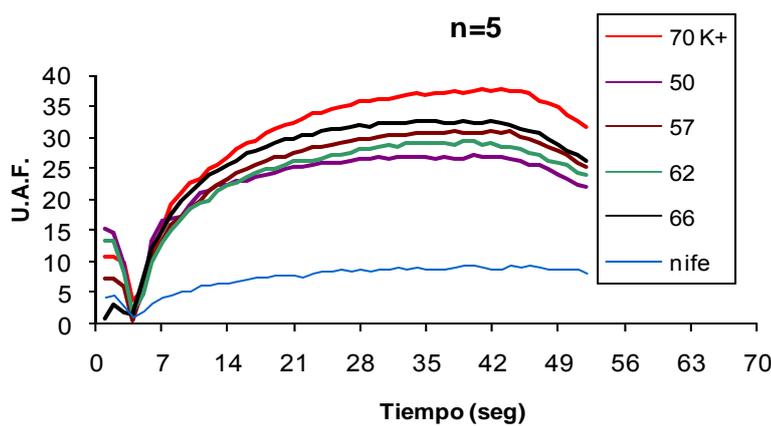
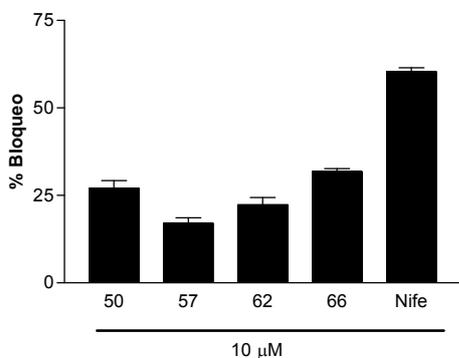


Figura 53. Porcentaje de fluorescencia (incremento de calcio) frente al tiempo. Media de cinco experimentos independientes por cuadruplicado.

Los resultados se obtienen en U.A.F. (unidades arbitrarias de fluorescencia), que son normalizadas para dar los porcentajes de bloqueo, que se encuentran en la tabla que acompaña a la *Figura 54*.



Comp.	% Bloqueo
50	27.0±3.2
57	17.1±2.2
62	22.3±3.0
66	31.8±2.0
Nifedipino	60.3±1.6

Figura 54. Porcentaje de bloqueo del incremento de calcio inducido por 70 mM de K^+ .

Los cuatro compuestos disminuyen significativamente la señal de calcio citosólica producida por el pulso despolarizante de potasio, con porcentajes de bloqueo que oscilan entre el 18 y el 31 %. El nifedipino, empleado como control positivo, presenta un bloqueo del 61 %. Por lo tanto, podemos concluir que estas dibenzotiazepinas disminuyen la señal de calcio citosólica y que esta disminución posiblemente hace que la concentración de calcio del citosol sea la adecuada para estimular otros mecanismos de protección.

3.2.5. Capacidad de penetración en el sistema nervioso central.

Por último, se evaluó la capacidad de las dibenzotiadiazepinas para atravesar la barrera hematoencefálica, siguiendo el mismo procedimiento de capítulos anteriores (*Tabla 23*).

Tabla 23. Evaluación *in vitro* de la penetración en el SNC, empleando la metodología PAMPA-BBB.

Comp.	P_e exp. (10^{-6} cm s ⁻¹)	Predicción ^b
50	10.1±0.1	SNC+
51	12.3±0.5	SNC+
56	10.0±0.3	SNC+
57	12.6±0.3	SNC+
58	1.9±0.1	SNC+/-
59	1.0±0.1	SNC+/-
61	14.2±0.1	SNC+
62	5.3±0.2	SNC+
63	1.7±0.1	SNC+/-
66	5.9±0.2	SNC+
67	7.3±0.2	SNC+

^a Media de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

^b SNC+ indica que el producto sí penetra en el SNC y SNC- que no lo hace

Con la excepción de **58**, **59** y **63** que tendrían dificultades para entrar en cerebro, el resto de las dibenzotiadiazepinas atravesarían la barrera hematoencefálica y serían capaces de alcanzar sus dianas terapéuticas situadas en el sistema nervioso central.

Como resumen, en este capítulo se ha desarrollado una nueva familia de dibenzotiadiazepinas caracterizadas por un elevado poder neuroprotector frente a radicales libres mitocondriales, que roza el 100% en condiciones de pre-incubación. Su mecanismo de acción incluye su capacidad directa para neutralizar radicales libres y el bloqueo de la concentración de calcio citosólico, lo que a su vez promueve otros mecanismos de supervivencia celular. Además, no son tóxicos y podrían penetrar en el SNC, condiciones imprescindibles para que estas moléculas puedan ser desarrolladas posteriormente como fármacos. Estas interesantes propiedades nos han permitido

presentar una patente sobre estas 5,6-dihidro-1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepinas¹⁸⁹, ya que son prototipos útiles para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

¹⁸⁹ Conde, S.; Rodríguez-Franco, M. I.; González-Muñoz, G. C.; Villarroya, M.; López, M. G.; García, A. G. Derivados de 1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepinas 5,6-dihidro y su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. ES Pat 200803413 (01.12.2008).

VI. RESUMEN Y *CONCLUSIONES*

IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

En esta Tesis Doctoral se han identificado y desarrollado dos familias derivadas de *N*-acilaminofenotiazinas y de 5,6-dihidro-1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepinas, con interesantes propiedades para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Las *N*-acilaminofenotiazinas poseen inhibición selectiva de butirilcolinesterasa, neuroprotección frente a radicales libres exógenos y mitocondriales, capacidad de captación de radicales libres en neuroblastoma y modulación de canales de calcio. Además, presentan neuroprotección en un modelo de isquemia cerebral, no son tóxicos y serían capaces de penetrar en el SNC.

Las 5,6-dihidro-1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepinas exhiben un elevado poder neuroprotector frente a radicales libres mitocondriales, que roza el 100% en condiciones de pre-incubación. Son capaces de neutralizar radicales libres y de modular la concentración de calcio citosólico. Además, no son tóxicos y podrían penetrar en el SNC, condiciones imprescindibles para que estas moléculas puedan ser desarrolladas posteriormente como fármacos.

A continuación, se resumen los hallazgos más importantes de este trabajo.

1. Búsqueda de cabezas de serie en la familia de las fenotiazinas y de las dibenzotiadiazepinas.

Se seleccionaron seis compuestos de una quimioteca propia del grupo de investigación del Instituto de Química Médica (IQM) para ser evaluados en un programa de cribado farmacológico en colaboración con el Instituto Teófilo Hernando (ITH), encontrando lo siguiente:

- Los compuestos 10-[2'-*N*-(4-metilpiperazin-1-il)aminoetil]fenotiazina (**1**), 3-cloro-10-[(3'-dimetilaminopropionil)amino]fenotiazina (**2**), 3-cloro-10-[(4-metilpiperazin-1-il)acetilamino]fenotiazina (**3**) y 1,4,5-(5,6-diacetil-5,6-

dihidrodibenzo[*b,f*]tiadiazepina (**6**) mostraron neuroprotección frente a los radicales libres generados por agua oxigenada.

- Asimismo, los compuestos **1**, **2** y **6** mostraron protección frente a rotenona en combinación con oligomicina A, destacando **2** y **6** que son capaces de proteger al 50 % del cultivo celular a la concentración de 30 y de 3 μ M respectivamente.
- Todos los compuestos, ensayados a las concentraciones más neuroprotectoras, indujeron una elevación moderada de la $[Ca^{2+}]_c$, elevación que para **1** y **6** revirtió en presencia de nimodipino, bloqueante específico de canales de Ca^{2+} del subtipo L.
- Igualmente la neuroprotección inducida por **1** y **6** revirtió en presencia de nimodipino, lo que corrobora el papel del Ca^{2+} en la inducción de dicha neuroprotección.
- Como resultado de los ensayos anteriores, se puede concluir que el mecanismo neuroprotector de la *N*-acilaminofenotiazina **1** parece estar mediado por su interacción con canales de calcio, mientras que su análogo **2** actúa principalmente a través del secuestro de radicales libres. La dibenzotiadiazepina **6** presentaría un mecanismo neuroprotector mixto: secuestro de radicales libres e interacción con canales de calcio.
- Los compuestos **1**, **2** y **6** serían capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, según el método *in vitro* PAMPA.

A partir de este estudio inicial, se eligieron las *N*-acilaminofenotiazinas **1** y **2** y la dibenzotiadiazepina **6** como buenos cabeza de serie, sobre los que desarrollar dos nuevas familias con propiedades neuroprotectoras.

2. Optimización de la serie de *N*-acilaminofenotiazinas.

- Se han obtenido nuevas *N*-acilaminofenotiazinas que, junto con otras existentes en nuestra quimioteca, han sido evaluadas biológicamente. La mayoría de las 18 *N*-acilaminofenotiazinas evaluadas son inhibidores selectivos de butirilcolinesterasa con CI_{50} comprendidas entre el rango micro y el submicromolar. Ninguna inhibe la acetilcolinesterasa.

- Catorce fenotiazinas no son tóxicas en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y a la máxima concentración ensayada y únicamente cuatro de ellas sí presentan cierta toxicidad.
- Todos los compuestos protegen frente a los radicales exógenos generados por agua oxigenada, destacando 3-cloro-10-(pirrolidin-1-il)acetilaminofenotiazina (**16**), 10-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilamino]fenotiazina (**43**), 2-metoxi-10-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilamino]fenotiazina (**45**) y 2-nitro-10-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilamino]fenotiazina (**46**), que presentan una interesante actividad en torno a un 50 % de protección en todas o en algunas de las concentraciones ensayadas.
- La neuroprotección demostrada por los cuatro compuestos anteriores frente a la mezcla de rotenona y oligomicina A en condiciones de pre- y de co-incubación, sugiere que el mecanismo de **16** y **46** está relacionado con la biosíntesis de moléculas importantes para la supervivencia celular, mientras que en el caso de **43** y **45** también interviene la captación de radicales libres.
- Las *N*-acilaminofenotiazinas **16**, **43**, **45** y **46** disminuyen la señal de calcio citosólica producida por el pulso despolarizante de potasio, lo que indicaría que su mecanismo neuroprotector está relacionado con la modulación de los canales de calcio.
- En un modelo de isquemia cerebral la fenotiazina **46** produjo una protección del 34 % tras una hora de privación de glucosa y oxígeno y del 28 % en la hora siguiente de reoxigenación.
- Todos los compuestos atraviesan la barrera hematoencefálica, según el método *in vitro* PAMPA.

3. Optimización de una familia de dibenzotiadiazepinas

- Se han sintetizado nuevas 5,6-dihidro-1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepinas, que junto con otras existentes en nuestra quimioteca, formaron un conjunto de 12 estructuras que fueron sometidas a los ensayos farmacológicos habituales. Únicamente tres de ellas presentan inhibición selectiva de butirilcolinesterasa, en los rangos micro- y submicromolar.

- En ningún caso se observó citotoxicidad en neuroblastoma humano SH-SY5Y a la máxima concentración empleada en los ensayos de neuroprotección.
- En condiciones de pre-incubación, las dibenzotiadiazepinas presentan protección frente a radicales libres mitocondriales, con valores comprendidos entre el 80 y el 90 % para la mayoría de los compuestos ensayados, y que rozan el 100% para 1,4,5-(3-metoxi-5,6-diacetil-5,6-dihydrodibenzo[*b,f*])tiadiazepina (**57**) y 1,4,5-[2-cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[(4-metilpiperazin-il)acetil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina (**66**).
- Cuando los ensayos anteriores se realizaron en condiciones de co-incubación, la neuroprotección descendió de forma significativa, lo que parece indicar que el mecanismo neuroprotector de estos compuestos está relacionado con rutas de señalización importantes para la supervivencia celular.
- Empleando células de neuroblastoma humano y una selección representativa de esta serie: 1,4,5-(5,6-diacetil-5,6-dihydrodibenzo[*b,f*])tiadiazepina (**50**), **57**, 1,4,5-[5,6-dihidro-5,6-bis[2'-(piperidin-1-il)propionil]]dibenzo[*b,f*]tiadiazepina (**62**) y **66**, se pudo comprobar que las dibenzotiadiazepinas también actúan como captadores de radicales libres mitocondriales.
- Los cuatro compuestos anteriores disminuyen la señal de calcio citosólica producida por el pulso despolarizante de potasio. Por lo tanto, también actúan como moduladores de la concentración de calcio, lo que a su vez promueve otros mecanismos de supervivencia celular.
- Por lo tanto, las dibenzotiadiazepinas presentan un doble mecanismo neuroprotector: captación de radicales libres y modulación de la concentración de calcio citosólico.
- Prácticamente todas las dibenzotiadiazepinas serían capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a sus dianas terapéuticas situadas en el sistema nervioso central.

Como conclusión general de esta Tesis Doctoral, podemos decir que hemos identificado y patentado dos nuevas familias derivadas de *N*-acilaminofenotiazina y de 5,6-dihidro-1,4,5-dibenzo[*b,f*]tiadiazepina, cuyas interesantes propiedades neuroprotectoras las convierten en buenos prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades neurodegenerativas.

V. PARTE EXPERIMENTAL

V. PARTE EXPERIMENTAL.

1. Materiales y métodos.

Los disolventes anhidros se prepararon mediante las técnicas habituales de secado, destilándolos bajo atmósfera de nitrógeno. El THF se secó sobre sodio empleando benzofenona como indicador. Los reactivos comerciales fueron adquiridos a las casas Aldrich, Fluka, Acros, Bachem y BACR, incluida la DMF anhidra.

Las separaciones cromatográficas se realizaron empleando columnas de cromatografía a presión sobre gel de sílice (Kieselgel 60 Merck de 230-400). El eluyente se especifica en cada caso y las proporciones de mezcla van siempre indicadas en volumen. Los compuestos se detectaron mediante UV (254 nm). Las cromatografías en capa fina se realizaron en cromatofolios de aluminio de gel de sílice tipo 60 F-254 Merck, de 0.2 mm de espesor. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Reichert-Jung ThermoVar y no están corregidos. Los análisis elementales de los compuestos están en el rango de ± 0.4 respecto de los valores teóricos calculados para las fórmulas moleculares y se han realizado en el Departamento de Análisis y Técnicas Instrumentales del Centro Nacional de Química Orgánica “Lora Tamayo”, con un analizador Heraeus CHN-O-rapid.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se obtuvieron en espectrómetros Varian Unity-500, Varian Unity Inova-400, Varian XL-300, Bruker-300 y Varian-200. Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento en hercios (Hz). Los parámetros espectroscópicos empleados habitualmente en los espectros de ^1H -RMN fueron: anchura espectral 10 ppm, anchura de pulso 9 ms (57°) y en los espectros de ^{13}C -RMN: anchura espectral 16 KHz, tiempo de adquisición 0,99 s y anchura de pulso 9 ms (57°). Para los experimentos bidimensionales de correlación heteronuclear protón-carbono, HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) y HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), se emplearon las condiciones estándar, mediante detección inversa. Las multiplicidades se

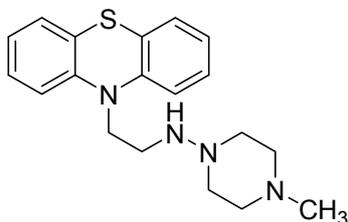
indican como s (singlete), d (doblete), t (triplete), c (cuartete) y m (multiplete). Los espectros de masas (EM) se obtuvieron mediante ionización por electronebulización (*electrospray* ionization, ESI) en modo positivo en un espectrómetro Hewlett-Packard MSD 1100.

La pureza de los productos se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando distintos equipos: Waters 6000 y Alliance Waters 2690. En el primer caso, el equipo Waters 6000 estaba equipado con un detector de UV (214-272 nm) y se empleó una columna Delta Pack Symmetry C₁₈, 5 μm, 300 Å (3,9 nm x 150 mm). Los compuestos se eluyeron con un flujo de 1.0 mL/min, empleando mezclas de CH₃CN (eluyente A) y H₂O con 0.05% de ácido trifluoroacético (eluyente B).

El segundo equipo de HPLC era un Alliance Waters 2690 con un detector de UV Photodiodo Array modelo Waters 2996 acoplado a un detector de masas modelo MicromassZQ de Waters, utilizando una columna XBridge™ C₁₈, 3.5 μm, 200 Å (2.1 nm x 100 mm) y empleando en todos los casos el gradiente 5/95 (CH₃CN: H₂O)/CF₃CO₂H (0.05%) hasta 100 % de CH₃CN empleando un tiempo de gradiente de 10 minutos con un flujo de 0.25 mL/min.

2. Búsqueda de cabezas de serie en la familia de las fenotiazinas y de las dibenzotiadiazepinas.

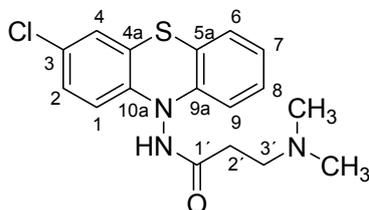
10-[2'-N-(4-Metilpiperazin-1-il)aminoetil]fenotiazina (1).



El compuesto se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 : CH_3OH (15 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.3$ se aisló **1** como un sólido amarillo, p. f: 207-209 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ

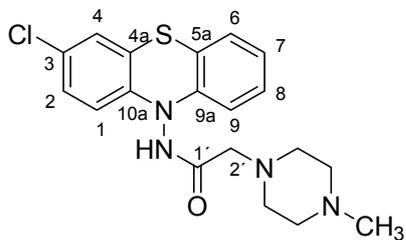
(ppm): 6.9-7.3 (m, 8H, aromáticos), 4.02 (t a, 2H, CH_2), 3.15 (t a, 2H, CH_2), 2.4-2.9 (m, 8H, 4 CH_2), 2.5 (m, 1H, NH), 2,3 (s, 3H, CH_3). HPLC: Pureza 99.7%. Método A: 50/50. EM: $m/z = 341$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Análisis elemental: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{S}$, Teórico: C %: 67.02, H %: 7.10, N %: 16.45, S %: 9.42. Hallado: C %: 67.22, H %: 7.36, N %: 16.65, S %: 9.62.

3-Cloro-10-[(3'-dimetilaminopropionil)amino]fenotiazina (2).



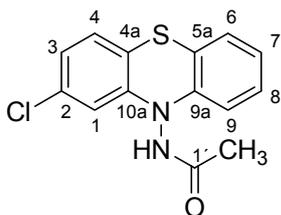
El compuesto se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 : CH_3OH (20 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.2$ se aisló **2** como un sólido

blanco, p.f: 179-181 °C. ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10.85 (s, 1H, NH), 7.07 (td, 1H, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H_8), 7.03 (dd, 1H, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H_6), 7.00 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H_2), 6.98 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H_4), 6.91 (td, 1H, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H_7), 6.72 (dd, 1H, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H_9), 6.63 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H_1), 2.89 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 2.71 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 2.43 (s, 6H, 2 CH_3). ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 171.4 (CONH), 142.9 (C_{9a}), 142.0 (C_{10a}), 128.5 (C_3), 127.8 (C_8), 127.2 (C_4 , C_6), 126.5 (C_2), 123.9 (C_7), 121.9 (C_{4a}), 119.2 (C_{5a}), 114.0 (C_1), 113.2 (C_9), 54.8 ($\text{C}_{3'}$), 44.7 (2C, CH_3), 32.2 ($\text{C}_{2'}$). HPLC: Pureza 94,5%. Método A: 50/50. EM: $m/z = 348$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 350 $[\text{M}+2\text{H}]^+$, 717 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$. Análisis elemental: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OS}$, Teórico: C %: 58.70, H %: 5.22, N %: 12.08, S %: 9.22. Hallado: C %: 58.62, H %: 4.97, N %: 12.35, S %: 9.51.

3-Cloro-10-[(4-metilpiperazin-1-il)acetilamino]fenotiazina (3).

El compuesto se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 : CH_3OH (9 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.4$ se aisló **3** como un sólido blanco, p.f: 176-178 °C. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3),

δ (ppm): 10.80 (s, 1H, NH), 7.05 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H_8), 7.03 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H_6), 7.00 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H_2), 6.97 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H_4), 6.90 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H_7), 6.66 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H_9), 6.57 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_1), 3.32 (s, 2H, $\text{H}_{2'}$), 2.55 – 2.73 (m, 8H, 4 CH_2), 2.31 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169.0 (CONH), 142.5 (C_{9a}), 141.6 (C_{10a}), 128.6 (C_3), 127.5 (C_4), 127.1 (C_8), 126.9 (C_6), 126.5 (C_2), 123.9 (C_7), 122.3 (C_{4a}), 119.6 (C_{5a}), 113.7 (C_1), 112.9 (C_9), 60.9 ($\text{C}_{2'}$), 54.7 (2C, 2 CH_2), 54.5 (2C, 2 CH_2), 45.6 (CH_3). HPLC: Pureza 98.2%. Método A: 50/50. EM: $m/z = 389$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 391 [$\text{M}+2\text{H}$] $^+$, 799 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$. Análisis elemental: $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{OS}$, Teórico: C %: 58.68, H %: 5.44, N %: 14.41, S %: 8.24. Hallado: C %: 59.03, H %: 5.64, N %: 14.27, S %: 8.38.

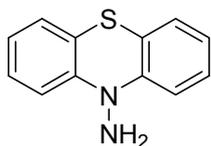
2-Cloro-10-acetilaminofenotiazina (4).

El compuesto se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de hexano : AcOEt (3 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.3$ se aisló **4** como un sólido blanco, p.f: 213-215°C. $^1\text{H-RMN}$

(DMSO-d_6), δ (ppm): 10.49 (s, 1H, NH), 7.12 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H_8), 7.09 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_4), 7.08 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H_6), 6.97 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H_3), 6.93 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H_7), 6.82 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H_9), 6.79 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H_1), 2.13 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d_6), δ (ppm): 168.4 (CONH), 144.3 (C_{10a}), 142.1 (C_{9a}), 132.2 (C_2), 127.8 (C_8 , C_4), 126.6 (C_6), 123.8 (C_7), 122.9 (C_3), 117.7 (C_{5a}), 117.2 (C_{4a}), 113.7 (C_9), 113.1 (C_1), 20.6 (CH_3). HPLC: Pureza (99%). Método A: 50/50. EM: $m/z = 313$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 603 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

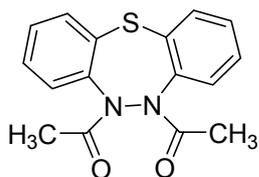
Análisis elemental: $C_{14}H_{11}ClN_2OS$, Teórico: C %: 57.83, H %: 3.81, N %: 9.63, S %: 11.03. Hallado: C %: 58.13, H %: 3.97, N %: 9.85, S %: 11.36.

10-Aminofenotiazina (5).



El compuesto se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de hexano : AcOEt (8 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.3$ se aisló **5** como un sólido blanco, p.f: 123-125 °C. 1H -RMN ($CDCl_3$), δ (ppm): 6.7-7.3 (m, 8H, aromáticos), 3.8 (s, 2H, NH_2). HPLC: Pureza (100%). Método A: 50/50. EM: $m/z = 214 [M]^+$. Análisis elemental: $C_{12}H_{10}N_2S$, Teórico: C %: 67.26, H %: 4.70, N %: 13.07, S %: 14.96. Hallado: C %: 66.92, H %: 4.74, N %: 12.81, S %: 14.68.

1,4,5-(5,6-Diacetil-5,6-dihidrodibenzo[b,f]tiadiazepina (6).

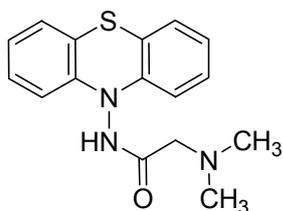


El compuesto se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de hexano : AcOEt (5 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.4$ se aisló **6** como un sólido blanco, p.f: 146-149 °C. 1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.48-7.29 (m, 7H, aromáticos), 2.18 (s, 3H, CH_3), 2.08 (s, 3H, CH_3). ^{13}C -RMN (100 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 171.4 ($COCH_3$), 168.3 ($COCH_3$), 133.8 (C), 132.1 (C), 130.2 (C), 128.9 (C), 128.7 (C), 128.5 (C), 128.1 (2C), 127.5 (C), 126.6 (C), 126.3 (C), 125.8 (C), 22.7 (CH_3), 22.3 (CH_3). HPLC: Pureza (95%). Método A: 50/50. EM: $m/z = 299 [M+H]^+$, 321 $[M+Na]^+$, 319 $[2M+Na]^+$.

3. Serie de las *N*-acilaminofenotiazinas.

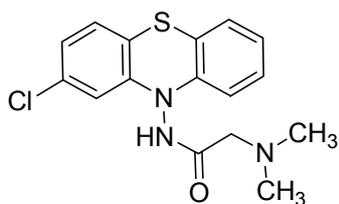
3.1. *N*-acilaminofenotiazinas presentes en la quimioteca.

10-Dimetilaminoacetilaminofenotiazina (7).

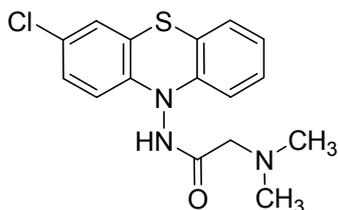


El compuesto **7** se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂ : CH₃OH (12 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.4$ se aisló **7** como un sólido blanco, p.f: 184-186 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.17 (s, 1H, NH), 7.4-6.1 (m, 8H, aromáticos), 3.05 (s, 2H, H₂), 2.46 (s, 6H, 2CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.1 (C), 143.2 (2C), 127.5 (2C), 127.3 (2C), 123.9 (2C), 119.8 (2C), 113.1 (2C), 62.6 (C₂), 46.7 (2C). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 300$ [M+H]⁺, 322 [M+Na]⁺, 621 [2M+Na]⁺. Análisis elemental: C₁₆H₁₇N₃OS, Teórico: C %: 57.74, H %: 4.54, N %: 12.63, S %: 9.63. Hallado: C %: 57.50, H %: 4.61, N %: 12.43, S %: 9.46.

2-Cloro-10-dimetilaminoacetilaminofenotiazina (8).



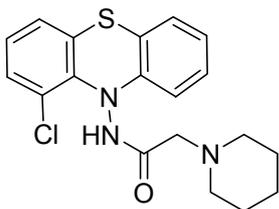
El compuesto **8** era un sólido blanco que permanecía puro y no fue necesario purificarlo, p.f: 216-218 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.23 (s, 1H, NH), 7.05 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, H₈), 6.97 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, H₆), 6.87 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H₄), 6.86 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₇), 6.81 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H₃), 6.70 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₉), 6.67 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H₁), 3.25 (s, 2H, H₂), 2.44 (s, 6H, 2CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 168.3 (CONH), 143.3 (C_{10a}), 141.4 (C_{9a}), 132.2 (C₂), 126.7 (C₄), 126.5 (C₈), 126.1 (C₆), 123.1 (C₇), 122.4 (C₃), 119.0 (C_{5a}), 117.9 (C_{4a}), 112.5 (C₉), 112.2 (C₁), 61.5 (C₂), 45.6 (2C, 2CH₃). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 334$ [M+H]⁺, 336 [M+2H]⁺, 356 [M+Na]⁺, 689 [2M+Na]⁺. Análisis elemental: C₁₆H₁₆ClN₃OS, Teórico: C %: 57.74, H %: 4.54, N %: 12.65, S %: 9.65. Hallado: C %: 57.69, H %: 4.80, N %: 12.40, S %: 9.35.

3-Cloro-10-dimetilaminoacetilaminofenotiazina (9).

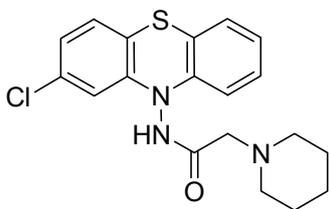
El compuesto **9** era un sólido blanco que permanecía puro y no fue necesario purificarlo, p.f: 189-191 °C. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.17 (s, 1H, NH), 7.09 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_8), 7.07 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_6), 7.03 (dd, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=2.3$ Hz, H_2), 7.01 (d, 1H, $J=2.3$ Hz, H_4), 6.93 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_7), 6.73 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_9), 6.63 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, H_1), 3.29 (s, 2H, H_2'), 2.49 (s, 6H, 2 CH_3). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169.2 (CONH), 142.6 (C_{9a}), 141.8 (C_{10a}), 128.6 (C_3), 127.6 (C_4), 127.2 (C_8), 126.9 (C_6), 126.5 (C_2), 123.9 (C_7), 122.4 (C_{4a}), 119.7 (C_{5a}), 113.9 (C_1), 113.1 (C_9), 62.5 (C_2'), 46,7 (2C). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 334$ [M] $^+$, 336 [$\text{M}+2\text{H}$] $^+$, 689 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$. Análisis elemental: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{OS}$, Teórico: C %: 57.74, H %: 4.54, N %: 12.63, S %: 9.53. Hallado: C %: 57.66, H %: 4.75, N %: 12.54, S %: 9.12.

10-(Piperidin-1-il)acetilaminofenotiazina (10).

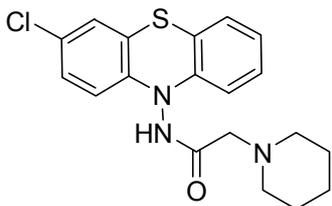
El compuesto **10** era un sólido blanco permanecía puro y fue necesario purificarlo, p.f: 201-203 °C. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.25 (s, 1H, NH), 7.7-6.7 (m, 8H, aromáticos), 3.42 (s, 2H, H_2'), 2.83 (m, 4H, 2 CH_2), 1.76 (m, 4H, 2 CH_2), 1.61 (m, 2H, CH_2). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169.2 (CO CH_3), 143.0 (2C), 127.2 (2C), 127.1 (2C), 123.7 (2C), 119.6 (2C), 112.9 (2C), 63.2 (C_2'), 56.3 (2C), 26.9 (2C), 24.1 (C). HPLC: Pureza (96%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 340$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 362 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 701 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$. Análisis elemental: $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{OS}$, Teórico: C %: 67.43, H %: 5.96, N %: 12.42, S %: 9.47. Hallado: C %: 67.73, H %: 5.86, N %: 12.60, S %: 9.27.

1-Cloro-10-(piperidin-1-il)acetilaminofenotiazina (11).

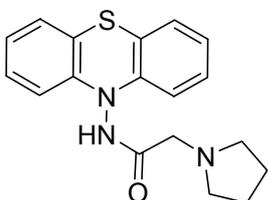
El compuesto se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de hexano : AcOEt (1 : 2). De las fracciones de $R_f = 0.2$ se aisló **11** como un sólido blanco, p.f: 173-175 °C. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.23 (s, 1H, NH), 7.12 (m, 2H, H₈, H₂), 6.97 (m, 2H, H₄, H₆), 6.92 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H₇), 6.67 (td, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.5$ Hz, H₃), 6.59 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 2.7$ Hz, H₉), 3.28 (s, 2H, H_{2'}), 2.65 (m, 4H, 2CH₂), 1.67 (m, 4H, 2CH₂), 1.51 (m, 2H, CH₂). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 16.4 (CONH), 143.9 (C_{10a}), 142.2 (C_{9a}), 131.2 (C₁), 127.6 (C₆), 127.3 (C₄), 127.2 (C₂), 123.9 (C₈), 123.8 (C₉), 120.5 (C_{4a}), 119.3 (C_{5a}), 112.9 (C₃), 111.2 (C₇), 61.8 (C_{2'}), 55.7 (2C), 26.2 (2C), 23.5 (C). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM : $m/z = 374$ $[\text{M}]^+$, 376 $[\text{M}+2\text{H}]^+$, 396 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 769 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$. Análisis elemental: C₁₉H₂₀ClN₂OS, Teórico: C %: 61.03, H %: 5.39, Cl %: 9.48, N %: 11.24, S %: 8.58. Hallado: C %: 60.92, H %: 5.11, Cl %: 9.26, N %: 10.97, S %: 8.36.

2-Cloro-10-(piperidin-1-il)acetilaminofenotiazina (12).

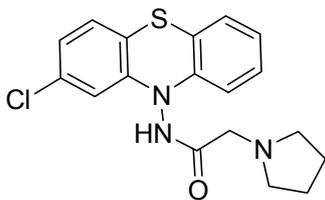
El compuesto **12** era un sólido blanco que permanecía puro y no fue necesario purificarlo, p.f: 197-199 °C. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.22 (s, 1H, NH), 7.09 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, H₈), 7.06 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.5$, H₆), 6.98 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H₄), 6.95 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₇), 6.90 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H₃), 6.73 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₉), 6.71 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H₁), 3.31 (s, 2H, H_{2'}), 2.68 (m, 4H, 2CH₂), 1.65 (m, 4H, 2CH₂), 1.50 (m, 2H, CH₂). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169.5 (CONH), 144.5 (C_{10a}), 142.7 (C_{9a}), 133.5 (C₂), 127.9 (C₄, C₈), 127.4 (C₆), 124.7 (C₇), 123.7 (C₃), 120.2 (C_{5a}), 119.2 (C_{4a}), 113.6 (C₉), 113.3 (C₁), 62.2 (C_{2'}), 55.9 (2C, 2CH₂), 26.4 (2C, 2CH₂), 23.8 (C, CH₂). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 374$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 376 $[\text{M}+2\text{H}]^+$, 396 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 768 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$. Análisis elemental: C₁₉H₂₀ClN₃OS, Teórico: C %: 61.20, H %: 5.14, N %: 11.27, S %: 8.60. Hallado: C %: 61.31, H %: 5.40, N %: 11.26, S %: 8.30.

3-Cloro-10-(piperidin-1-il)acetilaminofenotiazina (13).

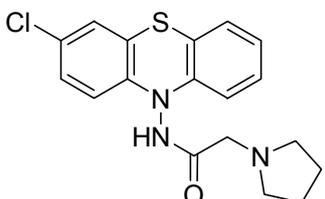
El compuesto **13** era un sólido blanco que permanecía puro y no fue necesario purificarlo, p.f: 197-199 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.15 (s, 1H, NH), 6.85 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₈), 6.81 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₆), 6.78 (dd, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=2.3$ Hz, H₂), 6.74 (d, 1H, $J=2.3$ Hz, H₄), 6.68 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₇), 6.46 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₉), 6.36 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, H₁), 3.05 (s, 2H, H_{2'}), 2.41 (m, 4H, 2CH₂), 1.43 (m, 4H, 2CH₂), 1.30 (m, 2H, CH₂). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.7 (CONH), 143.1 (C_{9a}), 142.4 (C_{10a}), 128.9 (C₃), 128.0 (C₄), 127.6 (C₆, C₈), 126.9 (C₂), 124.9 (C₇), 122.7 (C_{4a}), 120.1 (C_{5a}), 114.3 (C₁), 113.4 (C₉), 62.2 (C_{2'}), 56.1 (2C), 26.5 (2C), 23.8 (C). HPLC: Pureza (100%). Método B:95/5. EM: $m/z = 374$ [M]⁺, 376 [M+2H]⁺, 396 [M+Na]⁺, 769 [2M+Na]⁺. Análisis elemental: C₁₉H₂₀ClN₃OS, Teórico: C %: 61.20, H %: 5.14, N %: 11.27, S %: 8.60. Hallado: C %: 61.04, H %: 5.04, N %: 11.02, S %: 8.50.

10-(Pirrolidin-1-il)acetilaminofenotiazina (14).

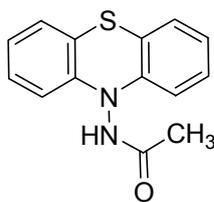
El compuesto **14** era un sólido blanco que permanecía puro y fue necesario purificarlo, p.f: 182-184 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.17 (s, 1H, NH), 7.11-6.73 (m, 8H, aromáticos), 3.51 (s, 2H, H_{2'}), 2.82 (m, 4H, 2CH₂), 1.88 (m, 4H, 2CH₂). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.7 (C), 142.9 (2C), 127.3 (2C), 127.1 (2C), 123.7 (2C), 120.4 (2C), 113.1 (2C), 58.6 (C_{2'}), 55.2 (2C), 24.2 (2C). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 326$ [M+H]⁺, 348 [M+Na]⁺, 673 [2M+Na]⁺. Análisis elemental: C₁₈H₁₉N₃OS, Teórico: C %: 66.64, H %: 5.59, N %: 12.95, S %: 9.88. Hallado: C %: 66.51, H %: 5.80, N %: 12.81, S %: 10.08.

2-Cloro-10-(pirrolidin-1-il)acetilaminofenotiazina (15).

El compuesto **15** era un sólido blanco permanecía puro y no hubo necesidad de purificarlo, p.f: 219-221 °C. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.29 (s, 1H, NH), 7.02 (td, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.5$ Hz, H_8), 6.94 (dd, 1H, $J=7.6$, $J=1.5$ Hz, H_6), 6.85 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H_4), 6.83 (td, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.1$ Hz, H_7), 6.78 (dd, 1H, $J=8.2$ Hz, $J=2.1$ Hz, H_3), 6.69 (dd, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.1$ Hz, H_9), 6.66 (d, 1H, $J=2.1$ Hz, H_1), 3.52 (s, 2H, $\text{H}_{2'}$), 2.79 (m, 4H, 2 CH_2), 1,87 (m, 4H, 2 CH_2). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169.1 (CONH), 144.5 (C_{10a}), 142.4 (C_{9a}), 132.2 (C_2), 127.7 (C_4 , C_8), 126.4 (C_6), 123.7 (C_7), 122.6 (C_3), 117.9 (C_{5a}), 117.3 (C_{4a}), 113.8 (C_9), 113.3 (C_1), 57.84 ($\text{C}_{2'}$), 54.5 (2C, 2 CH_2), 23,4 (2C, 2 CH_2). HPLC: Pureza(99%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 360$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 362 $[\text{M}+2\text{H}]^+$, 382 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 741 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$. Análisis elemental: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OS}$, Teórico: C %: 60.24, H %: 4.77, N %: 10.71, S %: 8.94. Hallado: C %: 60.12, H %: 4.51, N %: 10.65, S %: 8.74.

3-Cloro-10-(pirrolidin-1-il)acetilaminofenotiazina (16).

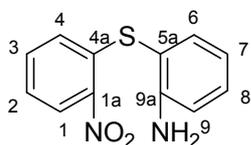
El compuesto **16** se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 : CH_3OH (20 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.2$ se aisló **16** como un sólido blanco, p.f: 184-186 °C. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.23 (s, 1H, NH), 7.09 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_8), 7.05 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_6), 7.03 (dd, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=2.3$ Hz, H_2), 7.00 (d, 1H, $J=2.3$ Hz, H_4), 6.93 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_7), 6.72 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_9), 6.62 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, H_1), 3.51 (s, 2H, $\text{H}_{2'}$), 2.80 (m, 4H), 1,88 (m, 4H). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169.7 (CONH), 142.5 (C_{9a}), 141.6 (C_{10a}), 128.5 (C_3), 127.6 (C_4), 127.1 (C_8), 127.0 (C_6), 126.4 (C_2), 123.9 (C_7), 122.2 (C_{4a}), 119.5 (C_{5a}), 114.0 (C_1), 113.2 (C_9), 58.5 ($\text{C}_{2'}$), 55.2 (2C), 24.1 (2C). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 360$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 362 $[\text{M}+2\text{H}]^+$, 382 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 741 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$. Análisis elemental: $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OS}$, Teórico: C %: 60.24, H %: 4.73, N %: 11.71, S %: 8.94. Hallado: C %: 59.64, H %: 4.95, N %: 11.60, S %: 8.69.

10-Acetilaminofenotiazina (17).

El compuesto **17** era un sólido blanco permanecía puro y no hubo necesidad de purificarlo, p.f: 230-232 °C. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 10.5 (s, 1H, NH), 7.1-6.8 (m, 8H, aromáticos), 2.11 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 173.7 (C), 142.3 (C), 141.8 (C), 127.8 (C), 127.1 (C), 126.8 (C), 126.6 (C), 125.6 (C), 123.5 (C), 120.3 (C), 117.2 (C), 114.7 (C), 113.5 (C), 20.5 (C₂). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 257 [M+H]⁺. Análisis elemental: C₁₄H₁₂N₂OS, Teórico: C %: 65.60, H %: 4.72, N %: 10.93, S %: 12.51. Hallado: C %: 65.82, H %: 4.65, N %: 10.71, S %: 12.36.

3.2 Síntesis de N-acilaminofenotiazinas.**1 Síntesis de diarilsulfuros. Procedimiento general.**

Se añadió gota a gota una mezcla de 2-cloronitrobenzoceno (63.5 mmol) y 2-aminotiofenol (63.5 mmol) en isopropanol sobre una solución de KOH (85%) en 10 ml de etanol al 95% y se mantuvo a reflujo durante 5h. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente a sequedad a presión reducida y el residuo fue purificado por cromatografía en columna a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente el indicado en cada caso.

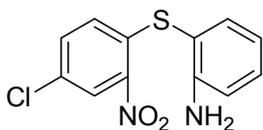
Sulfuro de 2-nitrofenilo y 2-aminofenilo (18).

Siguiendo el procedimiento general a partir de 2-cloronitrobenzoceno (2 g, 13.00 mmol) y 2-aminotiofenol (1.32 mL, 13.00 mmol) y posterior purificación con Hex/AcOEt (1:5), se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 1.35 g (53%), de p. f: 99-101 °C.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.26 (dd, 1H, *J*= 8.3 Hz, *J*= 1.4 Hz, H₁), 7.45 (dd, 1H, *J*= 7.8 Hz, *J*= 1.4 Hz, H₄), 7.35 (m, 2H, H₂, H₆), 7.23 (td, 1H, *J*= 7.8 Hz, *J*= 1.4 Hz, H₃), 6.84 (m, 3H, H₇, H₈, H₉). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 149.1 (C), 145.1 (C), 137.8 (C), 137.3 (C), 133.7 (C), 132.3 (C), 127.2 (C), 126.1 (C), 125.1

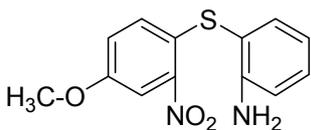
(C), 119.5 (C), 115.8 (C), 112.5 (C). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 247 [M+H]^+$. Análisis elemental: $C_{13}H_{12}N_2O_3S$, Teórico: C %: 58.52, H %: 4.09, N %: 11.37, S %: 13.02. Hallado: C %: 55.23, H %: 4.22, N %: 10.97, S %: 13.15.

Sulfuro de 4-cloro-2-nitrofenilo y 2-aminofenilo (19).



Siguiendo el procedimiento general a partir de 2,4-dicloronitrobenzoceno (2 g, 10.40 mmol) y 2-aminotiofenol (1.12 mL, 10.40 mmol) y posterior purificación con Hex/AcOEt (1:5) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 1.73 g (60%), de p. f: 131-133 °C. 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.22 (d, 1H, $J=8.8$, H_4), 7.42 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_6), 7.36 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_8), 7.11 (dd, 1H, $J=8.8$ Hz, $J=1.9$ Hz, H_3), 6.80 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$, H_7), 6.77 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_9), 6.68 (d, 1H, $J=1.9$ Hz, H_1). ^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 148.9 (C_{9a}), 140.9 (C_{1a}), 139.7 (C_{4a}), 137.7 (C_6), 132.8 (C_8), 127.4 (C_4), 126.7 (C_3), 125.3 (C_1), 123.8 (C_2), 119.6 (C_7), 115.9 (C_9), 111.4 (C_{5a}). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 281 [M+H]^+$. Análisis elemental: $C_{12}H_9ClN_2O_2S$, Teórico: C %: 51.34, H %: 3.23, N %: 9.98, S %: 11.42. Hallado: C %: 51.09, H %: 3.30, N %: 9.92, S %: 11.51.

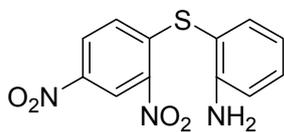
Sulfuro de 2-nitro-4-metoxifenilo y 2-aminofenilo (20).



Siguiendo el procedimiento general a partir de 4-cloro-3-nitroanisol (2 g, 10.60 mmol) y 2-aminotiofenol (1.15 mL, 10.60 mmol) y posterior purificación con Hex/AcOEt (1:4) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 1.21 g (41%), de p. f: 112-114 °C. 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.75 (d, 1H, $J=2.7$, H_1), 7.45 (dd, 1H, $J=7.9$ Hz, $J=1.6$ Hz, H_6), 7.31 (td, 1H, $J=7.9$ Hz, $J=1.6$ Hz, H_8), 6.98 (dd, 1H, $J=8.9$ Hz, $J=2.7$ Hz, H_3), 6.84 (td, 1H, $J=7.9$ Hz, $J=1.2$, H_7), 6.81 (dd, 1H, $J=7.9$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_9), 6.74 (d, 1H, $J=8.9$ Hz, H_4), 3.83 (s, 1H, CH_3). ^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 157.17 (C_2), 149.0 (C_{1a}), 145.52 (C_{9a}), 137.9 (C_6), 132.2 (C_4), 128.3 (C_8), 126.1 (C_{4a}), 122.1 (C_3), 119.4 (C_7), 115.7 (C_9), 113.1 (C_{5a}), 109.4 (C_1), 55.87 (C, CH_3). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 277 [M+H]^+$. Análisis elemental:

$C_{13}H_{12}N_2O_3S$, Teórico: C %: 56.51, H %: 4.38, N %: 10.43, S %: 11.60. Hallado: C %: 56.36, H %: 4.42, N %: 10.61, S %: 11.73.

Sulfuro de 2,4-dinitrofenilo y 2-aminofenilo (21).

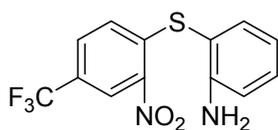


Siguiendo el procedimiento general a partir de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (1 g, 4.94 mmol) y 2-aminotiofenol (0.53 mL, 4.94 mmol). Posteriormente se lavo el sólido con H_2O , se filtro

y se obtuvo un sólido naranja con un rendimiento: 1.18 g (81%), de p. f: 148-150 °C.

1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 9.03 (d, 1H, $J=2.4$ Hz, H_1), 8.09 (dd, 1H, $J=9.1$ Hz, $J=2.4$ Hz, H_3), 7.3 (td, 1H, $J=7.5$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_8), 7.30 (dd, 1H, $J=7.5$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_9), 6.96 (d, 1H, $J=9.1$ Hz, H_4), 6.84 (dd, 1H, $J=7.5$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_6), 6.78 (td, 1H, $J=7.5$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_7). ^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 149.2 (C_{9a}), 146.1 (C_2), 144.3 (C_{1a}), 144.2 (C_{4a}), 137.2 (C_4), 133.0 (C_6), 128.4 (C_3), 126.9 (C_8), 121.5 (C_1), 119.5 (C_7), 116.0 (C_9), 110.2 (C_{5a}). HPLC: Pureza (96%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 292 [M+H]^+$. Análisis elemental: $C_{12}H_9N_3O_4S$, Teórico: C %: 49.48, H %: 3.11, N %: 14.43, S %: 11.01. Hallado: C %: 49.33, H %: 3.02, N %: 14.60, S %: 10.69.

Sulfuro de 2-nitro-4-trifluorometilfenilo y 2-aminofenilo (22).



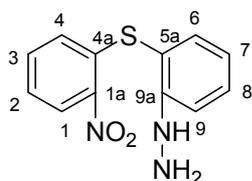
Siguiendo el procedimiento general a partir de 4-cloro-3-nitrotrifluorobenceno (2 g, 8.86 mmol) y 2-aminotiofenol (0.96 mL, 8.86 mmol) y posterior purificación con Hex/AcOEt (1:4)

se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 1.84 g (67%), de p. f: 109-111 °C. 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 6.30 (dd, 1H, $J=8.5$, $J=1.7$, H_3), 6.15 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.1$ Hz, H_6), 6.09 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.5$ Hz, H_8), 5.98 (s, 1H, H_1), 5.71 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H_4), 5.59 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.1$ Hz, H_7), 5.57 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.5$ Hz, H_9). ^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 149.1 (C_{9a}), 144.7 (C_{1a}), 142.3 (C_{4a}), 137.6 (C_4), 132.8 (C_6), 129.7 ($J=3.3$ Hz, C_3), 127.6 ($J=34.4$ Hz, C_2), 123.9 (C_8), 123.4 ($J=4.8$ Hz, C_1), 123.2 ($J=266$ Hz, C_{2a}), 119.7 (C_7), 115.9 (C_9), 111.2 (C_{5a}). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 315 [M+H]^+$, 337 [$M+Na$] $^+$. Análisis elemental: $C_{13}H_9N_2F_3O_2S$, Teórico: C %: 49.68, H %: 2.89, N %: 8.91, S %: 10.20. Hallado: C %: 49.57, H %: 3.06, N %: 9.02, S %: 10.12.

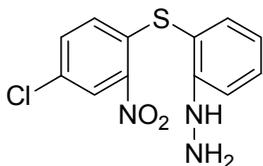
2 Síntesis de hidrazinas. Procedimiento general.

El diarilsulfuro (1 g, 4.06 mmol) correspondiente fue añadido gradualmente sobre HCl (5 mL) en agitación durante 2h a temperatura ambiente. Mientras se preparó el NaNO₂ (0.31g, 4.46 mmol) en H₂O (1.4 mL), y se añadió gota a gota sobre la solución anterior, previamente enfriada en baño de hielo a 5-0°C. Se dejó 1h a esta temperatura. Después se preparó una solución de SnCl₂·2H₂O (2 g, 8.93 mmol) en HCl (2 mL), se enfriaron las dos soluciones a -15°C, y la última se añadió gota a gota sobre la anterior. Se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Se separó el sólido por filtración y se trató con un exceso de una solución de NaOH al 20%, y después de 1h de agitación se filtró el sólido, se lavó con H₂O y se secó.

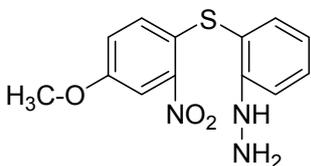
Sulfuro de 2-nitrofenilo y 2-hidrazinofenilo (23).



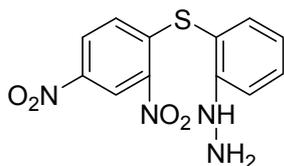
Seguendo el procedimiento general, a partir del compuesto **18** (1 g, 4.06 mmol), NaNO₂ (0.31 g, 4.46 mmol) y SnCl₂·2H₂O (2.01 g, 8.92 mmol) en HCl (5mL). Se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.49g (60%), de p. f: 139-141 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.23 (dd, 1H, *J*= 8.0, *J*= 1.2, H₁), 7.39 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₄), 7.30 (m, 2H, H₂, H₆), 7.23 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₃), 6.82 (m, 3H, H₇, H₈, H₉). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 149.1 (C), 146.2 (C), 137.7 (C), 137.2 (C), 133.6 (C), 132.4 (C), 127.2 (C), 126.2 (C), 125.6 (C), 119.6 (C), 115.0 (C), 112.8 (C). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 261 [M+H]⁺. Análisis elemental: C₁₂H₁₁N₃O₂S, Teórico: C %: 55.16, H %: 4.24, N %: 16.08, S %: 12.27. Hallado: C %: 55.28, H %: 4.11, N %: 16.19, S %: 12.22.

Sulfuro de 4-cloro-2-nitrofenilo y 2-hidrazinofenilo (24).

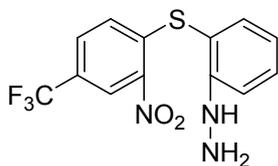
Siguiendo el procedimiento general, a partir del compuesto **19** (1 g, 3.56 mmol), NaNO₂ (0.27 g, 3.91 mmol) y SnCl₂·2H₂O (1.77 g, 7.83 mmol) en HCl (5mL). Se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.54g (51%), de p. f: 117-119 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.25 (d, 1H, *J*=8.6, H₄), 7.39 (dd, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₆), 7.32 (td, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*=1.2 Hz, H₈), 7.09 (dd, 1H, *J*= 8.6 Hz, *J*= 1.7 Hz, H₃), 6.82 (td, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*= 1.2, H₇), 6.78 (dd, 1H, *J*=7.7 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₉), 6.66 (d, 1H, *J*= 1.7 Hz, H₁). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 153.9 (C_{9a}), 145.7 (C_{1a}), 144.3 (C_{4a}), 142.6 (C₆), 137.3 (C₈), 132.1 (C₄), 131.5 (C₃), 130.4 (C₁), 125.7 (C₂), 121.2 (C₇), 117.8 (C₉), 112.5 (C_{5a}). HPLC: Pureza (98%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 297 [M+H]⁺. Análisis elemental: C₁₂H₉ClN₂O₂S, Teórico: C %: 48.73, H %: 3.41, N %: 14.21, S %: 10.84. Hallado: C %: 48.89, H %: 3.37, N %: 14.16, S %: 10.71.

Sulfuro de 2-nitro-4-metoxifenilo y 2-hidrazinofenilo (25).

Siguiendo el procedimiento general, a partir del compuesto **20** (1 g, 3.61 mmol), NaNO₂ (0.27 g, 3.97 mmol) y SnCl₂·2H₂O (1.79 g, 7.94 mmol) en HCl (5mL). Se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.63 g (60%), de p. f: 115-117 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.63 (d, 1H, *J*=2.5, H₁), 7.41 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.4 Hz, H₆), 7.35 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*=1.4 Hz, H₈), 6.83 (dd, 1H, *J*= 8.8 Hz, *J*= 2.5 Hz, H₃), 6.82 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2, H₇), 6.76 (dd, 1H, *J*=7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₉), 6.68 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, H₄), 3.62 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 157.5 (C₂), 146.0 (C_{9a}), 145.8 (C_{1a}), 137.3 (C₆), 132.3 (C₄), 128.7 (C₈), 128.0 (C_{4a}), 123.7 (C₃), 121.7 (C₇), 116.6 (C₉), 113.9 (C_{5a}), 109.5 (C₁), 55.87 (C, CH₃). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 292 [M+H]⁺. Análisis elemental: C₁₃H₁₃N₃O₃S, Teórico: C %: 53.60, H %: 4.50, N %: 14.42, S %: 11.01. Hallado: C %: 53.46, H %: 4.38, N %: 14.66, S %: 11.14.

Sulfuro de 2,4-dinitrofenilo y 2-hidrazinofenilo (26).

Siguiendo el procedimiento general, a partir del compuesto **21** (1 g, 3.42 mmol), NaNO₂ (0.26 g, 3.77 mmol) y SnCl₂·2H₂O (1.70 g, 7.54mmol) en HCl (5mL). Se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.86 g (75%), de p. f: 133-135 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.95 (d, 1H, *J*=2.5, H₁), 8.02 (dd, 1H, *J*= 8.9 Hz, *J*= 2.5 Hz, H₃), 7.21 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*=1.2 Hz, H₈), 7.10 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₉), 6.87 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, H₄), 6.76 (dd, 1H, *J*=7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₆), 6.58 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₇). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 149.4 (C_{9a}), 147.1 (C₂), 145.6 (C_{1a}), 145.3 (C_{4a}), 136.2 (C₄), 134.1 (C₆), 127.7 (C₃), 126.5 (C₈), 120.9 (C₁), 119.8 (C₇), 115.1 (C₉), 112.3 (C_{5a}). HPLC: Pureza (97%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 307 [M+H]⁺. Análisis elemental: C₁₂H₁₀N₄O₄S, Teórico: C %: 47.06, H %: 3.29, N %: 18.29, S %: 10.47. Hallado: C %: 47.23, H %: 3.15, N %: 18.26, S %: 10.63.

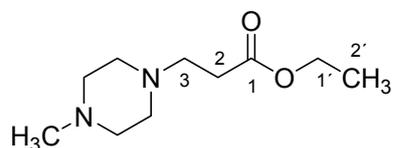
Sulfuro de 2-nitro-4-trifluorometilfenilo y 2-hidrazinofenilo (27).

Siguiendo el procedimiento general a partir del compuesto **22** (1 g, 3.18 mmol), NaNO₂ (0.24 g, 3.50 mmol) y SnCl₂·2H₂O (1.57 g, 7.00 mmol) en HCl (5mL). Se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.52g (51%), de p. f: 141-143 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.41 (dd, 1H, *J*= 8.5, *J*= 1.7, H₃), 6.23 (dd, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₆), 6.12 (td, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*=1.1 Hz, H₈), 6.03 (s, 1H, H₁), 5.82 (d, 1H, *J*= 8.5 Hz, H₄), 5.68 (td, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₇), 5.63 (dd, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₉). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 149.7 (C_{9a}), 144.3 (C_{1a}), 142.1 (C_{4a}), 137.4 (C₄), 132.9 (C₆), 129.5 (*J*= 3.3 Hz, C₃), 127.7 (*J*= 34.4 Hz, C₂), 123.8 (C₈), 123.1 (*J*= 4.8 Hz, C₁), 122.6 (*J*= 266 Hz, C_{2a}), 119.5 (C₇), 115.4 (C₉), 111.0 (C_{5a}). HPLC: Pureza (94%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 330 [M+H]⁺, 353 [M+Na]⁺. Análisis elemental: C₁₃H₁₀ F₃N₃O₂S, Teórico: C %: 47.42, H %: 3.06, N %: 12.76, S %: 9.74. Hallado: C %: 47.36, H %: 3.23, N %: 12.81, S %: 9.76

3 Síntesis de ésteres. Procedimiento general.

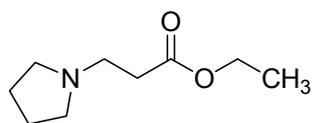
Se preparó una solución etérea de la amina (1.86g, 41.4 mmol) correspondiente, se añadió el 2-bromopropionato de etilo (1g, 5.52 mmol) y se dejó 20 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo el precipitado de hidrobromuro de la amina se eliminó por filtración y el filtrado se eliminó el disolvente a sequedad a presión reducida. A continuación se hicieron extracciones sucesivas en eter : agua, reservando la fase etérea, que fue evaporada a sequedad bajo presión reducida.

2-(4-Metilpiperazin-1-il)propanoato de etilo (28).

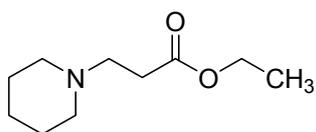


Siguiendo el procedimiento general a partir de *N*-metilpiperacina (0.55 g, 5.52 mmol) y 2-bromopropionato de etilo (1 g, 5.52 mmol) en éter etílico, se obtuvo un aceite blanco con un rendimiento: 0.620g (57%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4.05 (q, 2H, *J*= 7.1 Hz, H_{1'}), 3.12 (m, 4H, 2CH₂), 2.83 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H₃), 2.71 (m, 4H, 2CH₂), 2.43 (t, 2H, *J*=2.8 Hz, H₂), 2.34 (s, 3H, CH₃), 1.18 (t, 3H, *J*= 7.1 Hz, H_{2'}). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.1 (CO), 61.8 (C_{1'}), 53.4 (2C, 2CH₂), 53.0 (2C, 2CH₂), 51.1 (C₃), 43.2 (CH₃), 31.8 (C₂), 13.9 (C_{2'}). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 201 [M+H]⁺.

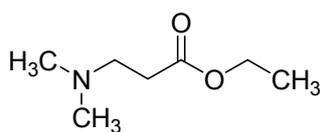
2-(Pirrolidin-1-il)propanoato de etilo (29).



Siguiendo el procedimiento general a partir de pirrolidina (0.45 mL, 5.52 mmol) y 2-bromopropionato de etilo (1 g, 5.52 mmol) en éter etílico, se obtuvo un aceite blanco con un rendimiento: 0.758g (80%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4.12 (q, 2H, *J*= 7.1 Hz, H_{1'}), 3.42 (m, 4H, 2CH₂), 3.01 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H₃), 2.11 (m, 6H, 2CH₂, H₂), 1.26 (t, 3H, *J*= 7.1 Hz, H_{2'}). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.3 (CO), 62.0 (C_{1'}), 52.4 (2C, 2CH₂), 45.4 (C₃), 30.8 (C₂), 24.2 (2C, 2CH₂), 14.5 (C_{2'}). HPLC: Pureza (97%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 272 [M+H]⁺.

2-(Piperidin-1-il)propanoato de etilo (30).

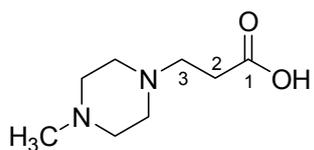
Siguiendo el procedimiento general a partir de piperidina (0.87 g, 10.20 mmol) y 2-bromopropionato de etilo (1 g, 5.52 mmol) en éter etílico, se obtuvo un aceite blanco con un rendimiento: 0.622g (61%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4.15 (q, 2H, $J=7.1$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 3.08 (t, 2H, $J=2.8$ Hz, H_3), 2.32 (m, 6H, 2CH_2 , H_2), 2.34 (m, 6H, 3CH_2), 1.27 (t, 3H, $J=7.1$ Hz, H_2'). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 171.1 (CO), 60.8 ($\text{C}_{1'}$), 52.5 (2C , 2CH_2), 49.1 (C_3), 31.7 (C_2), 26.8 (2C , 2CH_2), 24.3 (C, CH_2), 13.6 (C_2'). HPLC: Pureza (95%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 186$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 207 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

2-Dimetilaminopropanoato de etilo (31).

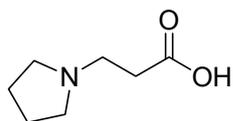
Siguiendo el procedimiento general a partir de *N,N*-dimetilamina (1.86 g, 41.40 mmol) y 2-bromopropionato de etilo (1 g, 5.52 mmol) en éter etílico, se obtuvo un aceite blanco con un rendimiento: 0.71g (88%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4.13 (q, 2H, $J=7.1$ Hz, $\text{H}_{1'}$), 3.31 (t, 2H, $J=1.8$ Hz, H_3), 2.98 (t, 2H, $J=1.8$ Hz, H_2), 2.74 (s, 6H, 2CH_2), 1.22 (t, 3H, $J=7.1$ Hz, H_2'). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.1 (CO), 62.1 ($\text{C}_{1'}$), 53.4 (C_3), 43.5 (2CH_3), 29.8 (C_2), 14.5 (C_2'). HPLC: Pureza (96%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 146$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4 Síntesis de ácidos. Procedimiento general.

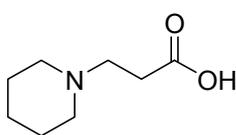
Se preparó una solución en etanol (10 mL) del éster (1 g, 6.88 mmol) correspondiente, sobre la que se añadió una solución acuosa de NaOH (0.55 g, 13.70 mmol) en H_2O (4mL) dejándose 2-3 h a temperatura ambiente. Después se añadió HCl y el precipitado formado se separó por filtración. La fase acuosa se extrajo con AcOEt y el disolvente de la fase orgánica se eliminó a sequedad bajo presión reducida.

Ácido 2-(4-metilpiperazin-1-il)propanoico (32).

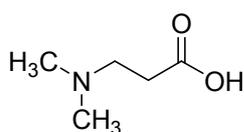
Siguiendo el procedimiento general, a partir del éster **28** (0.30 g, 1.49 mmol) y NaOH (0.12 g, 2.99 mmol) en etanol, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.19g (77%), de p.f: 148-150 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.10 (m, 4H, 2CH₂), 2.96 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H₃), 2.82 (m, 4H, 2CH₂), 2.67 (t, 2H, *J*=2.8 Hz, H₂), 2.45 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.7 (CO), 55.2 (2C, 2CH₂), 54.6 (2C, 2CH₂), 48.3 (C₃), 44.5 (CH₃), 37.1 (C₂). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 173 [M+H]⁺, 195 [M+Na]⁺.

Ácido 2-(pirrolidin-1-il)propanoico (33).

Siguiendo el procedimiento general, a partir del éster **29** (0.30 g, 1.75 mmol) y NaOH (0.14 g, 3.50 mmol) en etanol, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.21g (84%) y de p.f: 142-144 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.23 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H₃), 3.13 (m, 4H, 2CH₂), 2.79 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H₂), 1.84 (m, 4H, 2CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.9 (CO), 53.2 (2C, 2CH₂), 49.5 (C₃), 30.5 (C₂), 23.2 (2C, 2CH₂). HPLC: Pureza (98%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 144 [M+H]⁺.

Ácido 2-(piperidin-1-il)propanoico (34).

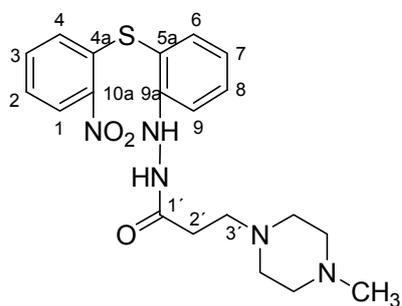
Siguiendo el procedimiento general, a partir del éster **30** (1 g, 5.36 mmol) y NaOH (0.43 g, 10.70 mmol) en etanol, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.436g (82%) y de p.f: 145-147 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.36 (m, 4H, 2CH₂); 3.17 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H₃); 2.82 (t, 2H, *J*= 2.8, H₂); 1.84 (m, 6H, 3CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 172.1 (CO); 52.4 (2C, 2CH₂); 51.8 (C₃); 28.9 (C₂); 22.8 (2C, 2CH₂); 21.8 (C, CH₂). HPLC: Pureza (96%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 158 [M+H]⁺. Análisis elemental: C₈H₁₅NO₂, Teórico: C %: 61.12, H %: 9.62, N %: 8.91. Hallado: C %: 61.34, H %: 9.76, N %: 8.82.

Ácido 2-dimetilaminopropanoico (35).

Siguiendo el procedimiento general, a partir del éster **31** (1 g, 6.88 mmol) y NaOH (0.55 g, 13.70 mmol) en etanol, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.54g (67%) y de p.f: 137-139 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.20 (t, 2H, *J*= 7.8 Hz, H₃); 2.78 (t, 2H, *J*= 7.8 Hz, H₂); 2.68 (s, 6H, 2CH₃). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.5 (CO); 51.9 (C₃); 39.9 (C₂); 28.9 (2C, 2 CH₃). HPLC: Pureza (94%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 118 [M+H]⁺.

5 Acoplamiento de hidrazinas con ácidos. Procedimiento general.

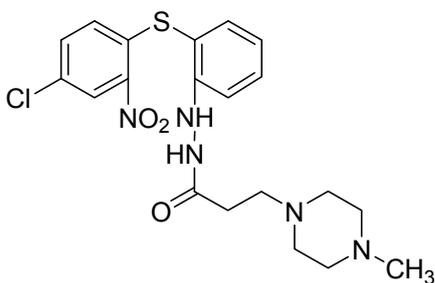
Se disolvió el ácido correspondiente (**32,33**), (0.062 g, 3.59 mmol) y PyBOP (0.18 g, 3.59 mmol) en 10 mL de DMF anhidra. A continuación se adicionó la Et₃N (0.098 g, 9.79 mmol) dejándolo durante 15 min a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. Después se añadió la hidrazina (**23-26**), (0.10 g, 3.26 mmol) correspondiente en cada caso, dejándolo durante 24 h a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente a sequedad a presión reducida obteniéndose un residuo que fue purificado mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente el indicado en cada caso.

Sulfuro de 2-nitrofenilo y 2-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilhidrazino]fenilo (36).

A partir del ácido **32** (0.12 g, 0.42 mmol), PyBop (0.22 g, 0.42 mmol), Et₃N (0.12 mL, 1.14 mmol) y la hidrazina **23** (0.10 g, 0.38 mmol) en DMF (10 mL), y posterior purificación con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.078g (49%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.12 (dd, 1H, *J*= 8.0, *J*= 1.2, H₁), 7.40 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₄), 7.26 (m, 2H, H₂, H₆), 7.21 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₃), 6.79 (m, 3H, H₇, H₈, H₉), 3.21 (m, 4H, 2CH₂), 2.95 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H_{3'}), 2.84 (m, 4H, 2CH₂), 2.69 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H_{2'}), 2.41 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 176.8 (CO), 148.7 (C), 146.5

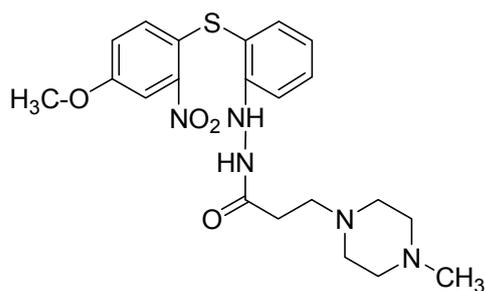
(C), 137.1 (C), 136.6 (C), 133.9 (C), 132.8 (C), 127.1 (C), 126.4 (C), 125.3 (C), 119.1 (C), 115.2 (C), 112.9 (C), 56.1 (2C, 2CH₂), 55.3 (2C, 2CH₂), 48.2 (C₃'), 44.4 (CH₃), 37.6 (C₂'). HPLC: Pureza (96%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 416 [M+H]^+$, 438 $[M+Na]^+$. Análisis elemental: C₂₀H₂₅N₅O₃S, Teórico: C %: 57.81, H %: 6.06, N %: 16.85, S %: 7.72. Hallado: C %: 57.98, H %: 5.86, N %: 16.63, S %: 7.93.

Sulfuro de 4-cloro-2-nitrofenilo y 2-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilhidrazino]fenilo (37).



A partir del ácido **32** (0.15 g, 0.55 mmol), PyBop (0.29 g, 0.55 mmol), Et₃N (0.21 mL, 1.52mmol) y la hidrazina **24** (0.15 g, 0.50 mmol) en DMF (10mL), Y posterior purificación con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.097g (43%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.27 (d, 1H, $J=8.6$, H₄), 7.34 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₆), 7.30 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₈), 7.06 (dd, 1H, $J=8.6$ Hz, $J=1.7$ Hz, H₃), 6.87 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$, H₇), 6.73 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₉), 6.69 (d, 1H, $J=1.7$ Hz, H₁), 3.22 (m, 4H, 2CH₂), 2.99 (t, 2H, $J=2.8$ Hz, H₃'), 2.76 (m, 4H, 2CH₂), 2.63 (t, 2H, $J=2.8$ Hz, H₂'), 2.41 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 176.8 (CO), 154.3 (C_{9a}), 145.1 (C_{1a}), 144.6 (C_{4a}), 142.4 (C₆), 137.7 (C₈), 132.3 (C₄), 131.4 (C₃), 130.0 (C₁), 125.4 (C₂), 121.1 (C₇), 117.6 (C₉), 112.6 (C_{5a}), 55.7 (2C, 2CH₂), 54.2 (2C, 2CH₂), 48.5 (C₃'), 44.4 (CH₃), 38.0 (C₂'). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 449 [M+H]^+$.

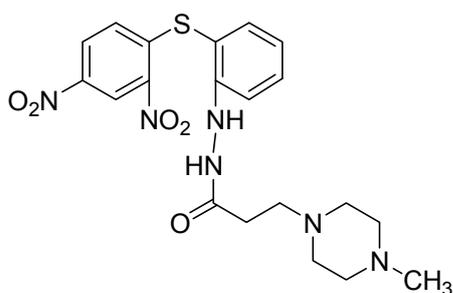
Sulfuro de 2-nitro-4-metoxifenilo y 2-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilhidrazino]fenilo (38).



A partir del ácido **32** (0.161 g, 0.56 mmol), PyBop (0.29 g, 0.56 mmol), Et₃N (0.21 mL, 1.54mmol) y la hidrazina **25** (0.15 g, 0.51 mmol) en DMF (10 mL), y posterior purificación con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento:

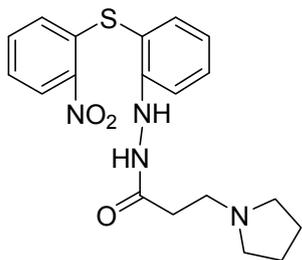
0.11 g (48%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.78 (d, 1H, $J=2.5$, H_1), 7.34 (dd, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.4$ Hz, H_6), 7.16 (td, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.4$ Hz, H_8), 6.92 (dd, 1H, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H_3), 6.71 (td, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.2$, H_7), 6.52 (dd, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_9), 6.45 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H_4), 3.57 (s, 3H, CH_3), 3.03 (m, 4H, 2CH_2), 2.92 (t, 2H, $J=2.8$ Hz, H_3'), 2.86 (m, 4H, 2CH_2), 2.73 (t, 2H, $J=2.8$ Hz, H_2'), 2.48 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 179.8 (CO), 156.7 (C_2), 147.6 (C_{1a}), 145.5 (C_{9a}), 137.1 (C_6), 133.6 (C_4), 128.2 (C_8), 127.6 (C_{4a}), 123.4 (C_3), 122.7 (C_7), 116.9 (C_3), 114.4 (C_{5a}), 109.3 (C_1), 55.7 (C, CH_3), 55.0 (2C, 2CH_2), 54.5 (2C, 2CH_2), 48.6 (C_3'), 43.4 (CH_3), 36.2 (C_2'). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 446$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 195 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Sulfuro de 2,4-dinitrofenilo y 2-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilhidrazino]fenilo (39).

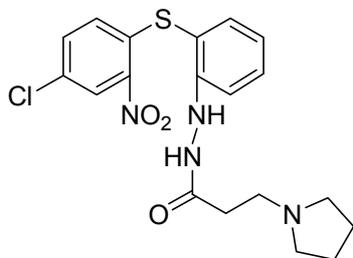


A partir del ácido **32** (0.062 g, 0.359 mmol), PyBop (0.18 g, 0.35 mmol), Et_3N (0.13 mL, 0.97mmol) y la hidrazina **26** (0.11, 0.32 mmol) en DMF (10mL), y posterior purificación con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.093 g (62%). $^1\text{H-RMN}$ (300

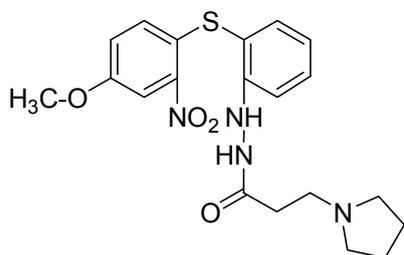
MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.91 (d, 1H, $J=2.5$, H_1), 8.00 (dd, 1H, $J=8.9$ Hz, $J=2.5$ Hz, H_3), 7.22 (td, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_8), 7.05 (dd, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_9), 6.84 (d, 1H, $J=8.9$ Hz, H_4), 6.71 (dd, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_6), 6.55 (td, 1H, $J=7.6$ Hz, $J=1.2$ Hz, H_7), 3.12 (m, 4H, 2CH_2), 2.93 (t, 2H, $J=2.8$ Hz, H_3'), 2.87 (m, 4H, 2CH_2), 2.63 (t, 2H, $J=2.8$ Hz, H_2'), 2.41 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 176.8 (CO), 149.4 (C_{9a}), 146.9 (C_2), 145.2 (C_{1a}), 144.7 (C_{4a}), 135.5 (C_4), 133.2 (C_6), 128.6 (C_3), 126.1 (C_8), 121.3 (C_1), 119.4 (C_7), 115.8 (C_9), 112.5 (C_{5a}), 56.9 (2C, 2CH_2), 54.3 (2C, 2CH_2), 49.3 (C_3'), 44.2 (CH_3), 37.1 (C_2'). HPLC: Pureza (95%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 461$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Análisis elemental: $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$, Teórico: C %: 52.28.06, H %: 5.05, N %: 18.29, S %: 6.98. Hallado: C %: 52.41, H %: 5.27, N %: 18.09, S %: 7.11.

Sulfuro de 2-nitrofenilo y 2-(pirrolidin-1-il)propionilhidrazinofenilo (40).

A partir del ácido **33** (0.10 g, 0.41 mmol), PyBop (0.22 g, 0.42 mmol), Et₃N (0.12 mL, 1.14 mmol) y la hidrazina **23** (0.10 g, 0.38 mmol) en DMF (10 mL), y posterior purificación con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.069 g (42%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.17 (dd, 1H, *J*= 8.0 Hz, *J*= 1.3 Hz, H₁), 7.43 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₄), 7.31 (m, 2H, H₂, H₆), 7.38 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₃), 6.50 (m, 3H, H₇, H₈, H₉), 3.28 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H_{3'}), 3.15 (m, 4H, 2CH₂), 2.82 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H_{2'}), 1.91 (m, 4H, 2CH₂). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 175.8 (CO), 150.3 (C), 146.9 (C), 136.5 (C), 136.0 (C), 133.4 (C), 132.8 (C), 126.9 (C), 126.2 (C), 125.5 (C), 119.3 (C), 115.4 (C), 112.7 (C), 54.3 (2C, 2CH₂), 50.1 (C_{3'}); 30.0 (C_{2'}), 23.7 (2C, 2CH₂). HPLC: Pureza (92%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 387 [M+H]⁺. Análisis elemental: C₁₉H₂₂N₄O₃S, Teórico: C %: 59.05, H %: 5.74, N %: 14.50, S %: 8.30. Hallado: C %: 59.22, H %: 5.56, N %: 14.71, S %: 8.47.

Sulfuro de 4-cloro-2-nitrofenilo y 2-(pirrolidin-1-il)propionilhidrazinofenilo (41).

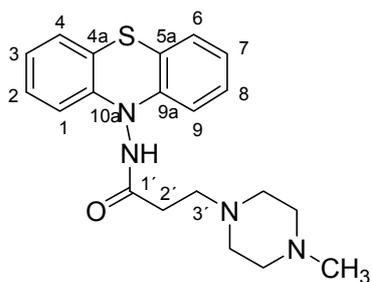
A partir del ácido **33** (0.15 g, 0.55 mmol), PyBop (0.29 g, 0.55 mmol), Et₃N (0.21 mL, 1.52 mmol) y la hidrazina **24** (0.15 g, 0.50 mmol) en DMF (10 mL), y posterior purificación con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.106 g (68%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.36 (d, 1H, *J*=8.6, H₄), 7.48 (dd, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₆), 7.40 (td, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*=1.2 Hz, H₈), 7.16 (dd, 1H, *J*= 8.6 Hz, *J*= 1.7 Hz, H₃), 6.99 (td, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*= 1.2, H₇), 6.83 (dd, 1H, *J*=7.7 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₉), 6.71 (d, 1H, *J*= 1.7 Hz, H₁), 3.46 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H_{3'}), 3.28 (m, 4H, 2CH₂), 2.95 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H_{2'}), 1.96 (m, 4H, 2CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 175.8 (CO), 154.7 (C_{9a}), 146.2 (C_{1a}), 144.8 (C_{4a}), 143.0 (C₆), 137.7 (C₈), 133.1 (C₄), 131.7 (C₃), 130.2 (C₁), 126.4 (C₂), 121.9 (C₇), 118.4 (C₉), 112.7 (C_{5a}), 54.6 (2C, 2CH₂), 50.1 (C_{3'}), 30.8 (C_{2'}), 23.9 (2C, 2CH₂). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 421 [M+H]⁺.

Sulfuro de 2-nitro-4-metoxifenilo y 2-(pirrolidin-1-il)propionilhidrazinofenilo (42).

A partir del ácido **33** (0.14 g, 0.56 mmol), PyBop (0.29 g, 0.56 mmol), Et₃N (0.21 mL, 1.54 mmol) y la hidrazina **25** (0.15 g, 0.51 mmol) en DMF (10 mL), y posterior purificación con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.16 g (57%). ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.72 (d, 1H, *J*=2.5, H₁), 7.48 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.4 Hz, H₆), 7.37 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*=1.4 Hz, H₈), 6.72 (dd, 1H, *J*= 8.8 Hz, *J*= 2.5 Hz, H₃), 6.63 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2, H₇), 6.54 (dd, 1H, *J*=7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₉), 6.37 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, H₄), 3.54 (s, 1H, CH₃), 3.24 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H_{3'}), 3.08 (m, 4H, 2CH₂), 2.75 (t, 2H, *J*= 2.8 Hz, H_{2'}), 1.88 (m, 4H, 2CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 175.8 (CO), 157.0 (C₂), 146.2 (C_{1a}), 145.9 (C_{9a}), 137.8 (C₆), 132.4 (C₄), 128.3 (C₈), 127.7 (C_{4a}), 123.6 (C₃), 121.8 (C₇), 116.7 (C₉), 113.4 (C_{5a}), 109.2 (C₁), 55.3 (C, CH₃), 53.0 (2C, 2CH₂), 49.2 (C_{3'}), 29.1 (C_{2'}), 23.7 (2C, 2CH₂). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 417 [M+H]⁺.

6 Ciclación: Reagrupamiento de Smile. Procedimiento general.

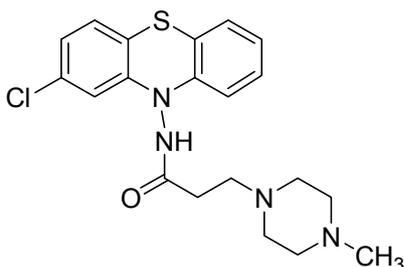
Una solución de la amida correspondiente (0.20 mmol) y K₂CO₃ (0.011 g, 0.20 mmol) en 5 mL de DMF se calentó a reflujo durante 10-15 min. Transcurrido este tiempo se enfrió a temperatura ambiente, se echó gota a gota sobre H₂O y el precipitado formado se filtró, se lavó con H₂O y se secó.

10-[2'-(4-Metilpiperazin-1-il)propionilamino]fenotiazina (43).

Siguiendo el procedimiento general, a partir de **36** (0.096 g, 0.22 mmol), K₂CO₃ (0.012 g, 0.22 mmol), en DMF (5 mL), se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.063 g (77%), de p. f: 176-178 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.17 (s, 1H, NH), 7.6-6.7 (m, 8H, aromáticos), 2.89 (t, 2H, *J*= 5.7 Hz, H_{3'}), 2.71 (t, 2H, *J*=

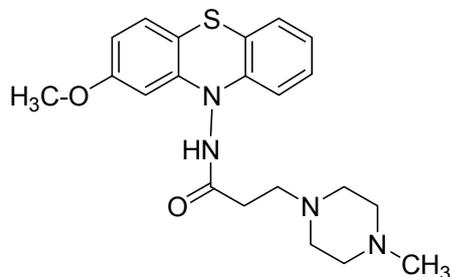
5.7 Hz, H₂), 2.83 – 2.66 (m, 8H, 4CH₂), 2.43 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.2 (CO), 143.0 (2C), 127.27 (2C), 127.12 (2C), 123.71 (2C), 119.6 (2C), 112.94 (2C), 55.4 (C₃'), 54.2 (2C, 2CH₂), 53.6 (2C, 2CH₂), 44.9 (C₂'), 33.9 (C, CH₃). HPLC: Pureza (98%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 368 [M+H]⁺, 390 [M+Na]⁺, 757 [2M+Na]⁺.

2-Cloro-10-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilamino]fenotiazina (44).



Siguiendo el procedimiento general, a partir de **37** (0.20 g, 0.42 mmol), K₂CO₃ (0.024 g, 0.42 mmol), en DMF (5mL), se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.15g (91%), de p. f: 187-189 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.26 (s, 1H, NH), 7.12 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₈), 7.09 (d, 1H, *J*= 8.2 Hz, H₄), 6.99 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₆), 6.97 (dd, 1H, *J*= 8.2 Hz, *J*= 2.3 Hz, H₃), 6.93 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₇), 6.78 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₉), 6.74 (d, 1H, *J*= 2.3 Hz, H₁), 3.61 (t, 2H, *J*= 5.7 Hz, H₃'), 2.48 (t, 2H, *J*= 5.7 Hz, H₂'), 2.76 – 2.59 (m, 8H, 4CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.5 (CO), 144.7 (C_{10a}), 142.9 (C_{9a}), 133.6 (C₂), 128.1 (C₈, C₄), 127.5 (C₆), 124.9 (C₇), 123.8 (C₃), 120.4 (C_{5a}), 119.4 (C_{4a}), 113.8 (C₉), 113.4 (C₁), 54.4 (C₃'), 54.1 (2C, 2CH₂), 53.9 (2C, 2CH₂), 45.8 (C), 32.0 (C₂'). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 403 [M+H]⁺, 405 [M+2H]⁺, 428 [M+Na]⁺, 829 [2M+Na].

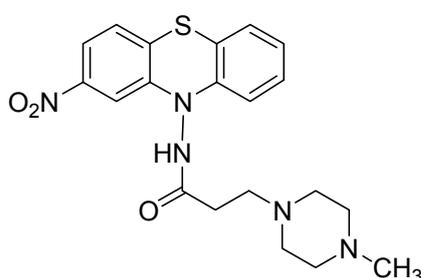
2-Metoxi-10-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilamino]fenotiazina (45).



Siguiendo el procedimiento general, a partir de **38** (0.20 g, 0.46 mmol), K₂CO₃ (0.025 g, 0.46 mmol), en DMF (5mL), se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.14 g (79%), de p. f: 201-203 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.53 (s, 1H, NH), 7.01 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₈), 6.87 (d, 1H, *J*= 8.2 Hz, H₄), 6.86 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₆), 6.83 (dd, 1H, *J*= 8.2 Hz, *J*= 2.3 Hz, H₃), 6.71 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₇), 6.62 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.1

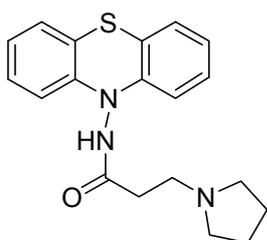
Hz, H₉), 6.60 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H₁), 3.86 (s, 3H, CH₃), 3.67 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H₃'), 2.49 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H₂'), 2.56 – 2.72 (m, 8H, 2CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.9 (CO), 153.1 (C₂), 145.4 (C_{10a}), 143.2 (C_{9a}), 128.9 (C₄, C₈), 127.8 (C₆), 125.5 (C₇), 124.3 (C₃), 120.9 (C_{5a}), 120.2 (C_{4a}), 114.6 (C₉), 114.3 (C₁), 56.4 (C, CH₃), 55.7 (C₃'), 54.5 (2C, 2CH₂), 54.5 (2C, 2CH₂), 44.2 (C, CH₃), 32.6 (C₂'). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 399$ [M+H]⁺, 421 [M+Na]⁺, 817 [2M+Na]⁺.

2-Nitro-10-[2'-(4-metilpiperazin-1-il)propionilamino]fenotiazina (46).



Siguiendo el procedimiento general, a partir de **39** (0.093 g, 0.20 mmol), K₂CO₃ (0.011 g, 0.20 mmol), en DMF (5mL), se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.078 g (93%), de p. f: 191-193 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 10.49 (s, 1H, NH), 7.68 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₈), 7.61 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H₄), 7.42 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₆), 7.21 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H₃), 7.20 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₇), 7.16 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₉), 6.97 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H₁), 3.65 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H₃'), 2.50 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H₂'), 2.55 – 2.73 (m, 8H, 4CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 168.4 (CO), 144.3 (C_{10a}), 142.1 (C_{9a}), 140.5 (C₂), 127.8 (C₈, C₄), 126.6 (C₆), 123.8 (C₇), 122.9 (C₃), 117.7 (C_{5a}), 117.2 (C_{4a}), 113.7 (C₉), 113.1 (C₁), 54.8 (C₃'), 54.7 (2C, 2CH₂), 54.5 (2C, 2CH₂), 45.6 (C, CH₃), 32.2 (C₂'). HPLC: Pureza (98%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 414$ [M+H]⁺, 437 [M+Na]⁺, 849 [2M+Na]⁺.

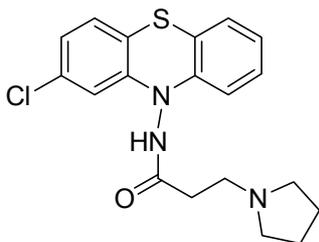
10-[2'-(Pirrolidin-1-il)propionilamino]fenotiazina (47).



Siguiendo el procedimiento general, a partir de **40** (0.10 g, 0.26 mmol), K₂CO₃ (0.014 g, 0.26 mmol), en DMF (5mL), se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.058g (66%), de p. f: 194-196 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.26 (s, 1H, NH), 7.7-6.5 (m, 8H, aromáticos), 2.93 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H₃'), 2.75 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H₂'), 2.72 (m, 4H, 2CH₂), 1.96 (m, 4H, 2CH₂). ¹³C-RMN (125 MHz,

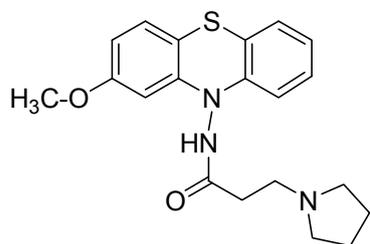
CDCl₃), δ (ppm): 168.7 (CO), 145.1 (C), 143.5 (C), 132.7 (C), 127.9 (2C), 126.3 (C), 123.1 (C), 122.4 (C), 117.8 (C), 117.6 (C), 114.5 (C), 113.5 (C), 55.7 (C_{3'}), 54.3 (2C, 2CH₂), 45.1 (C_{2'}), 24.4 (2C, 2CH₂). HPLC: Pureza (97%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 340$ [M+H]⁺, 362 [M+Na]⁺, 701 [2M+Na]⁺.

2-Cloro-10-[2'-(pirrolidin-1-il)propionilamino]fenotiazina (48).



Siguiendo el procedimiento general, a partir de **41** (0.10 g, 0.26 mmol), K₂CO₃ (0.014 g, 0.26 mmol), en DMF (5mL), se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.106g (68%), de p. f: 185-187 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.43 (s, 1H, NH), 7.13 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₈), 7.08 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H₄), 6.71 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₆), 6.98 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H₃), 6.93 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₇), 6.75 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₉), 6.70 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H₁), 3.63 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H_{3'}), 2.56 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H_{2'}), 2.83 (m, 4H, 2CH₂), 1.82 (m, 4H, 2CH₂). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.5 (CO), 145.3 (C_{10a}), 143.6 (C_{9a}), 134.1 (C₈), 128.3 (C₂, C₄), 127.6 (C₆), 124.2 (C₇), 123.9 (C₃), 119.8 (C_{5a}), 119.1 (C_{4a}), 113.7 (C₉), 113.2 (C₁), 54.6 (C_{3'}), 55.0 (2C, 2CH₂), 32.6 (C_{2'}), 25.0 (2C, 2CH₂). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 375$ [M+H]⁺, 397 [M+Na]⁺, 771 [2M+Na]⁺.

2-Metoxi-10-[2'-(pirrolidin-1-il)propionilamino]fenotiazina (49).



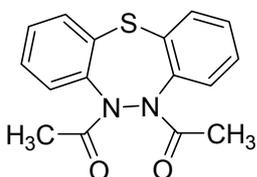
Siguiendo el procedimiento general, a partir de **42** (0.10 g, 0.24 mmol), K₂CO₃ (0.011 g, 0.24 mmol), en DMF (5mL), se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.061 g (69%), de p. f: 179-181 °C. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.61 (s, 1H, NH), 7.13 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₈), 6.91 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H₄), 6.88 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₆), 6.80 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H₃), 6.75 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₇), 6.66 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₉), 6.61 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H₁), 3.83 (s, 3H, CH₃), 3.67 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H_{3'}), 2.54 (t, 2H, $J = 5.7$ Hz, H_{2'}), 2.82 (m, 4H, 2CH₂), 1.83 (m, 4H,

2CH₂). ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.1 (CO), 153.7 (C_{10a}), 145.8 (C_{9a}), 143.5 (C₂), 129.3 (C₈, C₄), 127.9 (C₆), 126.0 (C₇), 124.7 (C₃), 120.2 (C_{5a}), 119.6 (C_{4a}), 115.3 (C₉), 114.1 (C₁), 56.1 (C, CH₃), 54.5 (C_{3'}), 53.6 (2C, 2CH₂), 32.8 (C_{2'}), 24.5 (2C, 2CH₂). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 370 [M+H]^+$, $392 [M+Na]^+$, $761 [2M+Na]^+$.

4. Serie dibenzotiadiazepinas.

4.1. Dibenzotiadiazepinas presentes en la quimiotéca.

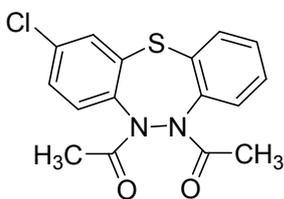
1,4,5-(5,6-Diacetil-5,6-dihidrodibenzo[b,f]tiadiazepina (50).



El compuesto se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de hexano : AcOEt (5 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.4$ se aisló **50** como un sólido blanco de p.f: 187-189 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.48-7.29 (m, 7H, aromáticos), 2.18 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.4 (COCH₃), 168.3 (COCH₃), 133.8 (C), 132.1 (C), 130.2 (C), 128.9 (C), 128.7 (C), 128.5 (C), 128.1 (2C), 127.5 (C), 126.6 (C), 126.3 (C), 125.8 (C), 22.7 (CH₃), 22.3 (CH₃). HPLC: Pureza (95%). Método A: 50/50. EM: $m/z = 299 [M+H]^+$, $321 [M+Na]^+$, $319 [2M+Na]^+$.

1,4,5-(2-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidrodibenzo[b,f]tiadiazepina (51).



El compuesto se purificó mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de hexano : AcOEt (4 : 1). De las fracciones de $R_f = 0.5$ se aisló **51** como un sólido blanco de p.f: 195-197 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.58-7.32 (m, 7H, aromáticos), 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.11 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.3 (COCH₃), 168.4 (COCH₃), 140.4 (C), 135.6 (C), 134.4 (C), 131.3 (C), 130.2 (C), 129.4 (C), 128.9 (2C), 128.5 (C),

127.3 (C), 126.7 (C), 126.0 (C), 22.5 (CH₃), 22.3 (CH₃). HPLC: Pureza (100%). Método A: 50/50. EM: $m/z = 333 [M+H]^+$, $335 [M+2H]^+$, $355 [M+Na]^+$, $687 [2M+Na]^+$.

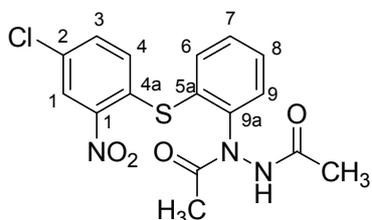
4.2. Síntesis de dibenzotiadiazepinas.

La síntesis de estos derivados se llevó a cabo empleando como producto de partida las hidrazinas (**24-27**), obtenidas en el capítulo anterior.

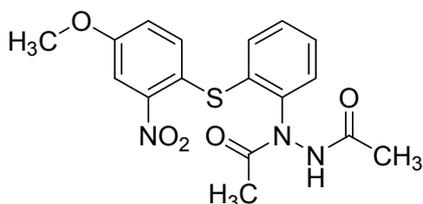
1 Acoplamiento de hidrazinas con cloruros de ácido. Procedimiento general.

Se preparó una solución de la hidrazina (0.65 mmol) correspondiente en THF (5 mL), después se añadió gota a gota el cloruro de acetilo (0.093 mL, 1.30 mmol), y se dejó 3 h a reflujo y toda la noche a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente a sequedad a presión reducida obteniéndose un residuo que fue purificado mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente el indicado en cada caso.

Sulfuro de 4-cloro-2-nitrofenilo y 2-(*N,N'*-diacetilhidrazino)fenilo (**52**).



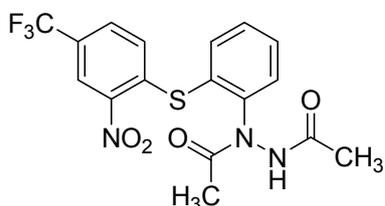
A partir de la hidrazina **24** (0.3 g, 1.07 mmol) y cloruro de acetilo (0.14 g, 2.01 mmol), y posterior purificación utilizando la mezcla de eluyentes Hex:AcOEt (5:1) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.26g (67%), de p. f: 96-98. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.17 (d, 1H, $J=8.6$, H₄), 7.46 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₆), 7.41 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₈), 7.22 (dd, 1H, $J=8.6$ Hz, $J=1.7$ Hz, H₃), 6.95 (td, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$, H₇), 6.87 (dd, 1H, $J=7.7$ Hz, $J=1.2$ Hz, H₉), 6.71 (d, 1H, $J=1.7$ Hz, H₁), 2.08 (s, 1H, CH₃), 1.96 (s, 1H, CH₃). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.3 (CO), 168.6 (CO), 154.4 (C_{9a}), 146.3 (C_{1a}), 144.7 (C_{4a}), 143.1 (C₆), 137.9 (C₈), 132.5 (C₄), 131.0 (C₃), 130.8 (C₁), 125.1 (C₂), 121.9 (C₇), 118.3 (C₉), 112.6 (C_{5a}), 21.6 (C, CH₃), 20.4 (C, CH₃). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 380 [M+H]^+$, $402 [M+Na]^+$, $781 [2M+Na]^+$.

Sulfuro de 4-metoxi-2-nitrofenilo y 2-(N,N'-diacetilhidrazino)fenilo (53).

A partir de la hidrazina **25** (0.3 g, 1.03 mmol), y cloruro de acetilo (0.14 mL, 2.06 mmol), y posterior purificación utilizando la mezcla de eluyentes Hex:AcOEt (5:1) se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.23 g (59%), de p. f: 156-158 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.54 (d, 1H, *J*=2.5, H₁), 7.32 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.4 Hz, H₆), 7.27 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*=1.4 Hz, H₈), 6.67 (dd, 1H, *J*= 8.8 Hz, *J*= 2.5 Hz, H₃), 6.63 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2, H₇), 6.57 (dd, 1H, *J*=7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₉), 6.51 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz, H₄), 3.50 (s, 1H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃), 1.97 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.3 (CO), 168.7 (CO), 157.0 (C₂), 145.6 (C_{1a}), 145.2 (C_{9a}), 136.5 (C₆), 131.2 (C₄), 127.9 (C₈), 127.1 (C_{4a}), 122.8 (C₃), 121.3 (C₇), 115.4 (C₉), 114.0 (C_{5a}), 108.9 (C₁), 56.7 (C, CH₃), 20.7 (2C, 2CH₃). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 376 [M+H]⁺, 398 [M+Na]⁺.

Sulfuro de 2,4-dinitrofenilo y 2-(N,N'-diacetilhidrazino)fenilo (54).

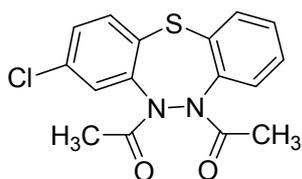
A partir del compuesto **26** (0.2 g, 0.62 mmol) y cloruro de acetilo (0.093 mL, 1.30 mmol), y posterior purificación utilizando la mezcla de eluyentes Hex:AcOEt (9:1) y se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.15 g (61%), de p. f: 188-190 °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.76 (d, 1H, *J*=2.5, H₁), 8.16 (dd, 1H, *J*= 8.9 Hz, *J*= 2.5 Hz, H₃), 7.38 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*=1.2 Hz, H₈), 7.22 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₉), 6.95 (d, 1H, *J*= 8.9 Hz, H₄), 6.82 (dd, 1H, *J*=7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₆), 6.74 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₇), 2.00 (s, 6H, 2CH₃). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 172.3 (CO), 169.8 (CO), 149.8 (C_{9a}), 148.4 (C₂), 146.6 (C_{1a}), 144.8 (C_{4a}), 137.2 (C₄), 135.6 (C₆), 128.5 (C₃), 124.7 (C₈), 121.5 (C₁), 120.7 (C₇), 116.4 (C₉), 113.7 (C_{5a}), 23.8 (2C, 2CH₃). HPLC: Pureza (94%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 391 [M+H]⁺.

Sulfuro de 2-nitro-4-trifluorometilfenilo y 2-(*N,N'*-diacetilhidrazino)fenilo (55).

A partir del compuesto **27** (2 g, 6.07 mmol), y cloruro de acetilo (0.86 mL, 12.10 mmol), y posterior purificación utilizando la mezcla de eluyentes Hex:AcOEt (10:1), se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 1.72g (69%), de p. f. °C. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.63 (dd, 1H, *J*= 8.5, *J*= 1.7, H₃), 6.58 (dd, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*= 1.5 Hz, H₆), 6.24 (td, 1H, *J*= 7.6 Hz, *J*=1.5 Hz, H₈), 6.12 (s, 1H, H₁), 5.97 (d, 1H, *J*= 8.5 Hz, H₄), 5.71 (td, 1H, *J*= 7.7 Hz, *J*= 1.1 Hz, H₇), 5.69 (dd, 1H, *J*= 7.5 Hz, *J*= 1.2 Hz, H₉), 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.9 (CO), 170.8 (CO), 150.2 (C_{9a}), 145.4 (C_{1a}), 143.1 (C_{4a}), 138.4 (C₄), 131.6 (C₆), 130.5 (*J*= 3.3 Hz, C₃), 129.1 (*J*= 34.4 Hz, C₂), 124.7 (C₈), 123.0 (*J*= 4.8 Hz, C₁), 122.6 (*J*= 266 Hz, C_{2a}), 120.3 (C₇), 116.0 (C₉), 112.4 (C_{5a}), 25.8 (C, CH₃), 20.7 (C, CH₃). HPLC: Pureza (96%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 414 [M+H]⁺, 436 [M+Na]⁺.

2 Ciclación: Reagrupamiento de smile. Procedimiento general.

Se preparó una solución de la *N,N'*-diacetilhidrazina correspondiente (**52-55**, 0.100 g, 0.26 mmol) y K₂CO₃ (0.035 g, 0.26 mmol) en 5 mL de DMF, calentándose a reflujo durante 10-15 min. Transcurrido este tiempo se enfrió a temperatura ambiente, se echó gota a gota sobre agua y el precipitado formado se filtró, se lavó con H₂O y se secó.

1,4,5-(3-Cloro-5,6-diacetil-5,6-dihidrodibenzo[*b,f*]tiadiazepina (56).

A partir de **52** (0.10 g, 2.26 mmol) y K₂CO₃ (0.036 g, 2.26 mmol) en 5 mL DMF, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.081 (92%), de p.f: 119-121 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.85-7.31 (m, 7H, aromáticos), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.3

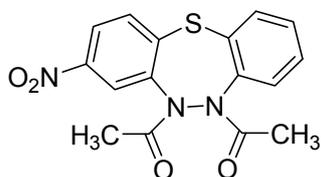
(COCH₃), 169.7 (COCH₃), 144.4 (C), 141.3 (C), 135.2 (C), 133.4 (C), 132.8 (C), 131.5 (C), 130.3 (C), 130.0 (C), 127.4 (C), 126.6 (C), 123.7 (C), 120.4 (C), 24.2 (CH₃), 22.1 (CH₃). HPLC: Pureza (100%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 333 [M+H]^+$.

1,4,5-(3-Metoxi-5,6-diacetil-5,6-dihidrodibenzo[b,f])tiadiazepina (57).



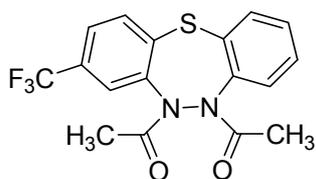
A partir del compuesto **53** (0.10 g, 2.26 mmol) y K₂CO₃ (0.037 g, 2.26 mmol) en 5 mL DMF, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.076 (87%), de p.f: 99-101 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.51-7.19 (m, 7H, aromáticos), 3.78 (s, 3H, CH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃), 2.13 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.5 (COCH₃), 169.1 (COCH₃), 160.3 (C), 145.2 (C), 143.8 (C), 133.4 (C), 132.3 (C), 131.6 (C), 130.5 (C), 129.8 (C), 126.4 (C), 126.1 (C), 110.9 (C), 105.2 (C), 56.4 (C, CH₃), 21.6 (CH₃), 20.9 (CH₃). HPLC: Pureza (97%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 329 [M+H]^+$.

1,4,5-(3-Nitro-5,6-diacetil-5,6-dihidrodibenzo[b,f])tiadiazepina (58).



A partir del compuesto **54** (0.10 g, 2.26 mmol) y K₂CO₃ (0.035 g, 2.26 mmol) en 5 mL DMF, se obtuvo un sólido amarillo con un rendimiento: 0.063 (71%), de p. f: 111-113 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.42-6.86 (m, 7H, aromáticos), 2.25 (s, 3H, CH₃), 2.01 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.8 (COCH₃), 169.5 (COCH₃), 151.4 (C), 144.4 (C), 141.6 (C), 133.1 (C), 132.7 (C), 131.7 (C), 130.8 (C), 130.2 (C), 127.9 (C), 126.8 (C), 123.5 (C), 116.5 (C), 21.6 (CH₃), 20.9 (CH₃). HPLC: Pureza (95%). Método B: 95/5. EM: $m/z = 344 [M+H]^+$, 366 [M+Na]^+.

1,4,5-(3-Trifluorometil-5,6-diacetil-5,6-dihidrodibenzo[b,f])tiadiazepina (59).

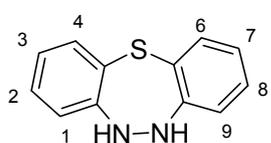


A partir del compuesto **55** (0.10 g, 2.42 mmol) y K₂CO₃ (0.033 g, 2.42 mmol) en 5 mL DMF, se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.053 (59%), de p.f: 125-127 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.69-6.93 (m, 7H,

aromáticos), 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.06 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.8 (COCH₃), 169.5 (COCH₃), 143.6 (C), 141.2 (C), 132.9 (C), 131.8 (C), 131.1 (C), 130.5 (C), 129.7 (C), 128.1 (C), 127.4 (C), 126.2 (C), 124.7 (C), 123.3 (C), 119.6 (C), 21.6 (CH₃), 20.9 (CH₃). HPLC: Pureza (99%). Método B: 95/5. EM: *m/z* = 367 [M+H]⁺.

3 Síntesis del sistema heterocíclico base.

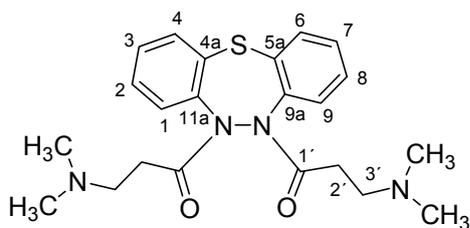
1,4,5-(5,6-dihidro)dibenzo[b,f]tiadiazepina (60).



Se preparó una solución de hidróxido potásico (0.17 g, 3.03 mmol) en EtOH (4mL) y sobre ésta se añadió el compuesto **50** (0.3 g, 1.02 mmol), manteniéndose a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 4h. El sólido formado se filtró, se lavó con EtOH, y se secó. Rendimiento: 0.200 (90%), de p.f: 121-123 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.50 (dd, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₄, H₆), 7.39 (td, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₂, H₈), 7.33 (dd, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₃, H₇), 7.21 (td, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₁, H₉), 4.20 (s, 2H, 2NH). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 151.6 (C), 150.0 (C), 135.5 (C), 132.4 (C), 131.8 (C), 131.2 (C), 130.2 (C), 129.9 (C), 129.5 (C), 129.3 (C), 128.7 (C), 127.6 (C). HPLC: Pureza (97%). Método A: 50/50. EM: *m/z* = 215 [M+H]⁺, 237 [M+Na]⁺.

4 Reacción de la dibenzotiadiazepina **59** con ácidos. Procedimiento general.

Bajo atmósfera de nitrógeno, sobre una solución de PyBOP (0.53 g, 1.02 mmol) y el ácido correspondiente (**32-34**, 1.02 mmol) en 10 mL de DMF anhidra se adiciono Et₃N (0.32 mL, 2.30 mmol), dejandolo a temperatura ambiente durante 15 min. Despues se adiciono la dibenzotiadiazepina **59**, manteniéndose a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente a sequedad a presión reducida obteniéndose un residuo que fue purificado mediante columna de cromatografía a presión sobre gel de sílice empleando como eluyente el indicado en cada caso.

1,4,5-[5,6-dihidro-5,6-bis(2'-dimetilaminopropionil)]dibenzo[b,f]tiadiazepina (61).

A partir del ácido **34** (0.14 g, 1.02 mmol), PyBop (0.53 g, 1.02 mmol), Et₃N (0.23 mL, 2.30 mmol) y compuesto **60** (0.10 g, 0.46 mmol) en DMF (10mL) y posterior purificación con Hex/AcOEt (4:1) se obtuvo un sólido blanco con un

rendimiento: 0.125 g (58%), de p. f: 138-140 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.58 (dd, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₄, H₆); 7.44 (td, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₂, H₈); 7.38 (dd, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₃, H₇); 7.27 (td, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₁, H₉); 3.20 (t, 4H, *J*= 2.8 Hz, H_{3'}); 2.78 (t, 4H, *J*= 2.8 Hz, H_{2'}); 2.68 (s, 12H, 4CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.6 (2CO); 152.3 (C); 151.6 (C); 136.4 (C); 133.7 (C); 132.7 (C); 131.9 (C); 130.0 (C); 129.5 (C); 129.2 (C); 129.0 (C); 128.6 (C); 127.9 (C); 52.6 (2C, C_{3'}); 40.1 (2C, C_{2'}); 27.3 (4C, 4CH₃). HPLC: Pureza (95%). Método B:95/5. EM: *m/z* = 365 [M+H]⁺.

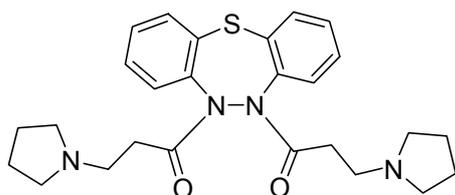
1,4,5-[5,6-dihidro-5,6-bis[2'-(piperidin-1-il)propionil]]dibenzo[b,f]tiadiazepina (62).

A partir del ácido **33** (0.16g, 1.02 mmol), PyBop (0.53 g, 1.02 mmol), Et₃N (0.32 mL, 2.33 mmol) y compuesto **60** (0.10 g, 0.46 mmol) en DMF (10mL) y posterior purificación con Hex/AcOEt (4:1) se obtuvo

un sólido blanco con un rendimiento: 0.142 g (62%), de p. f.: 151-153 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.62 (dd, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₄, H₆), 7.48 (td, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₂, H₈), 7.41 (dd, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₃, H₇), 7.33 (td, 2H, *J*=8.5 Hz, *J*=1.9 Hz, H₁, H₉), 3.41 (m, 8H, 4CH₂), 3.24 (t, 4H, *J*= 2.8 Hz, H_{3'}), 2.96 (t, 4H, *J*= 2.8, H_{2'}), 1.99 (m, 12H, 6CH₂). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.6 (2CO), 152.7 (C), 151.2 (C), 136.7 (C), 133.8 (C), 132.4 (C), 131.9 (C), 130.7 (C),

130.3 (C), 129.8 (C), 129.6 (C), 129.1 (C), 127.9 (C), 54.6 (4C, 4CH₂), 52.8 (2C, C_{3'}), 29.3 (2C, C_{2'}), 23.7 (4C, 4CH₂), 22.4 (2C, 2CH₂). HPLC: Pureza (100%). Método B:95/5. EM: $m/z = 493 [M+H]^+$.

1,4,5-[5,6-dihidro-5,6-bis[2'-(pirrolidin-1-il)propionil]]dibenzo[b,f]tiadiazepina (63).

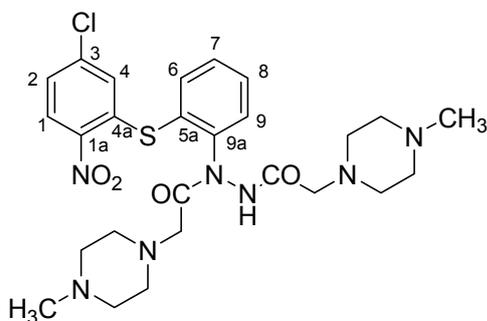


A partir del ácido **32** (0.12 g, 1.02 mmol), PyBop (0.53 g, 1.02 mmol), Et₃N (0.32 mL, 2.33 mmol) y compuesto **60** (0.10 g, 0.46 mmol) en DMF (10mL) y posterior purificación con Hex/AcOEt (4:1) se obtuvo un sólido blanco

con un rendimiento: 0.136 g (70%), de p. f: 149-149 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.53 (dd, 2H, $J=8.5$ Hz, $J=1.9$ Hz, H₄, H₆), 7.41 (td, 2H, $J=8.5$ Hz, $J=1.9$ Hz, H₂, H₈), 7.37 (dd, 2H, $J=8.5$ Hz, $J=1.9$ Hz, H₃, H₇), 7.24 (td, 2H, $J=8.5$ Hz, $J=1.9$ Hz, H₁, H₉), 3.25 (t, 4H, $J=2.8$ Hz, H_{3'}), 3.16 (m, 8H, 4CH₂), 2.84 (t, 4H, $J=2.8$ Hz, H_{2'}), 1.88 (m, 8H, 4CH₂). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.6 (2CO), 151.9 (C), 150.4 (C), 135.7 (C), 132.8 (C), 132.0 (C), 131.5 (C), 130.4 (C), 130.2 (C), 129.7 (C), 129.5 (C), 129.1 (C), 127.9 (C), 53.6 (4C, 4CH₂), 49.8 (2C, C_{3'}), 30.7 (2C, C_{2'}), 23.9 (4C, 4CH₂). HPLC: Pureza (100%). Método B:95/5. EM: $m/z = 413 [M+H]^+$.

4.3 Intermedios presentes en la quimioteca.

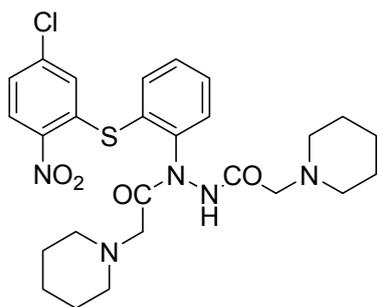
Sulfuro de 4-cloro-2-nitrofenilo y 2-[N,N'-bis(4-metilpiperazin-1-il)acetil]hidrazinofenilo (64).



El compuesto **64** era un sólido blanco que permanecía puro y no hubo necesidad de purificarlo. P.f: 118-120 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.92 (s, 1H, NH), 8.23 (d, 1H, $J=8.9$ Hz, H₉), 7.70 (dd, 1H, $J=8.9$ Hz, $J=1.5$ Hz, H₈), 7.54 (m, 2H, H₄, H₂), 7.19 (m, 2H, H₃, H₁), 6.72 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H₆), 3.15 (s, 2H, CH₂N), 3.05 (s, 2H, CH₂NH), 2.22-2.59 (m, 16H, 8CH₂), 2.18 (s, 6H, 2CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

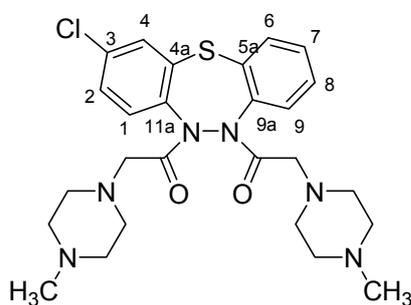
170.4 (CONH), 168.4 (CON), 144.3 (C₇), 141.2 (C_{9a}), 139.3 (C_{1a}), 138.4 (C_{5a}), 132.6 (C₆), 132.1 (C₄), 131.9 (C₈), 130.2 (C₂), 128.1 (C₉), 127.2 (C₃), 126.8 (C₁), 125.8 (C_{4a}), 60.7 (CH₂NH), 59.9 (CH₂N), 54,7 (2C, 2CH₂), 54,5 (2C, 2CH₂), 45,6 (C). HPLC: Pureza (100%). Método B:95/5. EM: $m/z = 576 [M]^+$, $578 [M+2H]^+$.

Sulfuro de 4-cloro-2-nitrofenilo y 2-[N,N'-bis(piperidin-1-il)acetil]hidrazinofenilo (65).



El compuesto **65** era un sólido blanco que permanecía puro y no hubo necesidad de purificarlo. P.f: 119-122 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.33 (s, 1H, NH), 7.72 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.0$ Hz, H₉), 7.60 (m, 3H, H₈, H₇, H₄), 7.50 (td, 1H, $J = 8.06$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H₂), 7.15 (m, 2H, H₃, H₁), 3.23 (s, 2H, CH₂N), 3.06 (s, 2H, CH₂NH), 2.65 (m, 8H, 4CH₂), 1.67 (m, 8H, 4CH₂), 1.56 (m, 4H, 2CH₂). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.0 (CONH), 168.4 (CON), 141.1 (C_{9a}), 140.3 (C_{1a}), 132.6 (C₆), 132.5 (C₇), 130.3 (C₄), 129.9 (C₈), 129.3 (C₂), 128.8 (C_{5a}), 122.1 (C₃), 126.1 (C₉), 121.4 (C₁), 121.3 (C_{4a}), 60.9 (CH₂NH), 59.0 (CH₂N), 55.7 (4C, 4CH₂), 26.2 (4C, 4CH₂), 23.5 (2C, 2CH₃). HPLC: Pureza (98 %). Método B:95/5. EM: $m/z = 546 [M]^+$, $548 [M+2H]^+$.

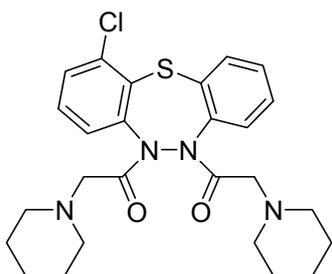
1,4,5-[2-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[(4-metilpiperazin-1-il)acetil]]dibenzo[b,f]tiadiazepina (66).



Seguendo el procedimiento general **2** a partir del compuesto **64** (0.10 g, 1.73 mmol) y K₂CO₃ (0.023 g, 1.73 mmol) en 5 mL DMF. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.061 (66 %), de p.f: 174-176 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.26 (m, 2H, H₆, H₄), 7.11 (m, 2H, H₈, H₂), 6.77 (td, 1H, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₇), 7.52 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H₉), 6.40 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, H₁), 3.32 (s, 4H, 2CH), 2.22-2.59 (m, 16H, 8CH₂), 2.18 (s, 6H, 2CH₃). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.6 (2CO), 143.3 (C_{9a}), 141.2 (C_{1a}), 133.6 (C₃), 131.4 (C₄), 130.6 (C₆), 128.8 (2C, C₂, C₈), 126.8 (C₇), 124.1 (C₁), 123.7 (C_{4a}), 122.2 (C₉),

120.6 (C_{5a}), 58.3 (2C, 2CH₂), 54,7 (2C, 2CH₂), 54,5 (2C, 2CH₂), 45,6 (2C, 2CH₃).
HPLC: Pureza (100%). Método B:95/5. EM: $m/z = 529 [M]^+$, $531 [M+2H]^+$.

1,4,5-[1-Cloro-5,6-dihidro-5,6-bis[(piperidin-1-il-1-il)acetil]]dibenzo[b,f]tiadiazepina (67).



Siguiendo el procedimiento general **2** a partir del compuesto **65** (0.10 g, 1.83 mmol) y K₂CO₃ (0.025 g, 1.83 mmol) en 5 mL DMF. Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento: 0.047 (49 %) y de p.f: 180-182 °C. ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.14 (dd, 1H, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H₆), 6.88 (m, 2H, H₂, H₈), 6.50 (m, 3H, H₉, H₇, H₃), 6.37 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.0$ Hz, H₁), 3.32 (s, 4H, 2CH), 2.65 (m, 8H, 4CH₂), 1.67 (m, 8H, 4CH₂), 1.56 (m, 4H, 2CH₂). ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 169.6 (2CO), 144.9 (C_{1a}), 143.5 (C_{9a}), 133.6 (C₄), 131.6 (C₆), 130.6 (C₉), 128.9 (C₂), 127.7 (C₈), 126.1 (C_{4a}), 125.3 (C₇, C₃), 121.0 (C_{5a}), 120.5 (C₁), 58.3 (2C, 2CH₂), 55.7 (4C, 4CH₂), 26.2 (4C, 4CH₂), 23.5 (2C, 2CH₃). HPLC: Pureza (100%). Método B:95/5. EM: $m/z = 499 [M]^+$, $501 [M+2H]^+$.

5. Parte experimental farmacológica.

5.1. Materiales y métodos.

5.1.1. Materiales, soluciones y fármacos.

El DMEM (“Dulbecco-Modified Eagle Medium”), el suero bovino fetal y las placas de cultivo de 96 y 48 pocillos se obtuvieron de GIBCO (Madrid).

El DTNB, butirilticolina y BuChE, (para la medición de la actividad antibutirilcolinesterásica), acetilcolina y AChE (para la actividad antiacetilcolinesterásica), nimodipino, nifedipino, fenotiazina y trolox son comerciales y se han adquirido en Sigma (Madrid).

El DMEM es un medio sintético especialmente preparado para medios de cultivo. Además de los componentes iónicos habituales (*Tabla 20*) Comprobar numeración, posee aminoácidos esenciales y vitaminas para favorecer el mantenimiento de las células en cultivo. Previamente a su utilización en los cultivos celulares, se le añade antibióticos y suero bovino fetal. El DMEM posee un colorante, el rojo fenol, que sirve como indicador de pH. Así, en condiciones normales (pH neutro), es de color rojo, y cuando se acidifica el medio, porque las células están lesionadas o existe contaminación bacteriana, cambia a color anaranjado, lo que nos sirve como un “indicador grosero” de la calidad del cultivo antes de empezar cada experimento además de la observación al

	Krebs-HEPES	DMEM
NaCl	144	109.4
KCl	5.9	5.4
MgCl₂	1.2	-
MgSO₄	-	0.8
CaCl₂	1	1.8
NaHCO₃	-	26.2
NaH₂PO₄	-	0.9
FeNO₃	-	0.00036
Glucosa	11	5.6
Piruvato sódico	-	1
HEPES	10	10
aminoácidos	-	+
vitaminas	-	+
pH	7.4	7.4

microscopio de las células.

En la *Tabla 24* aparece la composición de las soluciones utilizadas ajustadas a pH 7.4.

Tabla 24. *Composición de las soluciones de Krebs y DMEM (mM), utilizadas en esta Memoria. En la solución de Krebs-HEPES se puede modificar la concentración de CaCl₂, en función de las necesidades del experimento.*

En los experimentos, en los que se usaron soluciones despolarizantes de K^+ se ajustaron a pH 7.4.

Los fármacos hidrosolubles, se disolvieron directamente en agua; los fármacos liposolubles se disolvieron en DMSO. Las soluciones madre se prepararon a una concentración de 10^{-2} M y se conservaron a -20°C . A partir de éstas, se prepararon a diario soluciones más diluidas en DMEM.

La sonda fluorescente Fluo-4 y la DCFDA se disolvieron inicialmente en DMSO, y posteriormente, se diluyeron en solución de Krebs HEPES, a la que se adicionó ácido plurónico, para evitar la formación de micelas y facilitar así la disolución de la sonda en medio acuoso.

5.1.2. Modelos celulares de estudio *in vitro*, células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

Origen y mantenimiento del cultivo celular.

Las células de neuroblastoma humano de la línea SH-SY5Y fueron amablemente facilitadas por el Dr. Hugo Geerts del Departamento de Fisiología Celular de la “Janssen Research Foundation” en Beerse, Bélgica.

Las células SH-SY5Y se mantuvieron en cultivo en monocapa en una botella de 75 cm^2 con tapón ventilado (Iwaki). El medio de cultivo utilizado fue DMEM con alta concentración de glucosa (4500 mg/L) (GIBCO-Invitrogen), enriquecido con un 10% de suero bovino fetal (GIBCO-Invitrogen), 2 mM de L-Glutamina (GIBCO-Invitrogen), aminoácidos no esenciales (en g/L: 8,9 Ala, 13,2 Asn, 13,3 Asp, 14,7 Glu, 7,5 Gly, 11,5 Pro y 10,5 Ser; GIBCO-Invitrogen). Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37°C , con una atmósfera de aire (95%) y CO_2 (5%), saturada de humedad. El medio de cultivo se sustituyó cada dos días por medio de cultivo fresco, y cuando las células estaban alcanzando la confluencia (70-80%) se realizó un pase añadiendo

tripsina-EDTA, para despegar las células de la superficie de cultivo y dividir el número total de células en varias placas de cultivo.

Para su almacenamiento y conservación, las células se congelaron en N₂ líquido a -173°C en suero bovino fetal con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

5.2. Procedimientos Experimentales.

5.2.1 Inhibición de las enzimas AChE y BuChE.

Las medidas de inhibición de colinesterasas se realizaron siguiendo el método de Ellman, en el Instituto de Química Médica. La solución de ensayo estaba formada por tampón fosfato 0,1 M a pH = 8, ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico 200 µM (DTNB, reactivo de Ellman), las enzimas acetilcolinesterasa o butirilcolinesterasa y yoduros de acetiltiocolina o de butiriltiocolina (400 µM) como sustratos de las reacciones enzimáticas. Los compuestos a evaluar se preincubaron con la enzima durante 10 minutos a 30 °C, se añadió el sustrato y se midieron los cambios de absorbancia a 412 nm cada 5 minutos en un espectrómetro UV/VIS Perkin Elmer 550 SE. Se compararon las velocidades de reacción y se calcularon los porcentajes de inhibición debidos a la presencia de los compuestos que se analizaban. El valor de CI₅₀ se define como la concentración de compuesto que reduce en un 50% la actividad enzimática.

5.2.2. Determinación de la viabilidad celular. Medida de la actividad LDH.

Cuantificamos la actividad enzimática de la láctico deshidrogenasa (LDH) liberada a la solución de incubación como marcador general del daño celular. La LDH es una enzima citoplasmática estable que, ante un daño en la membrana celular, sale al medio externo. De esta forma, podemos realizar una medida indirecta del estado del cultivo, comparando la actividad de la LDH liberada en el medio extracelular (LDHe) con respecto a la suma de la LDH intracelular, que permanece en las células viables, más la LDH liberada al medio extracelular, que consideramos como LDH total (LDHt). Este

segundo parámetro, lo obtenemos sustituyendo el medio de cultivo por otro medio con Tritón X-100 al 1% durante 30 min, para asegurar la liberación total de la LDH que permanecía en las células no dañadas.

La valoración de esta enzima se ha realizado mediante un kit comercial (Cytotoxicity detection kit-LDH; Roche). Para ello, las células se sembraron en placas de plástico estériles de 48 pocillos (1×10^5 células/pocillo en el caso de líneas celulares), y se mantuvieron en el incubador durante 24 h antes de iniciar el experimento, tiempo suficiente para facilitar la adhesión de las células a la superficie de cultivo. Posteriormente, siguiendo el protocolo, se expusieron a los diferentes tratamientos. Las muestras se analizaron espectrofotométricamente en un lector de placas (Labsystems iEMS Reader MF), empleando el filtro adecuado (490 nm), obteniendo los valores de absorbancia mediante el programa DeltaSOFTII Versión 3,71 EMS.

Con el fin de normalizar todos los resultados siguiendo un mismo patrón, consideramos la liberación de LDHe inducida por cada uno de los estímulos tóxicos utilizados en cada uno de los experimentos individuales, con respecto a la LDH total considerada como el 100% de lesión.

$$\%LDH_{liberada} = \frac{LDHe(\text{compuesto} + \text{estimulo tóxico})}{LDHe + LDHi(\text{compuesto} + \text{estimulo toxico})} \times 100$$

El calculo del % de protección de cada uno de los derivados se llevó a cabo de la siguiente manera: en cada experimento individual, la LDH obtenida en células no tratadas (basal) se sustrajo de la LDH liberada tras el tratamiento con el estímulo tóxico y normalizada al 100%. Este valor se sustrajo del 100.

$$\%Pr\ otección = 100 - \left(\frac{\%LDHi(\text{compuesto}) - \%LDHi(\text{basal})}{\%LDHi(\text{estimulo toxico}) - \%LDHi(\text{basal})} \right) \times 100$$

5.2.3. Captación de peróxido de hidrógeno.

Para la medida del peróxido de hidrógeno celular se usó 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) como sonda fluorescente. El protocolo consistió en sembrar las células a una densidad de 1×10^5 células por pocillo en placas de 48 pocillos, y mantenerlas durante 24 horas en el incubador. A continuación, se cargaron las células

con 10 μ M de DCFH-DA, se incubaron durante unos 45 minutos y, seguidamente, se añadió el tóxico rotenona más oligomicina A (30:10 μ M), mezcla que induce la formación de radicales, más el compuesto a las concentraciones más neuroprotectoras durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se despegaron las células, se centrifugaron a 800 r.p.m durante 10 min, y el pellet se resuspendió en Kres Hepes con la sonda a una concentración de 10 μ M y a continuación se midió la fluorescencia en un citómetro de flujo (Cytomics FC 500 MPL de la firma Beckman Coulter, 2 láseres: azul (488 nm) y rojo (633 nm), 5 PMT para fluorescencias con un rango de 185 a 900 nm).

5.2.4. Determinación de la concentración de calcio citosólico libre.

Para determinar la $[Ca^{2+}]_c$ se utilizó la sonda fluorescente Fluo-4/AM, derivado del quelante de calcio BAPTA unido covalentemente a fluoresceína, que al unirse al Ca^{2+} emite fluorescencia. Este marcador fluorescente puede atravesar la membrana celular, en forma de éster de acetoximetilo (fluo-4/AM), entrando en las células, donde las esterasas endógenas hidrolizan el acetometilester transformándolo en la forma ácida de fluo-4, que queda atrapado en el citosol.

Las células SH-SY5Y sembradas en placas opacas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^6 , se incubaron en oscuridad durante 40 min a 37 °C en una solución Krebs-HEPES que contenía fluo-4/AM (10 mM), ácido plurónico F-127 (0,02%) y probenecid (1 mM). El ácido plurónico es un detergente de baja toxicidad que se utiliza para impedir la formación de micelas, y facilitar así, la carga de las células con el fluo-4/AM. El probenecid es un inhibidor del transportador aniónico de la membrana plasmática y su uso reduce la pérdida de la sonda fluorescente.

Una vez finalizada la incubación con la solución de carga, las células se lavaron con Krebs-HEPES conteniendo 1 mM de probenecid y, posteriormente, se mantuvieron 30 min en oscuridad a temperatura ambiente, para permitir la hidrólisis del enlace éster de la sonda por las esterasas intracelulares.

Para cuantificar la fluorescencia emitida por el fluo-4 se utilizó un fluorímetro modelo Fluostar Optima (BMG Labtechnologies). La placa se colocó en este lector de fluorescencia y se determinó la señal basal emitida por la sonda fluo-4 (excitación 485

nm; emisión 520 nm). Posteriormente, se determinó la fluorescencia en las diferentes situaciones experimentales; el protocolo utilizado se especifica al describir los resultados en el correspondiente apartado.

En todos los experimentos con los diferentes tratamientos se comprobó el estado del cultivo celular, aplicando un pulso despolarizante (70 mM de KCl) a un pocillo control. En condiciones normales, la estimulación de las células con concentraciones despolarizantes de K^+ provocó un incremento transitorio en la fluorescencia asociada a la sonda fluo-4 (Figura 55), seguido de una disminución gradual; esta elevación de la $[Ca^{2+}]_c$ en respuesta a la despolarización con K^+ , confirma la presencia en estas células de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, y con una despolarización prolongada, se pone de manifiesto la rápida inactivación de estos canales iónicos.

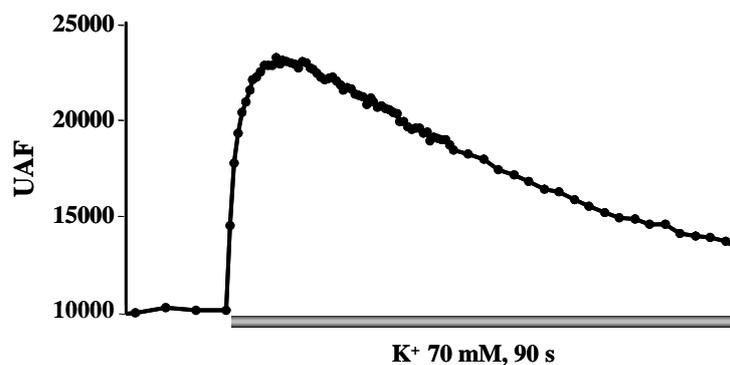


Figura 55. Curso temporal de la variación de la $[Ca^{2+}]_c$, generada por la estimulación con 70 mM de K^+ . La figura muestra un registro representativo de células SH-SY5Y cargadas con la sonda fluorescente fluo-4 y estimuladas con K^+ (70 mM). La señal de fluorescencia se analizó durante 90 s. (UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia, en la ordenada).

En todos los experimentos, normalizamos la señal de fluorescencia de cada pocillo añadiendo al final tritón X-100 (2%), para permeabilizar las células y poner así todo el Ca^{2+} del pocillo en contacto con la sonda, lo que nos permitió registrar el valor de fluorescencia máxima ($F_{m\acute{a}x}$) en cada pocillo. Cuatro min después, se añadió a cada pocillo $MnCl_2$ (75 μ L de una solución 1 M), un agente que extingue la fluorescencia facilitando la relajación del estado excitado al estado normal sin emisión de fluorescencia, lo que permite registrar la fluorescencia del fluo-4 en ausencia de Ca^{2+} , es decir, la fluorescencia mínima (F_{min}). En cada experimento, se valoró el efecto de los diferentes fármacos por triplicado, y los resultados se presentan como el porcentaje de $F-F_0/F_{m\acute{a}x}-F_{min}$, donde F = fluorescencia problema en cada punto y F_0 = fluorescencia

inicial. Para corregir la pérdida de la sonda, en cada experimento reservamos tres pocillos para monitorizar los cambios de fluorescencia a lo largo del tiempo (Fo).

5.2.5. Medida de la capacidad neuroprotectora de los derivados en rodajas de hipocampo.

Estos experimentos se realizaron con ratas Sprague-Dawley procedentes de una colonia del animalario de la facultad de medicina de la UAM. Las ratas se anestesiaron con barbital sódico (69 mg/kg, i.p.). A continuación, se decapitaron y se extrajeron los cerebros que fueron rápidamente sumergidos en una solución Krebs bicarbonato (con alto magnesio y sacarosa y bajo calcio) enfriada previamente y, cuya composición, en mM, es la siguiente: NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 0.5, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 10, KH₂PO₄ 1,18, glucosa 11 y sacarosa 200. Todas las soluciones fueron pre-burbujeadas con 95% O₂/5% CO₂ (carbógeno) o 95% N₂/5% CO₂ (nitrógeno) para mantener la oxigenación o anoxia, respectivamente. Los hipocampos se disecaron rápidamente y se colocaron en un bloque de agar verticalmente, inmerso en una pequeña cámara sumergida en hielo y en Krebs bicarbonato continuamente oxigenado. Con un vibratomo (Leica; Heidenberg, Germany) se cortaron rodajas de 350 micras de espesor.

Inmediatamente, las rodajas del hipocampo se transfirieron a tubos conteniendo la misma solución sin sacarosa, y se burbujearon con carbógeno durante una hora para estabilizarlas (ver cuadro de abajo). En cada experimento individual se evaluaron cinco grupos. Dependiendo del experimento, estos grupos se distribuyeron en tres concentraciones de un compuesto o el agonista, antagonista y agonista más antagonista además del control y del POG (grupo de rodajas sometidas a privación de glucosa y oxígeno sin tratamiento). Las rodajas se preincubaron durante 30 minutos en solución de Krebs normal conteniendo (en mM): NaCl 120, KCl 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, MgSO₄ 1.19, KH₂PO₄ 1.18 y glucosa 11. La privación de glucosa y oxígeno se indujo burbujeadando nitrógeno y sustituyendo la glucosa por 2-desoxiglucosa (ver *Figura 56*). La viabilidad de las rodajas se evaluó midiendo la liberación de la enzima LDH en el líquido extracelular.

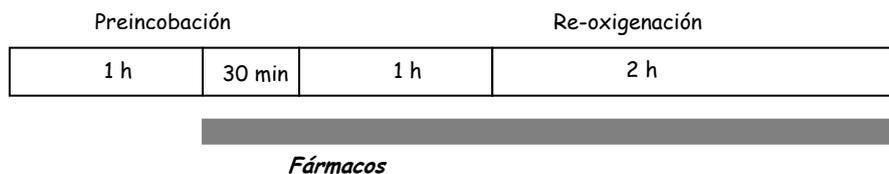


Figura 56. Protocolo experimental de la POG. Las rodajas de hipocampo se sometieron a un periodo de estabilización de 1 hora, seguidos de preincubación de 30 minutos, 1 hora de POG y 2 horas de reoxigenación.

Las rodajas control se mantuvieron burbujeandas con carbógeno durante todo el experimento. Los fármacos se añadieron 30 minutos antes de inducir la POG tal como se indica en la *Figura 55*.

5.2.6. Predicción del paso de la barrera hematoencefálica.

El paso de la barrera hematoencefálica de los compuestos se evaluó empleando un ensayo de permeabilidad a través de una membrana artificial, PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*), siguiendo el procedimiento optimizado previamente en nuestro laboratorio. La microplaca receptora se rellenó con 180 μL por pocillo de una mezcla compuesta por buffer fosfato salino de pH 7.4 (PBS) y EtOH en proporción 90:10. El filtro de la placa donadora se cubrió con 4 μL de una disolución del extracto lipídico de cerebro de cerdo en dodecano (20 mg mL^{-1}). A continuación, se añadieron 180 μL de una disolución PBS:EtOH (90:10) de los compuestos a evaluar sobre la microplaca donadora, que se situó de forma cuidadosa sobre la placa receptora. Después de 120 minutos de incubación a 25°C la placa donadora se separó cuidadosamente y se determinó la concentración de los compuestos en la placa receptora mediante espectroscopía UV. Los resultados se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de tres ensayos independientes conteniendo cada uno de ellos cuatro repeticiones de cada compuesto a analizar.