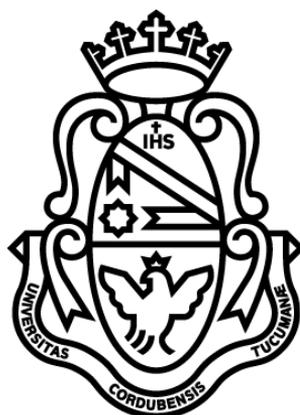


Pirazolotriazinas: Síntesis y Estudio como Inhibidores Enzimáticos

Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas



Licenciada en Química

María Lourdes Sciú



Instituto de Investigaciones en Físico-Química de Córdoba, Dpto. de Química
Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba,
Córdoba, Argentina.

-2017-

Pirazolotriazinas: Síntesis y Estudio como Inhibidores Enzimáticos

Director de Tesis:

Prof. Dra. E. Laura Moyano

Co-director de Tesis:

Prof. Dra. M. Cecilia Carpinella

Comisión Evaluadora de Tesis:

Prof. Dra. Alicia B. Peñeñory

Prof. Dra. M. Rosa Mazzieri

Prof. Dra. Sandra E. Martín

Evaluador externo:

Prof. Dr. Jorge A. Palermo

Resumen de contenidos

Parte I: Introducción y objetivos generales

Capítulo 1: Importancia de los núcleos de azapurinas	1
Capítulo 2: El rol de las enzimas en la Química Medicinal	19
Capítulo 3: Objetivos generales	39

Parte II: Síntesis de azapurinas

Capítulo 4: Síntesis de amino pirazol-carbonitrilos	43
Capítulo 5: Síntesis de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas	77

Parte III: Estudio *in vitro* e *in sílico* de potenciales inhibidores enzimáticos

Capítulo 6: Estudios de inhibición en tirosinasa	129
Capítulo 7: Estudios de inhibición en xantina oxidasa	145
Capítulo 8: Estudios de inhibición en enzimas asociadas a enfermedades neurodegenerativas	171

Parte IV: Conclusiones generales y proyecciones

Capítulo 9: Conclusiones generales y proyecciones	225
---------------------------------------------------	-----

Índice de contenidos

Resumen	ix
<i>Abstract</i>	xiii
Abreviaturas, signos y acrónimos	xvii

Parte I: Introducción y objetivos generales

Capítulo 1: Importancia de los núcleos de azapurinas	1
1.1. Ácidos nucleicos y nucleótidos	3
1.2. Bases nitrogenadas y análogos estructurales de purinas	7
1.3. Importancia biológica de los análogos de purinas	10
1.4. Importancia biológica del núcleo de pirazol, precursor de azapurinas	12
1.5. Referencias bibliográficas	15

Capítulo 2: El rol de las enzimas en la Química Medicinal	19
2.1. La Química Medicinal	21
2.2. Estrategias en la búsqueda de nuevos fármacos	23
2.3. La química computacional en el diseño de fármacos	25
2.4. Las enzimas como <i>targets</i> para el diseño de fármacos	30
2.5. Referencias bibliográficas	38

Capítulo 3: Objetivos generales	39
3.1. Objetivos generales	41

Parte II: Síntesis de azapurinas

Capítulo 4: Síntesis de amino pirazol-carbonitrilos	43
4.1. Introducción	45
4.1.1. Antecedentes de la síntesis de pirazoles	45
4.1.2. La irradiación de microondas como alternativa sintética	50
4.1.2.1. Fundamentos de la irradiación por microondas	52
4.1.2.2. Calentamiento convencional vs. calentamiento por irradiación con microondas	56
4.1.2.3. Equipamiento y métodos disponibles	57
4.2. Objetivos específicos	59
4.3. Resultados y discusión	60
4.3.1. Síntesis de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos	60
4.3.2. Síntesis de 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos	65
4.4. Sección experimental	68
4.4.1. Materiales y métodos generales	68
4.4.2. Procedimiento general para la síntesis de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos 3a-h	69
4.4.3. Procedimiento general para la síntesis de <i>N</i> -aril-hidrazonas 6a-h	70
4.4.4. Procedimiento general para la síntesis de 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos 7a-h	71
4.5. Conclusiones	72
4.6. Referencias bibliográficas	73
Capítulo 5: Síntesis de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas	77
5.1. Introducción	79
5.1.1. Antecedentes de la síntesis de pirazolotriazinas	79

5.2. Objetivos específicos	86
5.3. Resultados y discusión	87
5.3.1. Síntesis de pirazolo[3,4- <i>d</i>][1,2,3]triazin-4-onas	87
5.3.2. Síntesis de pirazolo[4,3- <i>d</i>][1,2,3]triazin-7-carboxilatos	90
5.3.3. Síntesis de pirazolotriazinonas funcionalizadas en el <i>N</i> -3	93
5.3.3.1. Reactividad de azolo[1,2,3]triazinas	93
5.3.3.2. Síntesis de 3-(5-amino-1 <i>H</i> -pirazol-4-carbonil)-3,7-dihidro-4 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>d</i>][1,2,3]triazin-4-onas	97
5.3.3.3. Estudio del mecanismo de reacción para la obtención de 3-(5-amino-1 <i>H</i> -pirazol-4-carbonil)-3,7-dihidro-4 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>d</i>][1,2,3]triazin-4-onas	99
5.4. Sección experimental	118
5.4.1. Materiales y métodos generales	118
5.4.2. Procedimiento general para la síntesis de pirazolo[3,4- <i>d</i>][1,2,3]triazin-4-onas 9b-h y pirazolo[4,3- <i>d</i>][1,2,3]triazin-7-carboxilatos 20a-c,e-g	119
5.4.3. Procedimiento general para la síntesis de 3-(5-amino-pirazol-4-carbonil)-pirazolo[3,4- <i>d</i>][1,2,3]triazin-4-onas 34b-g	119
5.4.4. Síntesis del ácido 5-amino-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-carboxílico 44	120
5.4.5. Síntesis de 5-amino-1-fenil- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-carboxamida 46	120
5.4.6. Síntesis de 5-amino- <i>N</i> -(4-ciano-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-5-il)-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol-4-carboxamida 47	121
5.4.7. Cálculos teóricos	121
5.5. Conclusiones	123
5.6. Referencias bibliográficas	125

Parte III: Estudio *in vitro* e *in silico* de potenciales inhibidores enzimáticos

Capítulo 6: Estudios de inhibición en tirosinasa	129
6.1. Introducción	131
6.1.1. Función y regulación de la enzima tirosinasa	131
6.1.2. Inhibidores de tirosinasa	134
6.2. Objetivos específicos	136
6.3. Resultados y discusión	137
6.3.1. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de tirosinasa	137
6.4. Metodología	139
6.4.1. Ensayos de actividad en tirosinasa	139
6.5. Conclusiones	140
6.6. Referencias bibliográficas	141

Capítulo 7: Estudios de inhibición en xantina oxidasa	145
7.1. Introducción	147
7.1.1. Función y regulación de xantina oxidasa	147
7.1.2. Inhibidores de xantina oxidasa	152
7.2. Objetivos específicos	155
7.3. Resultados y discusión	156
7.3.1. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de xantina oxidasa	156
7.3.2. Estudios de <i>docking</i> de pirazolo[1,2,3]triazinonas en xantina oxidasa	158
7.4. Metodología	164
7.4.1. Ensayos de actividad en xantina oxidasa	164
7.4.2. Simulaciones de <i>docking</i> en xantina oxidasa	165

7.5. Conclusiones	167
7.6. Referencias bibliográficas	169

Capítulo 8: Estudios de inhibición en enzimas asociadas a enfermedades neurodegenerativas **171**

8.1. Introducción	173
8.1.1. Las enfermedades neurodegenerativas	173
8.1.2. La enfermedad de Alzheimer	176
8.1.3. Acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa como dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	179
8.1.4. CK-1 y GSK-3 como dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	182
8.1.4.1. Función, regulación e inhibidores de CK-1	183
8.1.4.2. Función, regulación e inhibidores de GSK-3	185
8.2. Objetivos específicos	191
8.3. Resultados y discusión	192
8.3.1. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de enzimas asociadas a la enfermedad de Alzheimer	192
8.3.1.1. Ensayos de actividad inhibitoria de AChE y BuChE	192
8.3.1.2. Ensayos de actividad inhibitoria de CK-1 y GSK-3	193
8.3.2. Ensayo de permeabilidad en membrana artificial paralela	196
8.3.3. Estudios computacionales de pirazolo[1,2,3]triazinonas frente a GSK-3	199
8.3.3.1. Estudios de <i>docking</i> de pirazolo[1,2,3]triazinonas sobre GSK-3	199
8.3.3.2. Estudio de <i>Hot Spot</i> sobre GSK-3	203
8.3.3.3. Diseño de nuevos compuestos como potenciales inhibidores de GSK-3	206
8.4. Metodología	208
8.4.1. Ensayos de actividad en AChE y BuChE	208

8.4.2. Ensayos de actividad en CK-1 y GSK-3. Ensayos de cinética enzimática en GSK-3	209
8.4.3. Ensayo de permeabilidad en membrana artificial paralela	211
8.4.4. Simulaciones de <i>docking</i> sobre GSK-3	213
8.4.5. Simulaciones de <i>Hot Spot</i> sobre GSK-3	215
8.5. Conclusiones	217
8.6. Referencias bibliográficas	219

Parte IV: Conclusiones generales y proyecciones

Capítulo 9: Conclusiones generales y proyecciones	225
9.1. Conclusiones generales	227
9.2. Proyecciones	230

Anexo- Caracterización de compuestos	xxiii
--------------------------------------	-------

Resumen

En este trabajo de Tesis Doctoral se abordó el estudio teórico-experimental de pirazolo[1,2,3]triazinas.

En una primera instancia, se sintetizaron los precursores 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos y 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos aplicando las metodologías de calentamiento convencional e irradiación por microondas. Los rendimientos obtenidos fueron de moderados a muy buenos en ambos casos. Además, la síntesis asistida por microondas presentó la ventaja de reducir los tiempos de reacción de horas a minutos.

A partir de los amino-pirazol-carbonitrilos, se sintetizaron pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas y pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-4-onas, mediante la diazotación de los compuestos de partida en medio ácido. Los rendimientos obtenidos fueron de buenos a muy buenos para el primer grupo de pirazolotriazinonas, mientras que para la segunda serie fueron moderados.

Adicionalmente, se realizó un estudio teórico y experimental del mecanismo de reacción para la termólisis en benceno a reflujo de los núcleos de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas. Así, se estudió la formación de 3-(5-amino-1*H*-pirazol-4-carbonil)-3,7-dihidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas a nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p) y se intentó comprobar experimentalmente uno de los intermediarios planteados en la reacción de termólisis.

En la segunda parte de esta Tesis Doctoral, se evaluaron los núcleos sintetizados previamente como inhibidores de distintas enzimas. Las dianas estudiadas fueron: tirosinasa, xantina oxidasa (XO) y glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3). Aquellos compuestos que resultaron activos se estudiaron mediante *docking* molecular, para determinar su modo de unión con la proteína, y así describir las interacciones más importantes ligando-receptor.

Entre las series de compuestos evaluados, solo los 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos resultaron inhibidores de tirosinasa, con valores de IC_{50} en el rango de micromolar y milimolar ($IC_{50} = 320-3242 \mu M$). Algunos de ellos presentaron valores de inhibición próximos al inhibidor de referencia, el ácido kójico.

Por otro lado, derivados de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas y pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-4-onas mostraron ser buenos inhibidores de XO, con actividades en el orden de micromolar y submicromolar ($IC_{50} = 0,9-8,5 \mu M$). Las simulaciones de *docking* de dichos compuestos permitieron describir el modo de unión y las principales interacciones con los residuos de la región catalítica de XO para ambas series de compuestos.

Mediante evaluaciones *in vitro*, los compuestos pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-4-onas resultaron ser inhibidores del orden de micromolar a submicromolar (0,8-4,0 μM) de GSK-3, una enzima asociada a la enfermedad de Alzheimer (EA). Además, a través de experimentos de cinética enzimática, se determinó que estos derivados actúan como inhibidores ATP competitivos.

La capacidad de los compuestos activos para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) por difusión pasiva, se evaluó mediante la metodología PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). Como resultado se obtuvo que los compuestos que presentaron una buena inhibición de GSK-3 atravesarían la BHE por difusión pasiva. De esta manera, las pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-4-onas capaces de penetrar la BHE, podrían ser consideradas como candidatos para futuros estudios en modelos *in vivo* para el tratamiento de la EA.

Para complementar los ensayos *in vitro* con estudios de modelado molecular, se determinó el modo de unión ligando-proteína de los núcleos de pirazolotriazinonas activos mediante simulaciones de *docking* y se identificaron las principales interacciones con los residuos

de la GSK-3. Asimismo, se realizó un estudio de *Hot Spot*, en el que se analizó la cavidad del sitio de unión de la proteína en función de las posibles interacciones que se pueden dar entre los residuos existentes y el ligando. La combinación de los resultados de *Hot Spot* con los de *docking* permitió reconocer los fragmentos de la molécula de mayor importancia para la inhibición de GSK-3.

Por último, cabe destacar la importancia de los resultados obtenidos en los diferentes estudios, tanto *in vitro* como *in silico*, que posibilitaron la descripción de un nuevo prototipo de inhibidores de XO y GSK-3. Esto permite generar novedosas modificaciones y optimizaciones estructurales para el diseño de inhibidores más potentes.

Abstract

This PhD thesis covers the theoretical and experimental study of pyrazolo[1,2,3]triazines.

At first, we have focused our work on obtaining the precursors 5-amino-pyrazol-4-carbonitriles and 4-amino-pyrazol-3-carbonitriles. Conventional heating and microwave irradiation were applied for these syntheses and moderate to very good yields were obtained. The use of microwaves proved to be efficient, allowing the formation of the desired product within the range of minutes.

The diazotation of the amino-pyrazole-carbonitriles with sodium nitrite in acid medium, has led to the synthesis of the corresponding pyrazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ones and pyrazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-4-ones, in moderate to good yields. These experimental conditions evidence high efficiency in the formation of the pyrazolotriazine ring from both set of tested pyrazoles.

Thermolysis of pyrazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ones in boiling benzene has also been studied. The formation of 3-(5-amino-1*H*-pyrazol-4-carbonyl)-3,7-dihydro-4*H*-pyrazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ones products was explored with first principles DFT calculations. Additional thermolyses of pyrazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ones with nucleophilic species were carried out to corroborate the presence of one of the intermediates in the thermal reactions.

In a second instance, we have studied the biological activity of all nuclei previously synthesized. Thus, all compounds were evaluated as enzymatic inhibitors of tyrosinase, xantine oxidase (XO) and glycogen synthase kinase 3 (GSK-3), which were selected as targets. Docking studies were performed with those compounds that displayed inhibitory activity to determine their binding mode to the enzyme and describe ligand-receptor main interactions.



Among the evaluated compounds, only the 5-amino-pyrazole-4-carbonitriles showed tyrosinase inhibition, in the micromolar and millimolar range (320-3242 μM). Some of them displayed IC_{50} values close to the reference inhibitor kojic acid.

The pyrazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ones and pyrazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-4-ones have shown XO inhibitory activity with IC_{50} values in the micromolar and submicromolar range (0,9-8,5 μM). Docking studies have helped to determine the binding mode of both pyrazolotriazinone scaffolds. Main interactions between catalytic residues of XO and each inhibitor were determined and the differences of inhibition behavior for each compound were established.

Following our efforts to attain purine analogues of biological interest, we have studied the biological activity of both pyrazolotriazines in the inhibition of GSK-3, a target associated with Alzheimer's disease (AD). As a result, only pyrazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-4-ones have showed *in vitro* GSK-3 inhibition in lower micromolar and submicromolar range (0,8-4,0 μM). Also, kinetic experiments have indicated that these compounds act as ATP-competitive inhibitors.

The ability of pyrazolotriazinones to penetrate the blood brain barrier (BBB) by passive diffusion has also been evaluated. For this purpose, a permeability assay based on parallel artificial membrane was applied. Considering these results, compounds displaying low micromolar-submicromolar values of GSK-3 inhibition would be able to pass the BBB. Thus, these derivatives could be considered as potential candidates for further *in vivo* studies for the treatment of AD.

Subsequently, molecular modeling studies have been performed to define the binding mode and main interactions of active compounds with GSK-3. A Hot Spot analysis has been performed to study the enzyme cavity. This method specifically highlights fragment-binding sites and their corresponding pharmacophores. The superposition of the Hot Spot analysis with the docking results have

provided insights about the main molecular fragments for the GSK-3 inhibition and determine a new scaffold for further optimizations for the design of novel inhibitors.

Overall, it is important to highlight that the results obtained in the *in vitro* and *in silico* studies, have made feasible the description of a new scaffold of XO and GSK-3 inhibitors. Therefore, pyrazolotriazines compounds may be considered as new leads for further modifications and structural optimizations for the design of novelty inhibitors.

Abreviaturas, signos y acrónimos

A β	Péptido β - amiloide
Abs	Absorbancia
ACoA	Acetil coenzima-A
ACh	Neurotransmisor acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ADT	<i>AutoDock Tools</i>
Ala (A)	Alanina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANMAT	Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica
APP	Proteína precursora amiloide
Arg (R)	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido aspártico
ATCI	Acetilcolina iodada
ATP	Trifosfato de adenosina
B3LYP	Funcional híbrido, combina el funcional de Becke (B3) y el funcional de correlación de Lee-Yang-Parr (LYP)
BACE	β -secretasa
BHE	Barrera hematoencefálica
BTCl	Butirilcolina iodada
BuChE	Butiril colinesterasa
CADD	<i>Computer assisted drug design</i>

(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterada
CD ₃ CN	Acetonitrilo deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CG-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
ChAT	Acetiltransferasa de colina
ChE	Colinesterasa
CK-1	Casein quinasa 1
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
Cys (C)	Cisteína
DD	<i>Drug discovery</i>
DFT	Teoría del funcional de la densidad
DHI	5,6-dihidroindol
DHICA	ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico
DM	Dinámica molecular
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DTNB	3-carboxi-4-nitrofenildisulfito
EA	Enfermedad de Alzheimer
EC	<i>Enzyme commission number</i>
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
Et ₃ N	Trietilamina
EtOH	Etanol
FAD	Flavín adenin dinucleótido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GA	<i>Genetic Algorithm</i>

GDP	Guanosín trifosfato
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido glutámico
Gly (G)	Glicina
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GSK-3	Glucógeno sintasa quinasa 3
GTP	Guanosín trifosfato
His (H)	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
ICAQ	Ácido indol-2-carboxílico-5,6-quinona
Ile (I)	Isoleucina
IQ	Indol-5,6-quinona
IR	Espectroscopía Infrarroja
IRC	Coordenadas intrínsecas de reacción
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
J	Constante de acoplamiento en RMN
LBVS	<i>Ligand-based virtual screening</i>
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
MAOS	<i>Microwave assisted organic synthesis</i>
Met (M)	Metionina
MO	Microondas
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NFTs	Ovillos neurofibrilares

NT	Nucléotido
OMS	Organización mundial de la salud
OPLS	Campo de fuerza <i>Optimized Potentials for Liquid Simulations</i>
PAMPA	<i>Parallel artificial membrane permeability assay</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein data bank</i>
PDE5	Fosfodiesterasa 5
Pe	Permeabilidad
Ph	Anillo fenilo
Phe (F)	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
PPO	Polifenoloxidasa
Pro (P)	Prolina
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
QSAR	<i>Quantitive structure activity relationship</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN 2D	Resonancia magnética de dos dimensiones
RMSD	Desviación cuadrática media
SBVS	<i>Structure-based virtual screening</i>
Ser (S)	Serina
SNC	Sistema nervioso central
SOCl ₂	Cloruro de tionilo
T	Temperatura
t	Tiempo
tan δ	Tangente de pérdida dieléctrica
TCI	Tiocolina iodada
TDZD	Tiadiazolidinonas

Thr (T)	Treonina
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TP	<i>Thymidine phosphorylase</i>
Trp (W)	Triptófano
Tyr (Y)	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val (V)	Valina
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VS	<i>Virtual screening</i>
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa
XOR	Xantina oxidoreductasa
ϵ'	Constante dieléctrica de un material
ϵ''	Pérdida dieléctrica de una sustancia
λ	Longitud de onda



PARTE I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

Capítulo 1

IMPORTANCIA DE LOS
NÚCLEOS DE AZAPURINAS

1.1. Ácidos nucleicos y nucleótidos

Los ácidos nucleicos son sustancias del más alto rango biológico que se encuentran en todos los seres vivos. Se caracterizan por ser macromoléculas de carácter ácido formados por polimerización, en cadenas lineales, de unidades estructurales llamados nucleótidos. Los ácidos nucleicos pueden clasificarse en ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).¹

El ADN es el encargado de almacenar la información genética necesaria para la construcción de los componentes de una célula y para la organización, mantenimiento, expresión y regulación de las funciones celulares. Esta información se transmite de generación en generación en el ADN. El ARN, por su parte, cumple diversos roles en el proceso de transcripción de la información genética desde el ADN hacia el citoplasma donde se realiza la síntesis de proteínas. El ARN tiene un papel fundamental en el ensamble correcto de aminoácidos en secuencias definidas en la síntesis de proteínas.¹ El ADN se podría considerar como el depósito de información genética en las células, mientras que el ARN es el encargado de la transcripción y traducción de esta información, que luego se refleja a través de la síntesis proteica.²

Tanto el ADN como el ARN son biopolímeros conteniendo tres tipos de unidades monoméricas: una base nitrogenada derivada de los heterociclos purina o pirimidina, un monosacárido D-ribosa (ARN) o 2-desoxi-d-ribosa (ADN) y ácido fosfórico. Estos tres componentes conforman un nucleótido (NT).² Éstos son la unidad estructural de los ácidos nucleicos y están unidos entre sí por enlaces fosfodiésteres. La estructura general de un NT se muestra en la Figura 1.1. La base nitrogenada está unida al C-1 del monosacárido por un enlace β -glicosídico. El grupo fosfato se une mediante una esterificación con un grupo hidroxilo libre en el extremo 3' o 5' del azúcar.^{1,3}

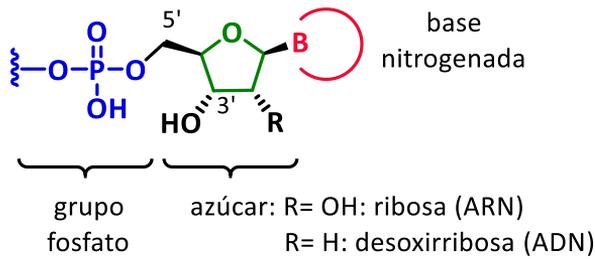


Figura 1.1. Estructura general de un nucleótido.

Como se mencionó anteriormente, cada NT está compuesto por un tipo de monosacárido (aldopentosa), seguido de la base nitrogenada y el grupo fosfato. En la Tabla 1.1 se pueden observar la composición de algunos de los nucleótidos más comunes, su nombre y su abreviatura.¹

Tabla 1.1. Ejemplo de nucleótidos y sus componentes.¹

Base +	Aldopentosa +	Ácido fosfórico =	Nucleótido	Abrev.
Adenina	Ribosa	Ácido fosfórico	adenosina monofosfato	AMP
Adenina	Desoxirribosa	Ácido fosfórico	d-adenosina monofosfato	dAMP
Guanina	Ribosa	Ácido fosfórico	guanosina monofosfato	GMP
Guanina	Desoxirribosa	Ácido fosfórico	d-guanosina monofosfato	dGMP
Citosina	Ribosa	Ácido fosfórico	Citidina monofosfato	CMP
Uracilo	Ribosa	Ácido fosfórico	Uridina monofosfato	UMP

Los nucleótidos se unen entre sí mediante enlaces fosfodiésteres entre el extremo 3' del monosacárido y el grupo fosfato

del NT siguiente formando una cadena lineal. La estructura pentosa-fosfodiéster se repite a lo largo de la cadena, variando la base nitrogenada unida al monosacárido. El orden de las bases nitrogenadas establece la estructura primaria del ADN (o ARN). A modo de ejemplo, en la Figura 1.2 se observa la estructura primaria de una simple hebra de ADN.²

El ARN está formado por una cadena lineal de NT, mientras que el ADN está compuesto por una doble cadena de NT, que son complementarias entre sí. La forma en que se acomoda esta cadena lineal (o doble cadena en el ADN) le confiere la estructura secundaria al ácido nucleico y depende del apareamiento de las bases nitrogenadas que lo componen.²

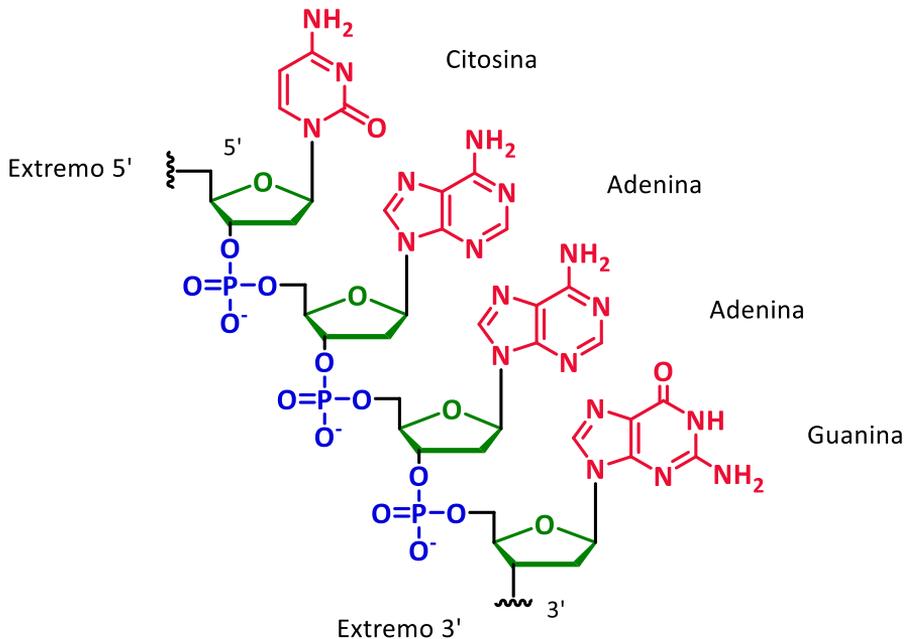


Figura 1.2. Sección de una simple hebra de ADN.²

Las bases nitrogenadas poseen grupos dadores y aceptores de puentes de hidrógeno, lo que les permite unirse entre sí por medio de este tipo de enlaces. El ARN se pliega como resultado de la presencia de regiones cortas con apareamiento intramolecular de bases, es decir, pares de bases formados por secuencias complementarias distantes dentro de la misma hebra. En cambio, la estructura secundaria del ADN corresponde a una doble hélice, producto del apareamiento de bases nitrogenadas entre las dos cadenas de NT (Figura 1.3).²

Las bases nitrogenadas del ADN derivan de dos heterociclos principales, la purina y la pirimidina. Las bases guanina y adenina derivan del núcleo de purina, mientras que la timina y citosina provienen de la pirimidina. Los núcleos de purina y pirimidina son complementarios entre sí, por lo que se aparean formando puentes de hidrógeno para dar lugar a la estructura secundaria del ADN. La adenina es complementaria con la timina y la citosina con la guanina. En la Figura 1.4 se observan los puentes de hidrógeno que se establecen entre los pares de bases complementarios.

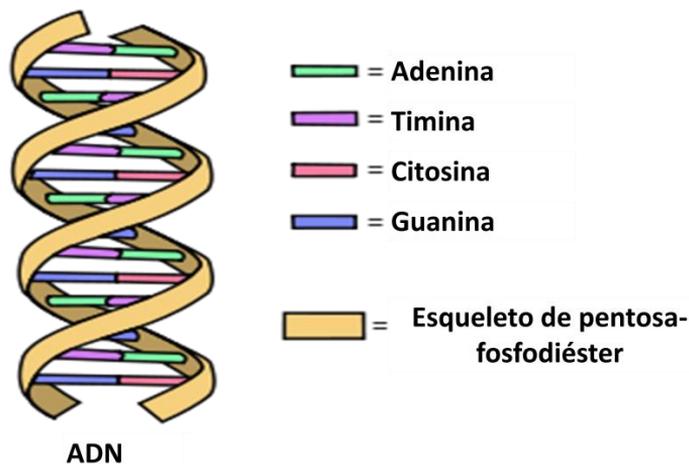


Figura 1.3. Estructura secundaria del ADN, doble hélice.

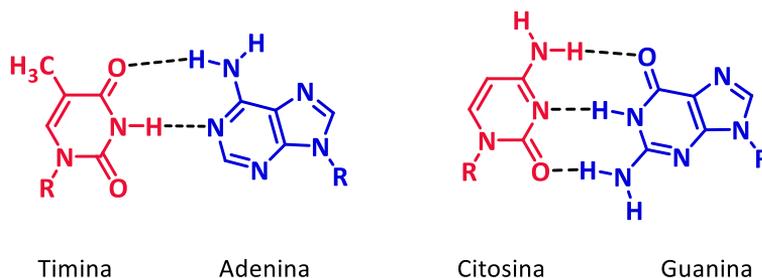


Figura 1.4. Apareamiento de bases complementarias del ADN.

1.2. Bases nitrogenadas y análogos estructurales de purinas

Las bases nitrogenadas son compuestos aromáticos heterocíclicos derivados de los núcleos pirimidina y purina (Figura 1.5).¹ El núcleo de purina es un sistema bicíclico formado por un núcleo de pirimidina fusionado a un anillo de imidazol (imidazo[4,5-*d*]pirimidina), tal como se observa en la Figura 1.5. Las purinas comprenden uno de los sistemas heterocíclicos más ubicuos en la naturaleza, ya que componen la estructura central de numerosos nucleótidos, no sólo los que constituyen a los ácidos nucleicos.⁴

Entre los nucleótidos de purinas más importante se encuentran ATP, GTP, GDP, AMPc, GMPc, AcCoA, NAD, FAD, entre otros. Éstos, actúan como cofactores, sustratos o mediadores en la función de numerosas proteínas y cumplen un papel fundamental en diferentes fases del ciclo celular, en la señalización celular y otros procesos biológicos fundamentales.⁴⁻⁶

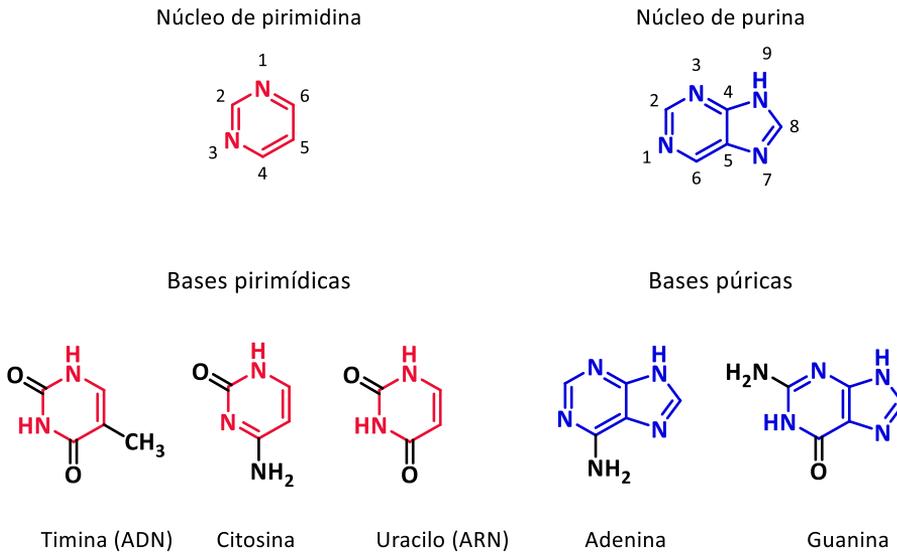
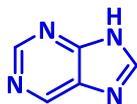


Figura 1.5. Estructuras de las bases nitrogenadas pirimídicas y púricas.

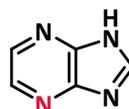
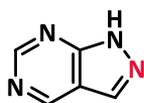
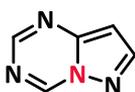
Todas las proteínas involucradas en procesos celulares fundamentales contienen en su estructura regiones de reconocimiento de purinas, ya que utilizan nucleótidos de purinas como sustratos, co-factores o mediadores, para llevar a cabo su función. Teniendo esto en cuenta, numerosos análogos de purinas han sido desarrollados para modular selectivamente o actuar como antagonista de estas enzimas y/o receptores.⁴⁻⁶

Existen diversos análogos estructurales de purinas por modificación del núcleo base. Algunos de ellos se pueden clasificar como azadeapurinas, compuestos donde solo se trasponen los átomos de carbono (C) y nitrógeno (N), deazapurinas, en las cuales se sustituye un N por C, y azapurinas, donde se reemplaza un C por un N. La estructura del núcleo base de purina y dichos análogos estructurales se observan en la Figura 1.6.

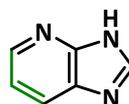
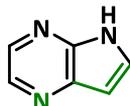
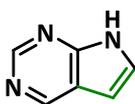
Núcleo de purina



Azadeazapurinas



Deazapurinas



Azapurinas

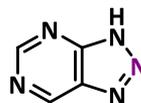
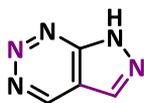
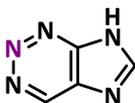


Figura 1.6. Núcleo de purina y algunos análogos estructurales por modificaciones en el núcleo base.

Considerando la gran cantidad de proteínas que contienen regiones de reconocimiento de purinas en su estructura y la amplia variedad de análogos que se pueden generar por modificación del núcleo base de purina, en la Parte II de este trabajo de Tesis Doctoral se aborda la síntesis de azapurinas. Para ello, en el Capítulo 4 se describe la síntesis de familias de amino pirazol carbonitrilos, que serán luego utilizados como precursores para la obtención de una clase de azapurinas, los anillos de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas, a lo largo del Capítulo 5.

1.3. Importancia biológica de los análogos de purinas

Como se mencionó anteriormente, los análogos de purinas se pueden generar por modificaciones estructurales del núcleo base. En los últimos años, se han descrito un gran número de análogos debido a las múltiples propiedades biológicas que presentan. Ejemplo de ellos son las pirazolopirimidinas que se clasifican como azadeazapurinas. Son compuestos donde se traspone un átomo de carbono por un nitrógeno en el anillo de 5 miembros, formando un pirazol en lugar del imidazol presente en las bases púricas. La diferencia entre ambas estructuras se puede observar en la Figura 1.7.

Tanto la síntesis como la bioactividad de las pirazolopirimidinas se han estudiado exhaustivamente. Específicamente, derivados de pirazolo[3,4-*d*]pirimidinas se han descrito como antimicrobianos, antivirales, antitumorales y antiinflamatorios, entre otros.⁷⁻¹⁰

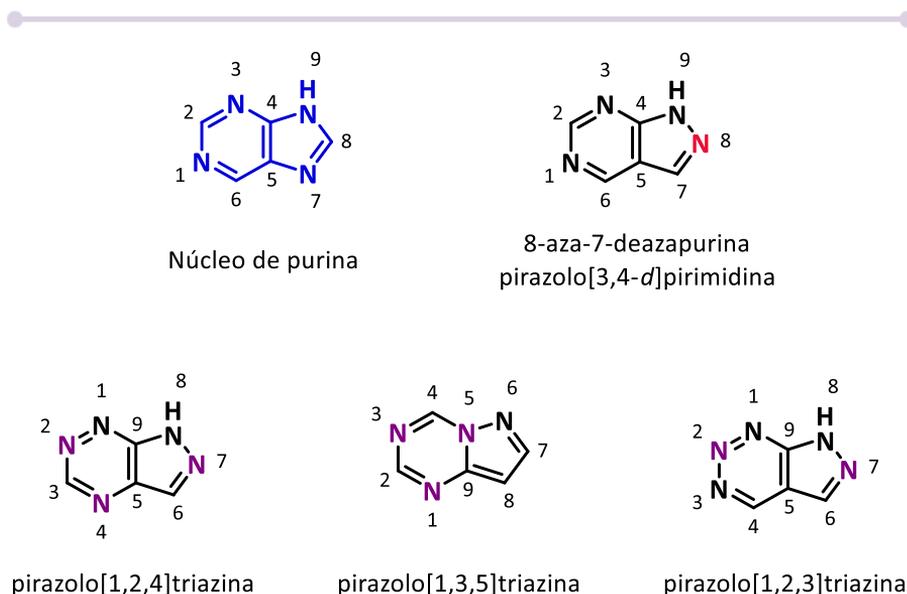


Figura 1.7. Estructuras de pirazolo[3,4-*d*]pirimidina y distintas pirazolotriazinas, ejemplos de análogos de purina.

Otros análogos estructurales de las bases púricas son las pirazolotriazinas, una clase de azapurinas, conteniendo un átomo de N extra en el ciclo de 6 miembros. El anillo de triazina se nombra de acuerdo a las posiciones en que se encuentren estos tres N entre sí (Figura 1.7). De esta forma, se estudiaron diversas familias de pirazolo[1,2,4]triazinas, pirazolo[1,3,5]triazinas, y, en menor medida, de pirazolo[1,2,3]triazinas, con reconocida actividad.

Pirazolo[1,2,4]triazinas se reportaron como agentes antibacterianos,^{11,12} antitumorales,^{13,14} antiinflamatorios,¹⁵ e inhibidores de enzimas como tirosinasa y fosfodiesterasa 5 (PDE5), para el tratamiento de la hipertensión pulmonar y disfunción eréctil.¹⁶ Compuestos del tipo pirazolo[1,3,5]triazinas han sido descritos como antiangiogénicos para el tratamiento del cáncer,¹⁷ antivirales¹⁸ e inhibidores de numerosas enzimas como la quinasa dependiente de ciclina (CDK), xantina oxidasa (XO) y *thymidine phosphorylase* (TP), entre otras.^{5,19} Por su parte, pirazolo[1,2,3]triazinas se reportaron como anticonvulsivantes²⁰ e inhibidores de polifenoloxidasas (PPO), para su empleo como herbicidas.²¹

Actualmente, diversos análogos de purinas se utilizan como fármacos y están disponibles comercialmente (Figura 1.8). Entre ellos se encuentra la Temozolomida²² que es un agente quimioterapéutico, al igual que la Azaguanina, que se utiliza en el tratamiento de la leucemia. El Alopurinol²³ es empleado en el tratamiento de la gota, previniendo la formación de ácido úrico, y los compuestos Sildenafil y Vardenafil son ampliamente utilizados para la disfunción eréctil, mediante la inhibición de la PDE5.²⁴ Por otro lado, Tubercidina, Toyocamicina y Sangivamicina,^{25,26} son análogos de purinas unidos a un monosacárido y funcionan como antimetabolitos, empleándose como antibióticos de amplio espectro.

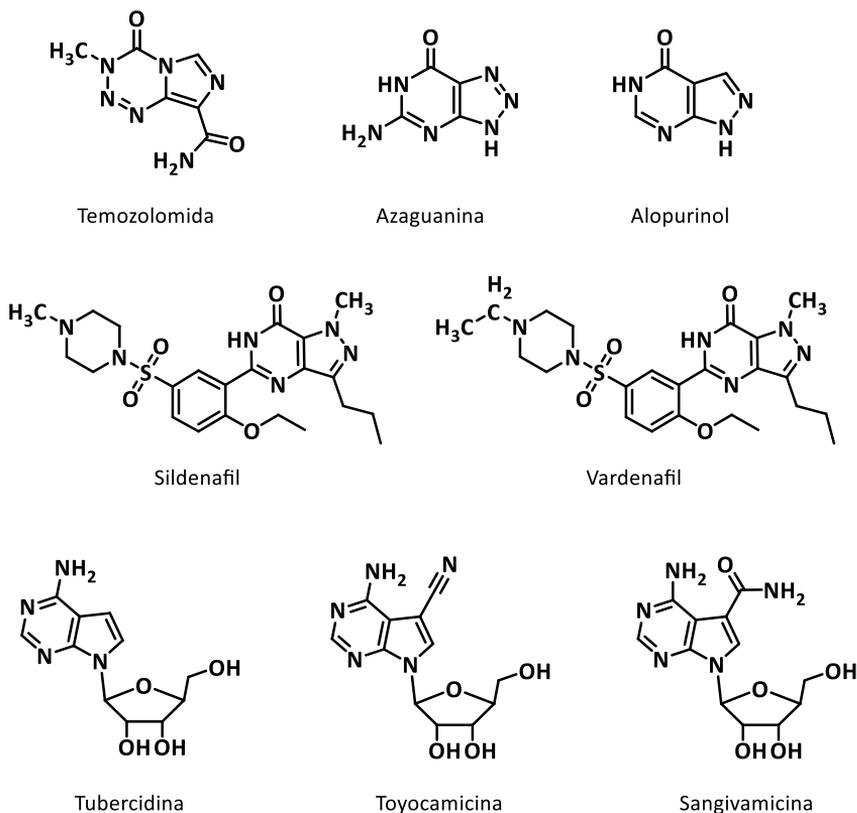


Figura 1.8. Fármacos comerciales análogos de purinas.

1.4. Importancia biológica del núcleo de pirazol, precursor de azapurinas

Los pirazoles son compuestos heterocíclicos aromáticos que contienen un anillo de cinco miembros con dos átomos de nitrógenos adyacentes (Figura 1.9). Éstos pueden ser de origen natural o sintético y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, usualmente como anillos fusionados a otros heterociclos.²⁷

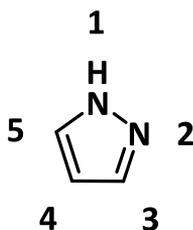


Figura 1.9. Núcleo de *NH* pirazol.

El núcleo de pirazol se ha estudiado exhaustivamente a lo largo de muchos años debido a la vasta funcionalización de su anillo, lo que le confiere diversas propiedades biológicas. Se han descrito diferentes derivados de pirazoles como antibacterianos,^{28–30} antiinflamatorios,^{31–34} analgésicos,^{35–37} antineoplásicos,³⁸ antimaláricos³⁹ y anticonvulsivantes,^{40,41} entre otros. Además, se han utilizado en productos agrícolas y se encuentran en numerosos pesticidas.⁴²

Asimismo, diversos fármacos conteniendo en su estructura un anillo de pirazol han sido aprobados por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos, y Tecnología Médica (ANMAT) y por la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and drug administration*, FDA por sus siglas en inglés). Actualmente, se encuentran disponibles comercialmente, tales como Celecoxib,⁴³ Rimonabant,⁴⁴ y Zaleplon,⁵ entre otros. Celecoxib es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo,⁴³ mientras que Rimonabant se usa para reducir el apetito.⁴⁴ Zaleplon, por su parte, es un análogo de las benzodiazepinas que se utiliza para el tratamiento del insomnio.⁵ Las estructuras químicas de dichos fármacos se muestran en la Figura 1.10.

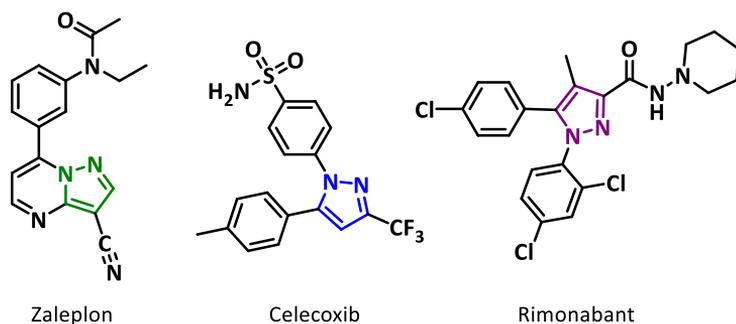


Figura 1.10. Ejemplo de fármacos comerciales conteniendo el núcleo de pirazol.

Los pirazoles presentan diversas actividades biológicas, debido a los distintos sustituyentes presentes en el anillo o a su fusión con otros anillos. Entre los pirazoles funcionalizados, se encuentran los amino-pirazoles, que contienen un grupo amino como sustituyente en alguna posición del anillo de pirazol. Diversos amino-pirazoles se reportaron como antibacterianos,¹¹ antivirales⁴⁵ e inhibidores de xantina oxidasa (XO) para el tratamiento de hiperuricemia,⁴⁶ entre otros. Teniendo esto en cuenta, a lo largo de la Parte II de esta Tesis Doctoral se describe la síntesis de amino pirazol carbonitrilos, que luego se utilizaron como precursores para la obtención de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas.

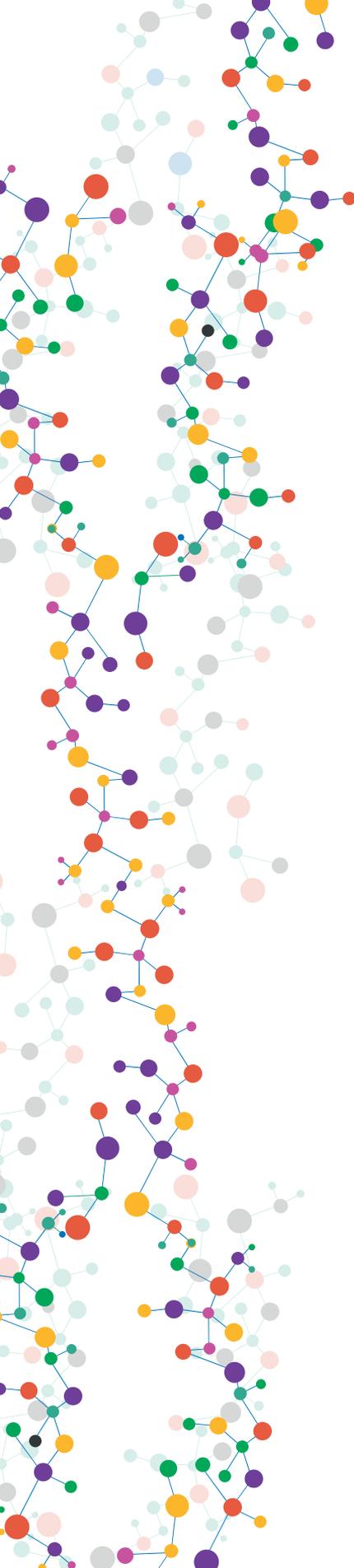
1.5. Referencias bibliográficas

1. Blanco, A. *Química Biológica*. Editorial El Ateneo, Buenos Aires, (2006).
2. Brown, W. H., Foote, C. S., Iverson, B. L., Anslyn, E. V. *Organic Chemistry*. Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont (2012).
3. Cirilo, A. D., Minguillón Llombart, C., Joglart Tamargo, J. *Introducción a la Química Terapéutica*. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, (2004).
4. Legraverend, M. Recent advances in the synthesis of purine derivatives and their precursors. *Tetrahedron* **64**, 8585–8603 (2008).
5. Lim, F. P. L., Dolzhenko, A. V. 1,3,5-Triazine-based analogues of purine: From isosteres to privileged scaffolds in medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* **85**, 371–390 (2014).
6. Legraverend, M., Grierson, D. S. The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 3987–4006 (2006).
7. Sureja, D. K., Vadalia, K. R. Microwave assisted, solvent-free synthesis and *in vitro* antimicrobial screening of some novel pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4(5H)-one derivatives. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **6**, 33–38 (2017).
8. Chauhan, M., Kumar, R. Medicinal attributes of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines: A review. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 5657–5668 (2013).
9. Rashad, A. E., Abdelmegid, M., Shamroukh, A. H., Abdelmegeid, F. M. E. The Chemistry of pyrazolopyrimidines and their applications. *Org. Chem. an Indian J.* **10**, 224–250 (2014).
10. Youssef, A. M., Neeland, E. G., Villanueva, E. B., White, M. S., El-Ashmawy, I. M., Patrick, B., Klegeris, A., Abd-El-Aziz, A. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazole compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 5685–5696 (2010).
11. Al-Adiwish, W. M., Tahir, M. I. M., Siti-noor-Adnalizawati, A., Hashim, S. F., Ibrahim, N., Yaacob, W. A. Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity of new fused pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine and pyrazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazine derivatives from new 5-aminopyrazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **64**, 464–476 (2013).
12. Abdel-rahman, R. M., Angawi, R. F., Al-mehmadi, A. R. Synthesis and biological evaluation of fluorine substituted pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazines as purine analogues. *J. Saudi Chem. Soc.* **21**, 495–503 (2017).
13. Bondock, S., Adel, S., Etman, H. A., Badria, F. A. Synthesis and antitumor evaluation of some new 1,3,4-oxadiazole-based heterocycles. *Eur. J. Med. Chem.* **48**, 192–199 (2012).

14. Metwally, M. A., Gouda, M. A., Harmal, A. N., Khalil, A. M. Synthesis, antitumor, cytotoxic and antioxidant evaluation of some new pyrazolotriazines attached to antipyrine moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **56**, 254–262 (2012).
15. Khoshneviszadeh, M., Ghahremani, M. H., Foroumadi, A., Miri, R., Firuzi, O., Madadkar-Sobhani, A., Edraki, N., Parsa, M., Shafiee, A. Design, synthesis and biological evaluation of novel anti-cytokine 1,2,4-triazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 6708–6717 (2013).
16. Mojzych, M., Dolashki, A., Voelter, W. Synthesis of pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazine sulfonamides, novel Sildenafil analogs with tyrosinase inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 6616–6624 (2014).
17. Bera, H., Ojha, P. K., Tan, B. J., Sun, L., Dolzhenko, A. V., Chui, W.-K., Chee Chiu, G. N. Discovery of mixed type thymidine phosphorylase inhibitors endowed with antiangiogenic properties: Synthesis, pharmacological evaluation and molecular docking study of 2-thioxopyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazin-4-ones. Part II. *Eur. J. Med. Chem.* **78**, 294–303 (2014).
18. Gudmundsson, K. S., Johns, B. A., Weatherhead, J. Pyrazolopyrimidines and pyrazolotriazines with potent activity against herpesviruses. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 5689–5692 (2009).
19. Sun, L., Bera, H., Chui, W. K. Synthesis of pyrazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazine derivatives as inhibitors of thymidine phosphorylase. *Eur. J. Med. Chem.* **65**, 1–11 (2013).
20. Kelley, J. L., Wilson, D. C., Styles, V. L., Soroko, F. E., Cooper, B. R. 7-(2-fluorobenzyl)-4-(substitued)7H-imidazo[4,5-*d*]-1,2,3-triazines and -7H-pyrazolo[3,4-*d*]-1,2,3-triazines. Synthesis and Anticonvulsant Activity. *J. Heterocycl. Chem.* **32**, 1417–1421 (1995).
21. Li, H.-B., Zhu, Y.-Q., Song, X.-W., Hu, F.-Z., Liu, B., Li, Y.-H., Niu, Z.-X., Liu, P., Wang, Z.-H., Song, H.-B., Zou, X.-M., Yang, H.-Z. Novel Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitors: 3H-pyrazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-one Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9535–9542 (2008).
22. Liu, J. K., Patel, J., Eloy, J. A. The role of temozolomide in the treatment of aggressive pituitary tumors. *J. Clin. Neurosci.* **22**, 923–929 (2015).
23. Zhang, T., Li, S., Yuan, W., Wu, Q., Wang, L., Yang, S., Sun, Q., Meng, F. Discovery and biological evaluation of some (1H-1,2,3-triazol-4-yl) methoxybenzaldehyde derivatives containing an anthraquinone moiety as potent xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 729–732 (2017).
24. Sui, Z., Guan, J., Macielag, M. J., Jiang, W., Qiu, Y. Kraft, P., Bhattacharjee, S., John, T. M., Craig, E., Haynes-Johnson, D., Clancy, J.

- Synthesis and Biological Activities of Novel β -Carbolines as PDE5 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 761–765 (2003).
25. Hammond, J. Tubercidin. *Ref. Modul. Biomed. Sci. xPharm Compr. Pharmacol. Ref.* 1–3 (2007).
 26. McCarty, R. M., Bandarian, V. Deciphering Deazapurine Biosynthesis: Pathway for Pyrrolopyrimidine Nucleosides Toyocamycin and Sangivamycin. *Chem. Biol.* **15**, 790–798 (2008).
 27. Kumar, V., Kaur, K., Gupta, G. K., Sharma, A. K. Pyrazole containing natural products: Synthetic preview and biological significance. *Eur. J. Med. Chem.* **69**, 735–753 (2013).
 28. Kumar, V., Aggarwal, R., Tyagi, P., Singh, S. P. Synthesis and antibacterial activity of some new 1-heteroaryl-5-amino-4-phenyl-3-trifluoromethylpyrazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 922–927 (2005).
 29. Mert, S., Kasimogullari, R., Iça, T., Çolak, F., Altun, A., Ok, S. Synthesis, structure-activity relationships, and *in vitro* antibacterial and antifungal activity evaluations of novel pyrazole carboxylic and dicarboxylic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **78**, 86–96 (2014).
 30. Pathak, R. B., Chovatia, P. T., Parekh, H. H. Synthesis, antitubercular and antimicrobial evaluation of 3-(4-chlorophenyl)-4-substituted pyrazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 5129–5133 (2012).
 31. Tewari, A. K., Singh, V. P., Yadav, P., Gupta, G., Singh, A., Goel, R. K., Shinde, P., Mohan, C. G. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors and anti-inflammatory agents. *Bioorg. Chem.* **56**, 8–15 (2014).
 32. Shrivastava, P., Singh, P., Tewari, A. K. Synthesis of pyrazole-based 1,5-diaryl compounds as potent anti-inflammatory agents. *Med. Chem. Res.* **21**, 2465–2475 (2012).
 33. Bekhit, A. A., Abdel-Aziem, T. Design, synthesis and biological evaluation of some pyrazole derivatives as anti-inflammatory-antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 1935–1945 (2004).
 34. Hassan, G. S., Abou-Seri, S. M., Kamel, G., Ali, M. M. Celecoxib analogs bearing benzofuran moiety as cyclooxygenase-2 inhibitors: Design, synthesis and evaluation as potential anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* **76**, 482–493 (2014).
 35. Oruç, E. E., Koçyigit-Kaymakçioğlu, B., Oral, B., Altunbas-Toklu, H. Z., Kabasakal, L., Rollas, S. Synthesis of some novel azo derivatives of 3,5-dimethyl-1-(2-hydroxyethyl) pyrazole as potent analgesic agents. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **339**, 267–272 (2006).
 36. Selvam, T. P., Kumar, P. V., Saravanan, G., Prakash, C. R. Microwave-

- assisted synthesis, characterization and biological activity of novel pyrazole derivatives. *J. Saudi Chem. Soc.* **18**, 1015–1021 (2014).
37. El-Sehemi, A. G., Bondock, S., Ammar, Y. A. Transformations of naproxen into pyrazolecarboxamides: Search for potent anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenic agents. *Med. Chem. Res.* **23**, 827–838 (2014).
 38. Kumar, H., Saini, D., Jain, S., Jain, N. Pyrazole scaffold: A remarkable tool in the development of anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **70**, 248–258 (2013).
 39. Bekhit, A. A., Hymete, A., Asfaw, H., Bekhit, A. E. A. Synthesis and Biological Evaluation of Some Pyrazole Derivatives as Anti-Malarial Agents. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **345**, 147–154 (2012).
 40. Kaushik, D., Khan, S. A., Chawla, G., Kumar, S. N'-[(5-chloro-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene] 2/4-substituted hydrazides: Synthesis and anticonvulsant activity. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 3943–3949 (2010).
 41. Kocyigit-Kaymakcioglu, B., Aker, R. G., Tezcan, K., Sakalli, E., Ketenci, S., Oruç-Emre, E. E., Akin, D. Gurbanova, A., Terzioglu, B., Onat, F., Rollas, S. Anticonvulsant activity of 3,5-dimethylpyrazole derivatives in animal models. *Med. Chem. Res.* **20**, 607–614 (2011).
 42. Li, M., Zhao, B. Progress of the synthesis of condensed pyrazole derivatives (from 2010 to mid-2013). *Eur. J. Med. Chem.* **85**, 311–340 (2014).
 43. Dadiboyena, S., Nefzi, A. Synthesis of functionalized tetrasubstituted pyrazolyl heterocycles- A review. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 5258–5275 (2011).
 44. Nasser, M. A., Salimi, M., Esmaili, A. A. Cellulose sulfuric acid as a bio-supported and efficient solid acid catalyst for synthesis of pyrazoles in aqueous medium. *RSC Adv.* **4**, 61193–61199 (2014).
 45. Rashad, A. E., Hegab, M. I., Abdel-Megeid, R. E., Fathalla, N., Abdel-Megeid, F. M. E. Synthesis and anti-HSV-1 evaluation of some pyrazoles and fused pyrazolopyrimidines. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 3285–3292 (2009).
 46. Gupta, S., Rodrigues, L. M., Esteves, A. P., Oliveira-Campos, A. M. F., Nascimento, M. S. J., Nazareth, N., Cidade, H., Neves, M. P., Fernandes, E., Pinto, M., Cerqueira, N. M. F. S. A., Brás, N. Synthesis of N-aryl-5-amino-4-cyanopyrazole derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 771–780 (2008).



PARTE I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

Capítulo 2

**EL ROL DE LAS ENZIMAS
EN LA QUÍMICA MEDICINAL**

En general, para lograr los objetivos propuestos en la Química Medicinal se requieren tres etapas: ^{1,3}

- Etapa del descubrimiento: consiste en la identificación de nuevos compuestos bioactivos, generalmente llamados cabeza de serie. Estos pueden proceder tanto de la síntesis en química orgánica, como de fuentes naturales o de procesos biotecnológicos.
- Etapa de optimización: consiste en la modificación química de compuestos cabeza de serie con el fin de aumentar su potencia, su selectividad, y/o disminuir su toxicidad.
- Etapa de desarrollo: implica la optimización de procesos que permitan obtener el fármaco en grandes cantidades, además de mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacotécnicas, para que resulten más adecuados para su uso terapéutico.

Las etapas principales para la obtención de un nuevo fármaco se resumen en la Figura 2.2: descubrimiento, desarrollo y comercialización. El proceso de investigación y desarrollo para llegar a la comercialización de un nuevo fármaco requiere de una gran inversión económica y de tiempo, alrededor de 10-15 años de trabajo. ^{4,5}

Existen diferentes enfoques empleados para la búsqueda de nuevos fármacos. Dentro de la etapa de descubrimiento, para la obtención de nuevos compuestos cabeza de serie, se suelen utilizar diversas estrategias, que se detallan a continuación.

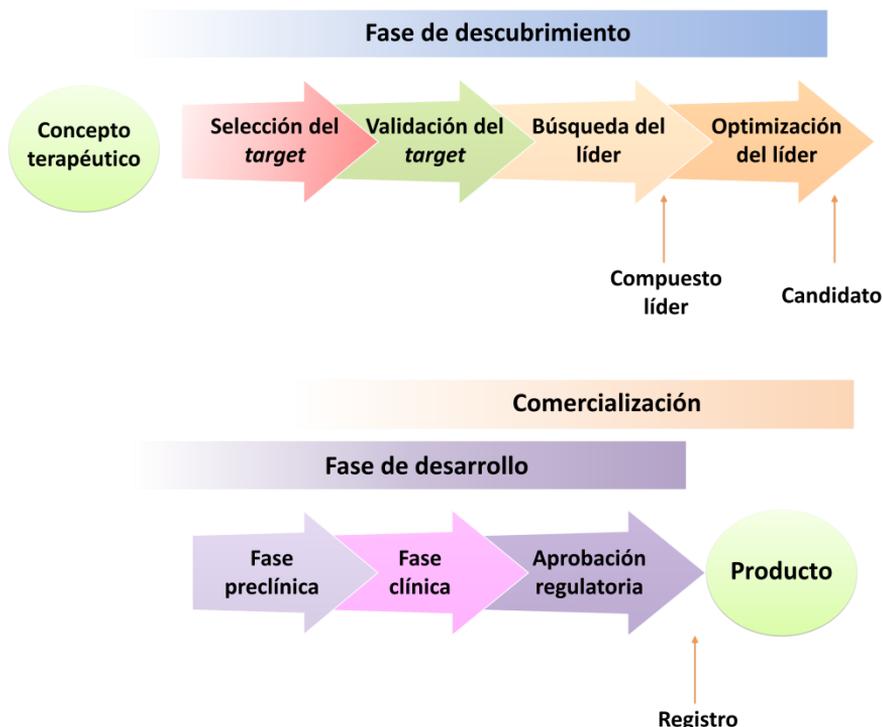


Figura 2.2. Proceso de investigación y desarrollo de un fármaco. Figura adaptada de la referencia 6.

2.2. Estrategias en la búsqueda de nuevos fármacos

La mayoría de los compuestos cabeza de serie encontrados hasta la década de los años setenta procedían de descubrimientos al azar. Sin embargo, con los avances en las distintas áreas de las ciencias que contribuyen al estudio de la Química Medicinal, se han desarrollado diversos métodos que permiten una búsqueda más racional. Entre ellos, se pueden destacar el conocimiento y la regulación de las dianas biológicas, como así también la comprensión de las disfunciones bioquímicas que originan ciertos procesos patológicos.

Dentro de las estrategias utilizadas para el descubrimiento de nuevos fármacos pueden distinguirse cuatro procesos fundamentales:³

- Estudio u observación casual de los efectos biológicos de productos de origen natural o sintético.
- Cribado sistemático (*screening*) de familias de compuestos, generalmente elegidos al azar, en determinados ensayos biológicos: esta estrategia ha sido ampliamente utilizada debido al surgimiento de la química combinatoria, que permite generar quimiotecas de forma rápida, simultánea y eficiente; y a la automatización de los ensayos biológicos, conocido como cribado de alta eficacia o HTS por sus siglas en inglés (*High Throughput Screening*).
- Mejora de los fármacos ya existentes.
- Diseño racional: en general, se basa en el conocimiento de los procesos bioquímicos relacionados con la patología que se pretende combatir, en analogía estructural con un ligando endógeno o en la generación de colecciones de compuestos a partir de una diana terapéutica determinada (*target*). En este sentido, el diseño de fármacos asistido por computadoras (CADD por sus siglas en inglés, *Computer Assisted Drug Design*) constituye una de las estrategias desarrolladas recientemente para tal fin.

En la Figura 2.3 se puede observar algunas de las estrategias mencionadas anteriormente para el descubrimiento de fármacos y ejemplos de medicamentos que se han desarrollado utilizando dichos procesos, tales como Flecainida, Imatinib, Omeprazol, Eritropoyetina y Paclitaxel. Cabe aclarar que el diagrama de la Figura 2.3 muestra diversos ejemplos de las etapas que se pueden seguir para el descubrimiento de un nuevo fármaco, pero no siempre se siguen estos pasos estrictamente, si no que a veces se utiliza una combinación de más de una vía.⁶

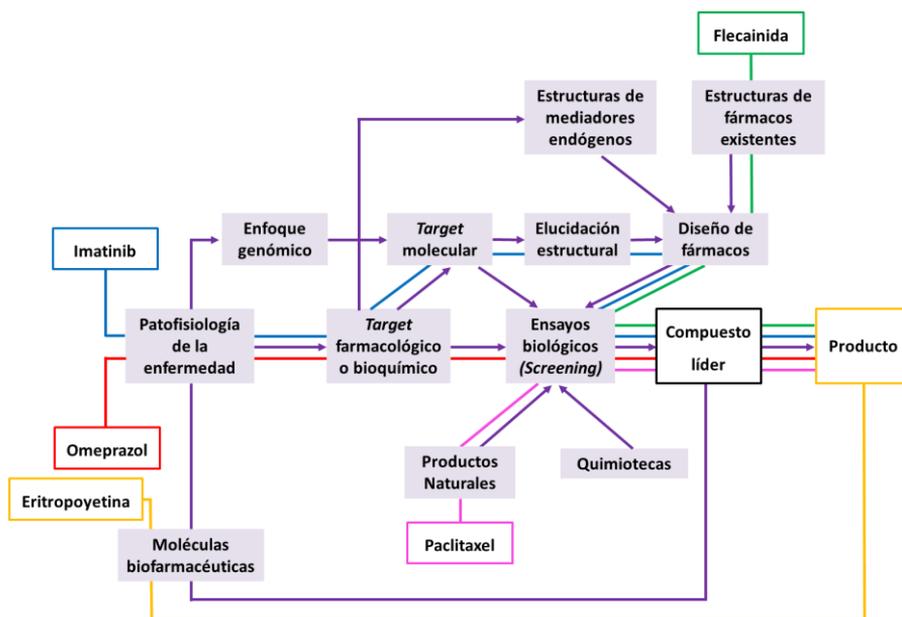


Figura 2.3. Distintas estrategias empleadas para el descubrimiento de fármacos y algunos ejemplos más relevantes de medicamentos desarrollados utilizando estas vías. Figura extraída de la referencia 6.

2.3. La química computacional en el diseño de fármacos

Actualmente, el diseño de fármacos se basa en el estudio de las interacciones entre el compuesto activo y su diana biológica o *target*. Esto se debe al avance de las distintas áreas que contribuyen al estudio de la Química Medicinal.¹

El progreso en la química orgánica ha facilitado considerablemente el acceso a moléculas cada vez más complejas mediante reacciones estereoselectivas, síntesis automatizadas, nuevas reacciones de acoplamiento C-C, y separaciones cromatográficas sencillas, entre otras. Además, las técnicas de identificación estructural

también han avanzado los últimos años como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la cristalografía de rayos X.¹

Por otro lado, el progreso tanto en biología molecular como en ingeniería genética contribuyó considerablemente al conocimiento de *targets* moleculares, tales como enzimas, receptores y ácidos nucleicos. Además, el crecimiento en la espectroscopia de proteínas y la cristalografía de rayos X han permitido la identificación de la estructura tridimensional de numerosos receptores involucrados en diversas patologías.^{1,7} Los avances de estas áreas permitieron el desarrollo de técnicas de simulación computacional para el diseño y optimización del ligando en función de la complementariedad geométrica y electrónica con la molécula diana. De esta forma, el diseño de nuevos compuestos activos se ha basado en los resultados obtenidos mediante estudios de modelado ligando-receptor (Figura 2.4).⁷



Figura 2.4. Convergencia de las distintas áreas de conocimiento en el diseño de fármacos basado en modelado ligando-receptor.

Actualmente, existen numerosos programas (*software*) de modelado molecular que permiten realizar un diseño racional de nuevos ligandos mediante distintas estrategias *in silico*, tales como *docking*, *virtual screening* (VS), dinámica molecular (DM) y *Quantitative Structure Activity Relationship* (QSAR), entre otras.⁷

Los programas mencionados anteriormente son de gran utilidad para el diseño de nuevos fármacos. Sin embargo, cabe destacar que los algoritmos utilizados presentan ciertas limitaciones, ya que se utilizan muchas aproximaciones para describir la realidad biológica. Por lo tanto, el empleo de estas metodologías debe complementarse con estudios adicionales para la identificación de un posible ligando.⁷

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los ligandos propuestos deben ser accesibles sintéticamente en un tiempo razonable, ya que rara vez el primer compuesto diseñado suele ser el elegido. Por lo tanto, si las moléculas propuestas no son biológicamente activas, se debe regresar al ciclo de diseño (Figura 2.5) e iterar tantas veces como sea necesario hasta que se identifique el ligando con el potencial terapéutico adecuado para su posterior desarrollo.⁷

Las simulaciones de *docking* permiten predecir la conformación y orientación preferida de un ligando cuando está unido a un receptor. Dichas simulaciones pueden ser empleadas para predecir la energía de asociación (*energía de binding*) o afinidad de enlace entre las dos moléculas, utilizando para ello las funciones de puntuación, más conocidas como *scoring functions*.⁸

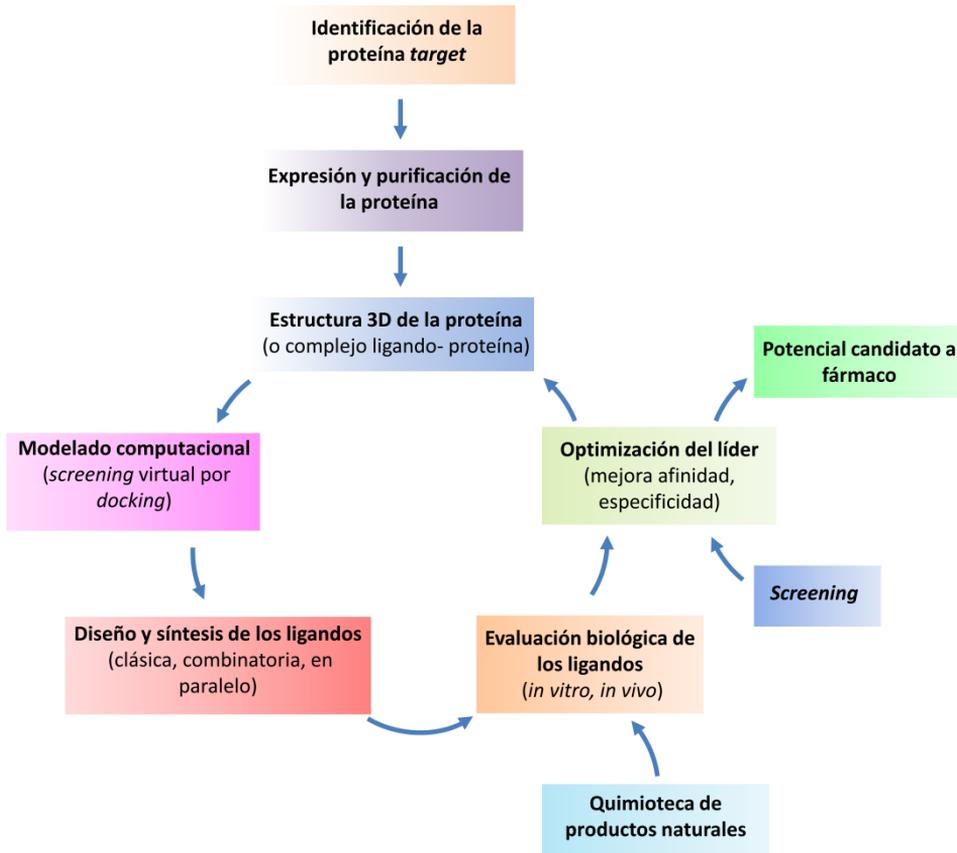


Figura 2.5. Ciclo iterativo para el diseño de nuevos fármacos. Figura adaptada de referencia 7.

Las funciones de puntuación se pueden clasificar en:

- Aquellas que derivan de campos de fuerza, por lo que incluyen principalmente los términos de interacciones de no-enlace (Van der Waals y electrostáticas), y generalmente también contienen términos de solvatación.
- Empíricas (o basadas en regresión), las cuales se fundamentan en contar el número de distintos tipos de interacciones entre el ligando y la proteína, como ser: puentes de hidrógeno, interacciones iónicas,

tamaño de la superficie de contacto lipofílica, flexibilidad del ligando, potencial electrostático en el sitio activo, etc.

- Aquellas basadas en potenciales estadísticos, se fundamentan en el análisis estadístico de contactos intermoleculares ligando-proteína de estructuras publicadas en base de datos (*Cambridge Structural Database, Protein Data Bank*).

- Otras en donde los protocolos se basan en asignar puntajes (*scores*) según la complementariedad de superficie en cuanto a la forma y naturaleza hidrofílica o hidrofóbica, entre otras.

El *docking* se puede aplicar para realizar un *screening* virtual (VS) para determinar *in silico* potenciales candidatos a partir de quimiotecas de miles de compuestos. Se utilizan distintas estrategias para realizar un VS:⁹

- Basado en el ligando (*Ligand-based virtual screening, LBVS*): dado un set de compuestos estructuralmente diversos que se unen a un dado receptor, se puede construir un modelo de farmacóforo, empleando la información colectiva contenida en estos núcleos.⁹

- Basado en la estructura (*Structure-based virtual screening, SBVS*): esta técnica utiliza la metodología de *docking* para predecir el modo de unión (*binding mode*) de los ligandos dentro del sitio activo. De esta forma, se puede estimar la probabilidad de que un compuesto se una a la proteína objetivo con alta afinidad. Esta información se emplea para seleccionar los posibles candidatos a ser evaluados mediante ensayos biológicos.⁹

El empleo de las metodologías mencionadas anteriormente permite racionalizar el proceso de descubrimiento de fármacos disminuyendo los costos y los recursos necesarios. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las funciones de puntuación disponibles hasta el momento no son capaces de predecir eficientemente la energía de unión, ya que se emplean aproximaciones y las condiciones de simulación difieren considerablemente de los medios biológicos

reales.¹⁰ Además, los programas de *docking* pueden fallar en la identificación del modo de unión correcto para un dado complejo ligando-receptor. Por lo tanto, el éxito del SBVS depende de la exactitud del protocolo de *docking* utilizado para seleccionar los candidatos de la quimioteca.¹¹

En los estudios de *docking* se suelen utilizar las enzimas como dianas biológicas. Esto se debe a que son proteínas involucradas en numerosos procesos celulares y cumplen un papel de suma importancia en distintas fases del ciclo celular, señalización celular y otros procesos biológicos fundamentales.

2.4. Las enzimas como *targets* para el diseño de fármacos

El Proyecto del Genoma Humano completado en el año 2003, ha demostrado los 23 cromosomas necesarios para la existencia humana, compuestos por tres billones de pares de bases de ADN que codifican alrededor de 20000-25000 genes codificadores de proteínas. Se estima que existen alrededor de 5000 macromoléculas que pueden ser utilizadas como dianas terapéuticas (*druggable targets*) para la terapia de moléculas pequeñas y otros 3200 *targets* adecuados para la terapia biológica.²

A pesar del gran número de macromoléculas que pueden ser útiles como moléculas objetivo para el tratamiento de una enfermedad, éstas tienen estructuras en común que permiten ser agrupadas y estudiadas en conjunto. Si se realiza un análisis de los fármacos disponibles comercialmente, se puede observar que estos tienen como diana cuatro clases principales de macromoléculas: enzimas, receptores acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés), canales iónicos y transportadores, cuyo estudio es de suma importancia para el diseño de nuevos fármacos.²

Las enzimas son un tipo de macromoléculas que pueden ser consideradas como dianas terapéuticas, ya que están involucradas en la mayoría de las funciones biológicas. Éstas incluyen la catálisis de reacciones, transporte y almacenamiento, soporte mecánico, control de crecimiento y diferenciación celular, coordinación de movimiento y transmisión del impulso nervioso. Es decir que están implicadas en la mayoría de los procesos biológicos necesarios para la vida. Además, son altamente específicas, catalizando solo un tipo de reacciones sobre sustratos concretos. En la Tabla 2.1 se muestran ejemplos de distintas enzimas conocidas, clasificadas de acuerdo a la función que cumplen.¹²

Tabla 2.1. Enzimas, funciones y ejemplos más comunes.

Clasificación	Función	Ejemplos
Oxido-reductasa	Cataliza reacciones redox, transfiriendo electrones desde una molécula a otra, usualmente utilizando un cofactor.	Ciclooxigenasa, xantina oxidasa, alcohol deshidrogenasa, tirosinasa
Transferasa	Cataliza la transferencia de un grupo funcional desde un compuesto a otro.	Tirosina quinasa, transcriptasa reversa, ADN-metil transferasa
Hidrolasa	Cataliza la hidrólisis de una unión química.	Proteasa VIH, tirosina fosfatasa, AChE, BuChE
Liasa	Cataliza la ruptura de una unión química diferente a la hidrólisis u oxidación, normalmente formando un doble enlace o anillo.	Piruvato decarboxilasa, maleato hidratasa
Isomerasa	Cataliza reordenamientos estructurales para formar isómeros del sustrato.	Topoisomerasa, retinolisomerasa, manosaisomerasa
Ligasa	Cataliza la unión química de grandes moléculas.	ADN ligasa, ARN ligasa, tirosin-ARNt ligasa

Teniendo en cuenta la alta especificidad y las funciones que cumplen las enzimas, la regulación enzimática constituye un enfoque prometedor para el descubrimiento racional de nuevos fármacos. Las enzimas *target* seleccionadas para el diseño racional de un nuevo compuesto son aquellas cuya inhibición *in vivo* conducirían a un efecto terapéutico deseado.¹³

Numerosos síntomas que se presentan en diversas enfermedades se originan debido a la deficiencia o exceso de un determinado metabolito en el organismo. Si la concentración del metabolito en cuestión puede ser normalizada, el síntoma disminuye o desaparece y en algunos casos, también la enfermedad. Esto se puede lograr con la regulación de enzimas específicas involucradas en la generación de dicho metabolito, empleando algún compuesto específico. Si el compuesto interacciona con la enzima inhibiendo su función, se lo denomina inhibidor enzimático.¹³ El diseño de inhibidores enzimáticos representa una de las estrategias dentro del diseño de fármacos. De acuerdo con la cinética del proceso enzimático, pueden distinguirse tres aproximaciones para el diseño de inhibidores enzimáticos: análogos del sustrato, análogos del producto final y análogos del estado de transición. En la Figura 2.6 se observa el proceso cinético más simple para una reacción enzimática junto con su perfil de reacción y la etapa en la que actuaría cada uno de los análogos previamente mencionados.³

Los inhibidores enzimáticos pueden clasificarse según distintos criterios. En función de la estabilidad de su unión con la enzima se clasifican en reversibles e irreversibles, mientras que según sea su relación con el sustrato natural de la reacción se clasifican en competitivos, no competitivos y mixtos. Los inhibidores reversibles son aquellos que dan lugar a una inhibición temporal de la enzima y se unen mediante interacciones no covalentes, tales como puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces iónicos.¹⁴

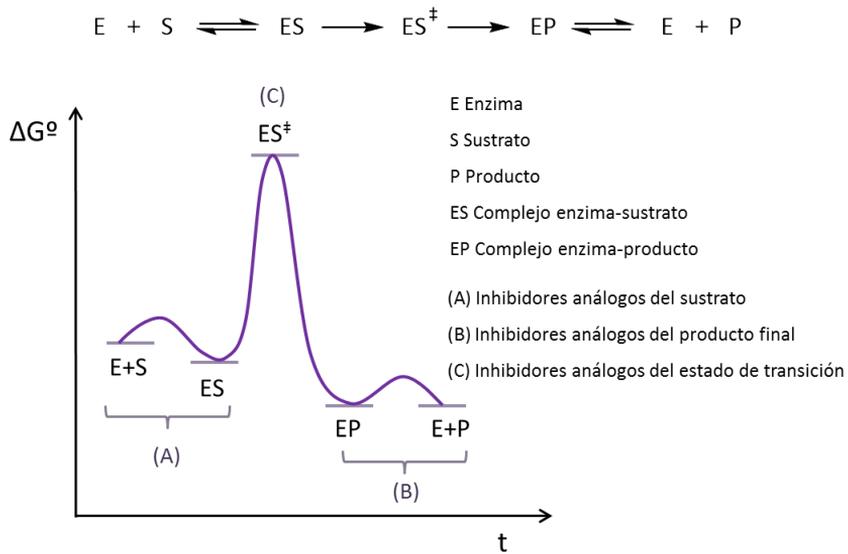


Figura 2.6. Ecuación de una reacción enzimática simple y coordenadas de reacción de dicho proceso. Figura extraída de referencia 3.

Dentro de los inhibidores reversibles se pueden establecer tres categorías:¹⁴

- Inhibidores competitivos: compiten directamente con el sustrato por el sitio activo de la enzima. El inhibidor es capaz de ocupar el sitio activo de la enzima (o una porción), de forma tal que el sustrato no puede ingresar.
- Inhibidores no competitivos: el sustrato y el inhibidor tienen centros de unión distintos con la enzima, por lo que no se establece competencia con el sitio activo (inhibición alostérica). La unión del inhibidor afecta a la unión del sustrato y viceversa. Generalmente, un inhibidor no competitivo produce un cambio en la conformación de la enzima (estructura terciaria), de modo tal que la afinidad del sustrato por el sitio activo se reduce.
- Inhibidores mixtos: el inhibidor es capaz de unirse a la enzima reduciendo su actividad pero sin afectar la unión con el sustrato.

El tipo de inhibición puede determinarse en cada caso en función de parámetros cinéticos, de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{[E_0][S]k_{cat}}{K_M + [S]} \quad (\text{ec. 2.1})$$

$$v_{max} = k_{cat} [E_0] \quad (\text{ec. 2.2})$$

$$\frac{v}{v_{max}} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{ec. 2.3})$$

En dichas ecuaciones, v corresponde a la velocidad de reacción, v_{max} a la velocidad máxima de reacción, $[E_0]$ a la concentración de la enzima y k_{cat} y k_M a las constantes de velocidad y Michaelis-Menten, respectivamente.¹⁵

En la Figura 2.7 se encuentra graficado el perfil de la cinética del proceso descrito por la ecuación de Michaelis-Menten. Esta curva indica que a concentraciones bajas de sustrato, la velocidad de reacción sigue una cinética de primer orden respecto al sustrato. A concentraciones elevadas, la enzima se satura, alcanzando la velocidad máxima y la cinética es de orden cero respecto al sustrato.³

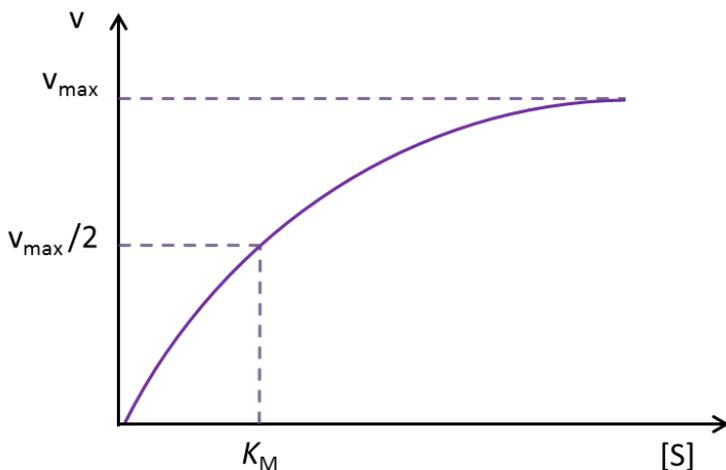


Figura 2.7. Perfil de la cinética de un proceso descrito por la ecuación de Michaelis-Menten. Figura extraída de referencia 3.

Generalmente, se trabaja con una representación lineal de la ecuación de Michaelis-Menten, como la representación de Lineweaver-Burk, donde se grafica la doble recíproca de la velocidad en función de la concentración de sustrato. Esta representación permite calcular de forma sencilla la velocidad máxima de reacción (v_{\max}) y la concentración de S a la cual se alcanza la mitad de la V_{\max} (K_M).¹⁵

La representación gráfica de $1/v$ en función de $1/[S]$ corresponde a una recta que corta al eje de las abscisas en $-1/K_M$ y al de las ordenadas en $1/v_{\max}$. En presencia de un inhibidor reversible, la modificación de la representación de Lineweaver-Burk (Figura 2.8) permite determinar su carácter (a) competitivo, (b) no competitivo o (c) mixto.¹⁶ En cada uno de estos perfiles se grafica $1/v$ en función de $1/[S]$ para distintas concentraciones del inhibidor.³

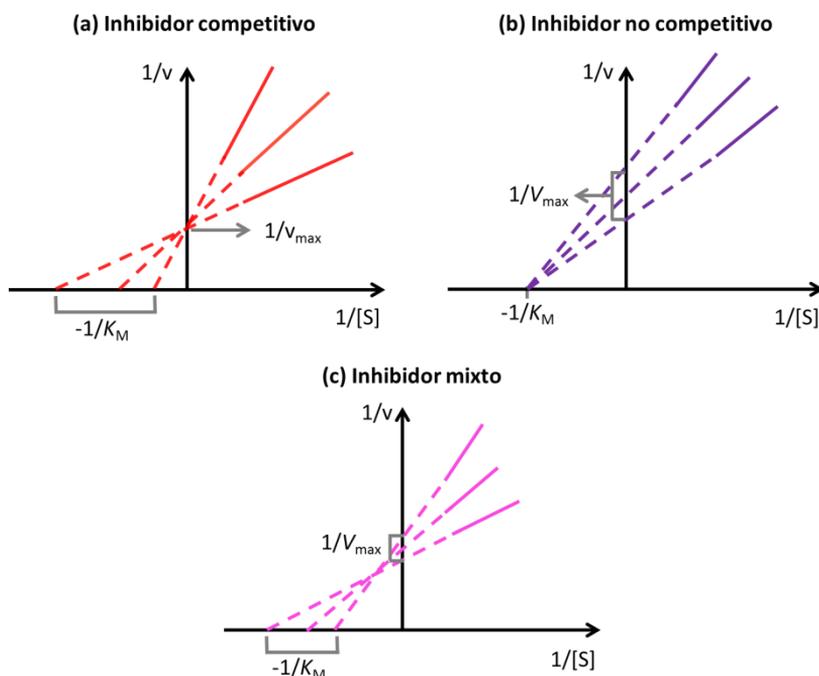


Figura 2.8. Representaciones de Lineweaver-Burk características de (a) inhibición reversible competitiva, (b) inhibición reversible no competitiva y (c) inhibición reversible mixta. Figura extraída de referencia 3.

Por otra parte, los inhibidores irreversibles son aquellos que se unen de manera covalente a la enzima, lo que produce un cambio conformacional en su sitio activo. Dada la elevada estabilidad del enlace covalente que se forma entre la enzima y el inhibidor, no es posible la regeneración química de la enzima. Esto se debe tener en cuenta a la hora de diseñar compuestos con potencial interés terapéutico.^{3,14}

A modo de resumen, en la Figura 2.9 se puede observar el modo de interacción de los distintos tipos de inhibidores descritos anteriormente con una enzima. En la Figura 2.9 (a) se puede ver el proceso que ocurre normalmente, donde un sustrato específico interacciona con el sitio activo de la enzima para que se produzca la catálisis enzimática. En las imágenes (b) y (c) se observa la presencia de un inhibidor reversible. En el caso de (b) se puede distinguir un inhibidor (azul) del tipo competitivo, ya que se une al sitio activo de la enzima. En cambio, (c) representa un inhibidor no competitivo, ya que la unión con la enzima se establece en un sitio alostérico, lo que produce un cambio conformacional en el sitio activo que impide que se una el sustrato. Por último, en (d) se puede ver la unión covalente de un inhibidor irreversible con la enzima.²

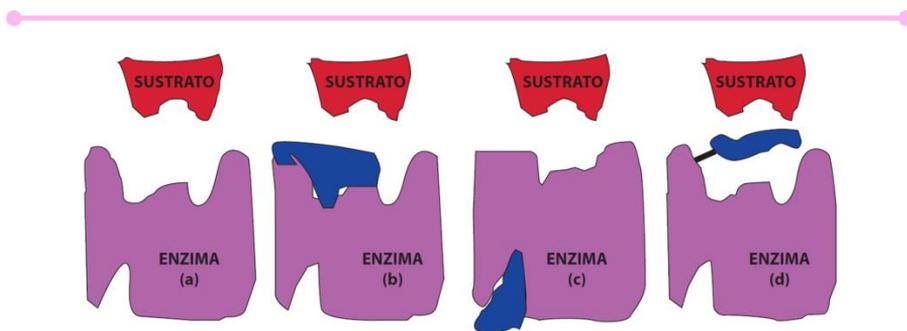
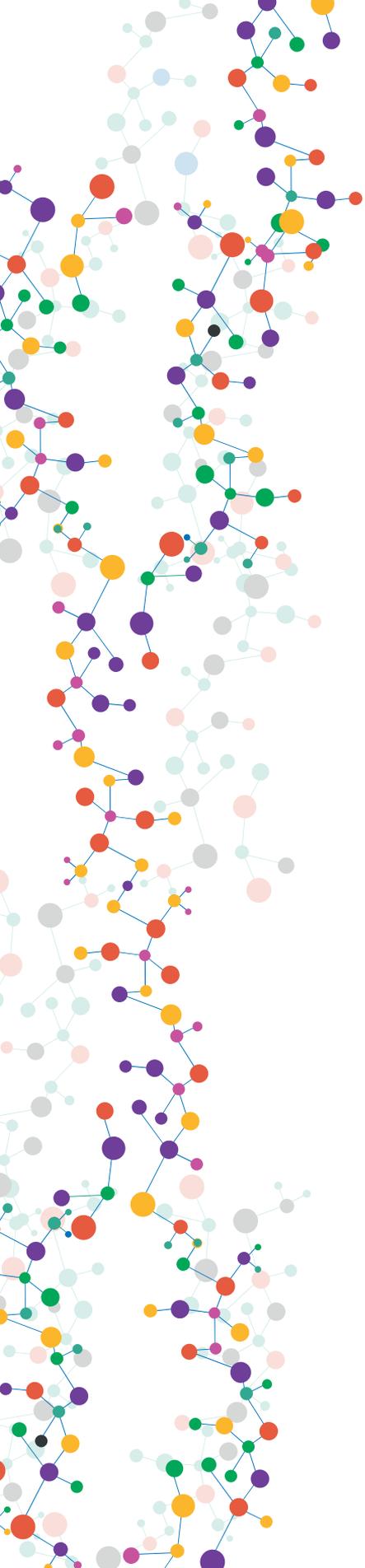


Figura 2.9. (a) Catálisis enzimática normal, donde el sustrato (rojo) se une al sitio activo de la enzima (violeta). (b) Inhibición reversible competitiva (inhibidor en azul). (c) Inhibición reversible no competitiva. (d) Inhibición irreversible. Figura adaptada de la referencia 2.

Considerando que la inhibición enzimática específica constituye un enfoque prometedor para el descubrimiento de nuevos fármacos, en la Parte III de esta Tesis Doctoral se describe el estudio de la inhibición de los compuestos obtenidos (detallados en la Sección II) frente a diferentes enzimas. Para ello, se evaluaron *in vitro* los compuestos sintetizados previamente como inhibidores de tirosinasa, xantina oxidasa (XO) y otras enzimas asociadas a enfermedades neurodegenerativas, tales como acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BuChE), glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) y casein quinasa 1 (CK-1). También se emplearon técnicas *in silico* para describir el modo de unión de la enzima con aquellos compuestos que resultaron activos.

2.5. Referencias bibliográficas

1. Wermuth, C., Aldous, D., Raboisson, P., Rognan, D. *The Practice of Medicinal Chemistry*. Elsevier, Londres, (2015).
2. Blass, B. E. *Basic Principles of Drug Discovery and Development*. Elsevier, Filadelfia, (2015).
3. Cirilo, A. D., Llombart, C. M., Tamargo, J. J. *Introducción a la Química Terapéutica*. Ediciones Diaz de Santos, Madrid, (2004).
4. Kola, I., Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 711–715 (2004).
5. Kola, I. The State of Innovation in Drug Development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 227–230 (2008).
6. Hill, R. G., Rang, H. P. *Drug Discovery and Development. Technology in Transition*. Elsevier, Londres, (2013).
7. Makriyannis, A., Biegel, D. *Drug Discovery Strategies and Methods*. CRC Press, Nueva York, (2003).
8. Bultinck, P., Winter, H. D., Langenaeker, W., Tollenare, J. P. *Computational Medicinal Chemistry for Drug Discovery*. CRC Press, Nueva York, (2003).
9. Horvath, D. *Cheminformatics and Computational Chemical Biology*. Humana Press, Totawa, (2011).
10. Leach, A. R., Shoichet, B. K., Peishoff, C. E. Prediction of Protein- Ligand Interactions. Docking and Scoring: Successes and Gaps. *J. Med. Chem.* **49**, 5851–5855 (2006).
11. Warren, G. L., Andrews, C. W., Capelli, A., Clarke, B., Lalonde, J., Lambert, M. H., Lindvall, M., Nevins, N., Semus, S. F., Senger, S., Tedesco, G., Wall, I. D., Woolven, J. M., Peishoff, C. E., Head, M. S. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *J. Med. Chem.* **49**, 5912–5931 (2006).
12. Pozharskii, A. F., Soldatenkov, A. T., Katritzky, A. R. *Heterocycles in life and society*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, (1997).
13. Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Academic Press, Inc., California, (1992).
14. Sharma, R. *Enzyme Inhibition and Bioapplications*. InTech, Rijeka, (2012).
15. Tseng, S., Hsu, J.-P. A Comparison of the Parameter Estimating Procedures for the Michaelis-Menten Model. *J.Theor. Biol.* **145**, 457–464 (1990).
16. Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science. A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman and Company, Nueva York, (1999).



PARTE I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

Capítulo 3

OBJETIVOS GENERALES

3.1. Objetivos generales

En base a lo expuesto a lo largo de los Capítulos 1 y 2, y considerando la diversidad de análogos de purinas existentes y su amplia actividad biológica, se planteó como objetivo general de esta Tesis Doctoral la obtención de derivados de azapurinas como potenciales inhibidores enzimáticos.

A partir de este objetivo, se diseñó este trabajo de Tesis enfocado en dos partes principales:

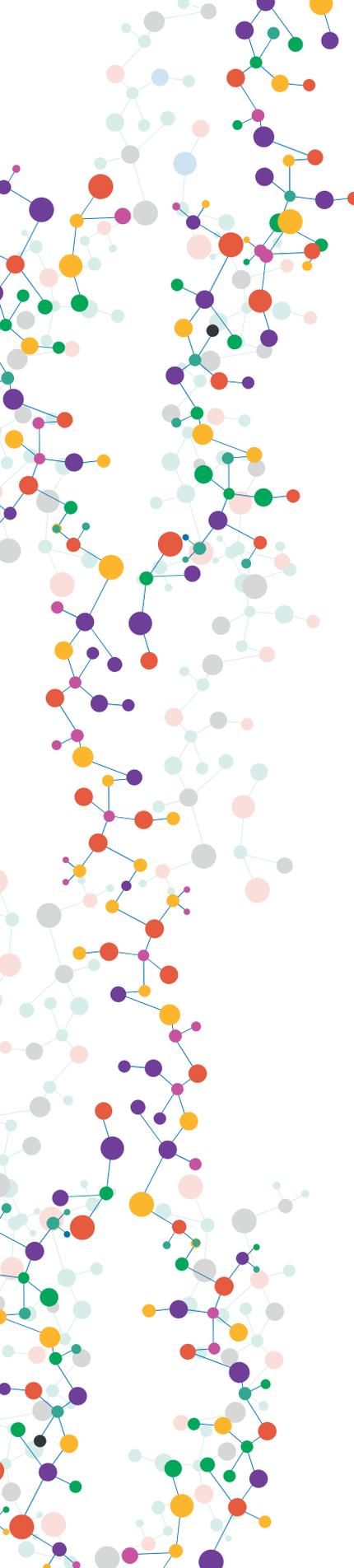
- Síntesis de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas¹ y sus correspondientes precursores.
- Evaluación *in vitro* e *in silico* de los compuestos sintetizados como inhibidores de enzimas asociados a patologías específicas.

Para llevar a cabo estos objetivos, a lo largo de la Parte II de este trabajo de Tesis, se describe la síntesis de una serie de amino-pirazol-carbonitrilos, que serán luego utilizados como precursores de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas. A continuación, se desarrolla la síntesis de estos núcleos de azapurinas, donde se modificó la fusión entre el anillo de pirazol y de triazin-4-ona, para obtener pirazolo[1,2,3][3,4-*d*]triazin-4-onas y pirazolo[1,2,3][4,3-*d*]triazin-4-onas. Por último, se detalla el estudio teórico y experimental del mecanismo de reacción para la termólisis, en benceno a reflujo, de los núcleos de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas.

Para el desarrollo de la Parte III, se centró el estudio de los núcleos mencionados en la Parte II, como inhibidores de diferentes enzimas, lo que constituye un enfoque prometedor para el descubrimiento de nuevos fármacos. Para ello, se especifica la evaluación de los compuestos sintetizados previamente como

¹ Las pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas son análogos de las purinas conteniendo un átomo de N extra en el anillo de seis miembros, por lo que se las clasifica como azapurinas.

inhibidores de tirosinasa, XO y otras enzimas asociadas a enfermedades neurodegenerativas, tales como AChE, BuChE, GSK-3 y CK-1, mediante técnicas *in vitro*. Para aquellos compuestos que resultaron activos se determinó su modo de unión con la enzima, describiendo las interacciones más importantes ligando-proteína mediante estudios de *docking*. Asimismo, se analizaron los fragmentos de la molécula indispensables para la inhibición enzimática para diseñar nuevos compuestos potencialmente bioactivos.



PARTE II

SÍNTESIS DE AZAPURINAS

Capítulo 4

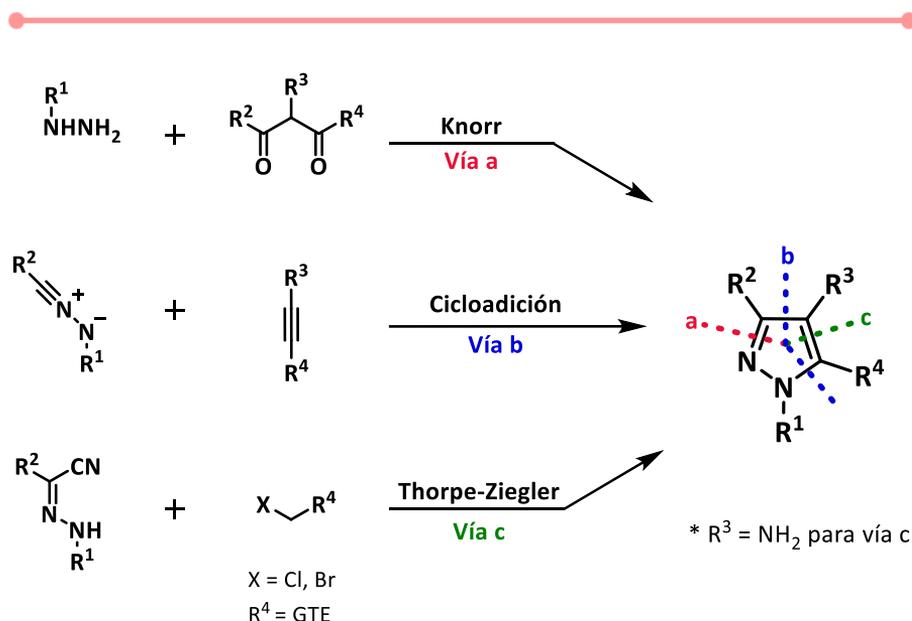
SÍNTESIS DE AMINO PIRAZOL-CARBONITRILOS

4.1. Introducción

4.1.1. Antecedentes de la síntesis de pirazoles

La química de los pirazoles ha sido ampliamente estudiada a lo largo de los años, debido a la gran cantidad de aplicaciones de estos compuestos. A continuación, se resumen algunas de las síntesis más relevantes para la obtención de pirazoles funcionalizados, específicamente de anillos tri o tetra-sustituidos, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

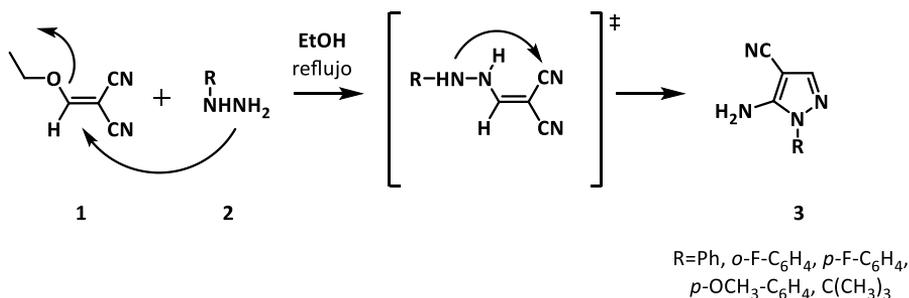
Diversos enfoques han sido planteados para la obtención de anillos de pirazol. En el Esquema 4.1 se resumen tres de estas vías: la reacción de Knorr, la cicloadición y la ciclación de Thorpe-Ziegler.¹



Esquema 4.1. Principales vías sintéticas para la obtención de pirazoles funcionalizados. Esquema adaptado de la referencia 1.

La primera ruta sintética (Esquema 4.1, vía a) consiste en la condensación de una hidrazina con un compuesto 1,3-dicarbonílico, y fue descrita por primera vez en 1883.^{2,3} Por otro lado, la vía b (Esquema 4.1) se basa en la cicloadición 1,3-dipolar de imino nitrilos con alquinos.^{4,5} Estas dos vías suelen ser las más conocidas y utilizadas para la obtención de pirazoles.¹ Por último, la vía c (Esquema 4.1) consiste en la ciclación de Thorpe-Ziegler, en la que un nitrilo reacciona con un grupo metileno activado, mediante una adición intramolecular que conduce al cierre de anillo. En el Esquema 4.1 se muestra la ciclación de Thorpe-Ziegler, particularmente para la obtención de 4-amino-pirazoles ($R^3 = \text{NH}_2$) a partir de cianohidrazonas.⁶⁻⁸

En este trabajo de Tesis se utilizaron las vías de Knorr y la ciclación de Thorpe-Ziegler (Esquema 4.1) para la obtención de pirazoles sustituidos con grupos amino y ciano en diferentes posiciones adyacentes en el anillo. En nuestro grupo de investigación, se ha estudiado la obtención de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos a partir de hidrazinas y etoximetilenmalononitrilo (Esquema 4.2),^{9,10} según el método descrito por C. Cheng y col. en 1956.¹¹

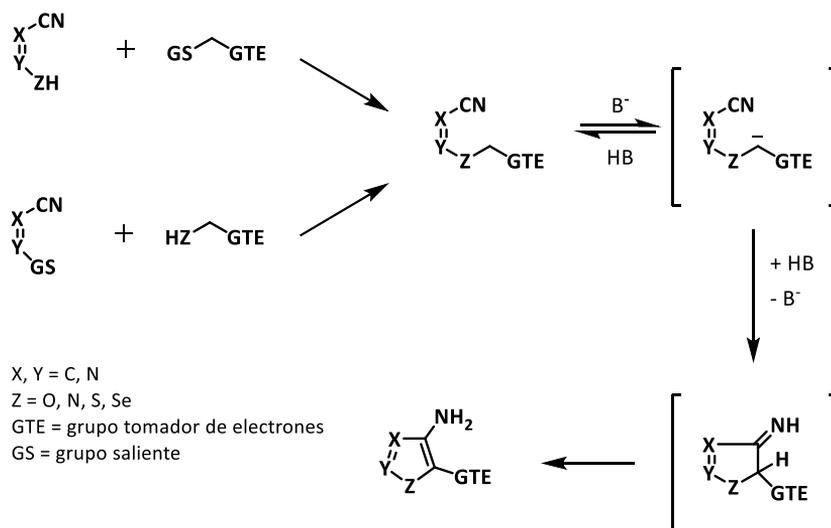


Esquema 4.2. Síntesis de 5-amino-pirazoles-4-carbonitrilos (3) a partir de hidrazinas (2) y etoximetilenmalononitrilo (1).

La síntesis del Esquema 4.2 consiste en una reacción *one-pot* donde la hidrazina **2** se adiciona al etoximetilenmalononitrilo **1** y se libera etanol, seguido de un ataque intramolecular que produce la ciclación y formación del anillo de pirazol. Esta metodología es un ejemplo de la reacción de Knorr, (Esquema 4.1, vía a), en la que el etoximetilenmalononitrilo cumple la función del derivado 1,3-dicarbonílico. Dicha síntesis ha sido descrita para la obtención, mediante calentamiento convencional, de los pirazoles **3** con buenos rendimientos (69-97%).⁹

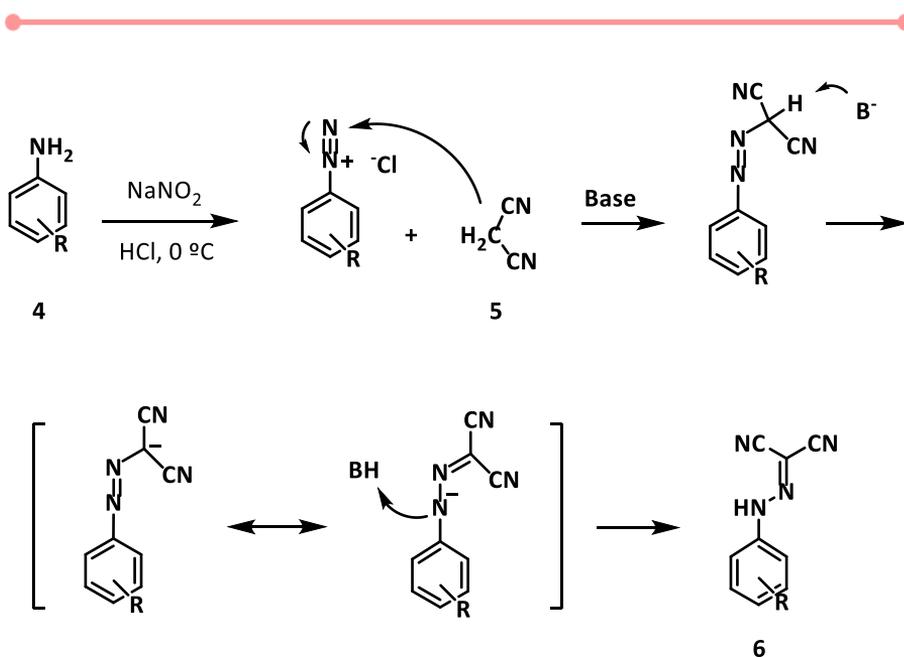
Asimismo, se reportó la síntesis de una familia de 5-amino-pirazoles-4-carbonitrilos empleando síntesis en flujo asistida por microondas.¹² Este método consiste en emplear un sistema de flujo continuo, por donde pasa la muestra a través de un canal que está sometido a microondas. Como resultado, se obtuvieron diversos pirazoles **3** con rendimientos entre el 60-90%.¹²

Por su parte, la ciclación de Thorpe-Ziegler permite obtener diferentes heterociclos de 5 miembros, de acuerdo a la naturaleza de X, Y y Z de los compuestos de partida (Esquema 4.3).⁸



Esquema 4.3. Mecanismo de la ciclización de Thorpe-Ziegler.

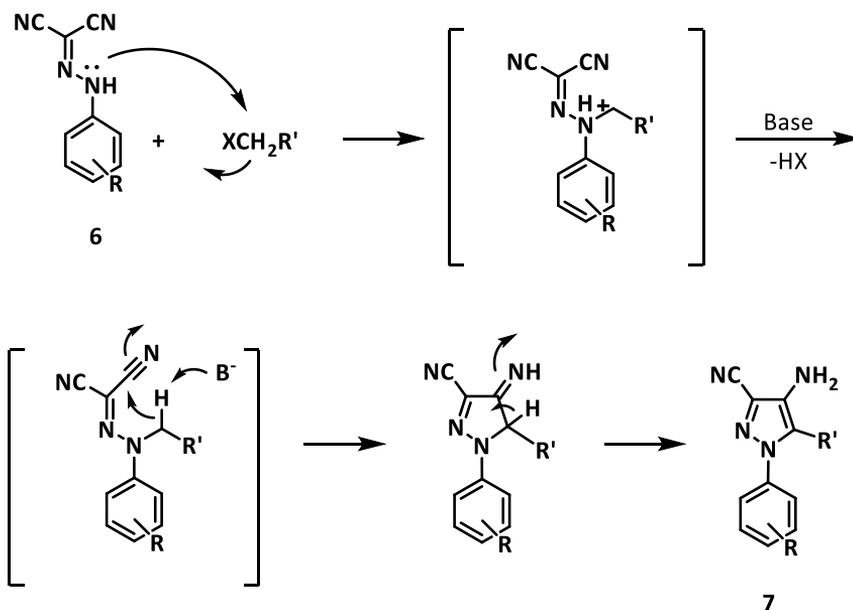
La ciclación de Thorpe-Ziegler ha sido estudiada por diversos autores para la obtención de 4-amino-pirazoles-3-carbonitrilos sustituidos en el *N*-1, a partir de diciano hidrazonas. Estas últimas provienen de la reacción de una anilina con malononitrilo. Para ello, en primer lugar se produce la diazotación de anilina **4** con nitrito de sodio en ácido clorhídrico a 0 °C, para formar la sal de diazonio. Luego, ocurre la condensación del ion diazonio con malononitrilo **5** en medio básico, para la obtención de la correspondiente hidrazona **6** (Esquema 4.4). Esta reacción ha sido ampliamente estudiada para anilinas con sustituyentes tomadores o dadores de densidad electrónica, en las distintas posiciones del anillo, obteniéndose muy buenos rendimientos en todos los casos.^{1,6,7,13,14}



Esquema 4.4. Obtención de diciano hidrazonas **6** a partir de anilinas **4**.

En la segunda etapa de la ciclación de Thorpe-Ziegler, la hidrazona es atacada por una molécula que contiene un grupo metilénico, que puede desprotonarse en condiciones básicas (Esquema 4.5). Diversos compuestos con dichas características han sido estudiados, como por ejemplo cloroacetnitrilo,^{6,14} bromoacetato de metilo^{1,7} y de etilo,¹³ entre otros. Cuando el C nucleofílico ataca a la hidrazona **6** se produce una adición seguida del cierre de anillo y una migración de hidrógeno 1,3 para formar el 4-amino-pirazol-carbonitrilo **7** (Esquema 4.5).

Corre y col.¹ han descrito la obtención de una serie de pirazoles **7** empleando microondas como alternativa sintética. En este caso, el agente metilénico utilizado fue bromoacetato de metilo, obteniéndose rendimientos del 16-80%, dependiendo del sustituyente de la anilina de partida.¹



Esquema 4.5. Síntesis de 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos **7** a partir de diciano hidrazonas **6**.

Considerando los antecedentes mencionados anteriormente, se puede observar que se han reportado síntesis de pirazoles funcionalizados, utilizando diversas metodologías. En el siguiente capítulo, se describe la obtención de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos y 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos. Para ello, se optimizó la síntesis de estos compuestos mediante calentamiento convencional y empleando irradiación de microondas, como alternativa sintética para lograr un método más simple, rápido y de menor impacto medioambiental.

4.1.2. La irradiación de microondas como alternativa sintética

La Síntesis Orgánica Asistida por Microondas (*Microwave Assisted Organic Synthesis*, MAOS por sus siglas en inglés), consiste en emplear la irradiación de microondas (MO) como una fuente de energía alternativa. De esta forma, se busca reemplazar el calentamiento convencional por MO para intentar lograr una síntesis de menor impacto ambiental.¹⁵

La MAOS ha influenciado en la síntesis de compuestos heterocíclicos, generalmente, aumentando los rendimientos de los productos deseados y reduciendo la presencia de subproductos. Además, utilizando radiación de MO se han logrado optimizar síntesis *one-pot* y multi-componentes para la obtención de heterociclos complejos, y disminuir sustancialmente los tiempos de reacción.^{16,17}

Dado que la mayoría de fármacos que se conocen actualmente contienen heterociclos en sus estructuras, la optimización de la síntesis de este tipo de compuestos es un paso crucial en el proceso de descubrimiento de fármacos (*Drug Discovery*, DD por sus siglas en inglés). La aplicación de las MO ha permitido el incremento de la obtención y optimización de la síntesis de nuevos compuestos líderes en el DD.¹⁸

En el proceso de DD, específicamente para las etapas de identificación y optimización del compuesto líder, es necesario disponer de pequeñas moléculas orgánicas nuevas. Con el empleo de las MO su síntesis puede ser más eficiente y, sumado al desarrollo de la química combinatoria y los HTS, se podría disminuir el tiempo necesario para la obtención de un nuevo fármaco. En la Figura 4.1 se puede observar el impacto de la química de las microondas, junto con otras nuevas técnicas sintéticas, en el proceso de DD.^{16,19}

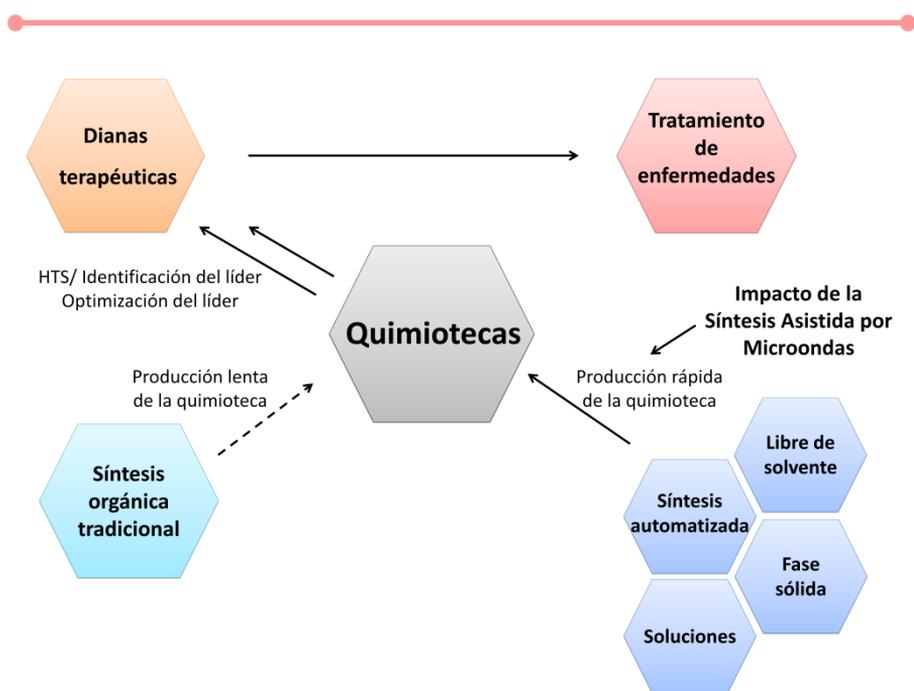


Figura 4.1. Impacto de MAOS en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Figura adaptada de referencia 19.

4.1.2.1. Fundamentos de la irradiación por microondas

La MAOS fue utilizada por primera vez por los investigadores Gedye y Giguere.^{20,21} Esta técnica consiste en emplear la irradiación de MO como fuente de energía alternativa para que ocurra una reacción química.

Las MO son ondas electromagnéticas que se encuentran en el rango de frecuencias de 0,3 a 300 GHz. En el espectro electromagnético, las MO se ubican entre las radiaciones infrarrojas y las radiofrecuencias. Generalmente, un equipo de MO trabaja a 2,45 GHz (Figura 4.2). La energía de un fotón a dicha frecuencia es de aproximadamente 1×10^{-5} eV, es decir, demasiado pequeña como para producir una ruptura de enlace*.²² Es por esto que la química de MO se basa en los efectos del calentamiento dieléctrico, ya que las reacciones no son producidas por la absorción directa de la radiación electromagnética.²³⁻²⁶

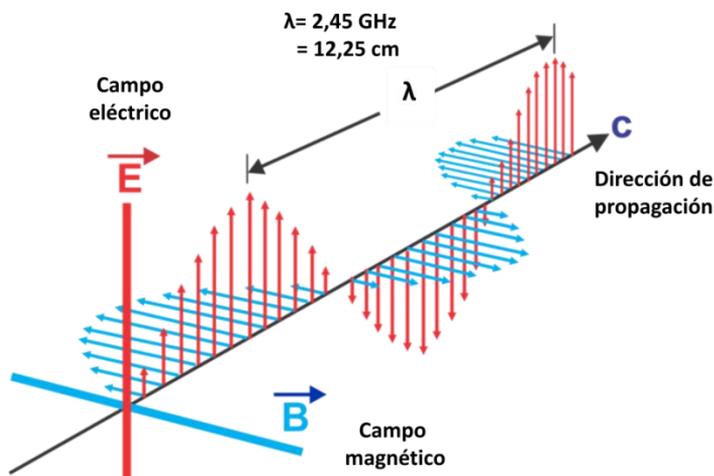


Figura 4.2. Componente eléctrica y magnética de una microonda. Figura extraída de la referencia 27.

* La energía de enlace C-C es de $2,166 \cdot 10^{27}$ eV y para el doble enlace C=C es de $3,814 \cdot 10^{27}$ eV.

La componente eléctrica de la MO puede producir calentamiento mediante dos mecanismos: polarización dipolar y conductividad iónica (Figura 4.3, ejemplificado para una molécula de agua).^{23,24,28} Para que ocurra lo primero es necesario que las moléculas involucradas tengan un momento dipolar para absorber las MO. Cuando la muestra es irradiada, los dipolos tienden a alinearse con el campo eléctrico de la onda (Figura 4.4). Como este es oscilante, se producen alineaciones y re-alineaciones de los dipolos, lo que genera fricción y pérdida dieléctrica, que se traduce en energía liberada en forma de calor. La cantidad dependerá tanto de la capacidad de las moléculas para alinearse, como de la frecuencia de oscilación de la onda. Si la radiación es de alta frecuencia, el dipolo no tendrá tiempo de alinearse nuevamente. En cambio, si la radiación es de baja frecuencia, el dipolo retornará a su orientación inicial antes de que oscile el campo eléctrico. En ambos casos, no se produce el calentamiento de la muestra.^{23,24}

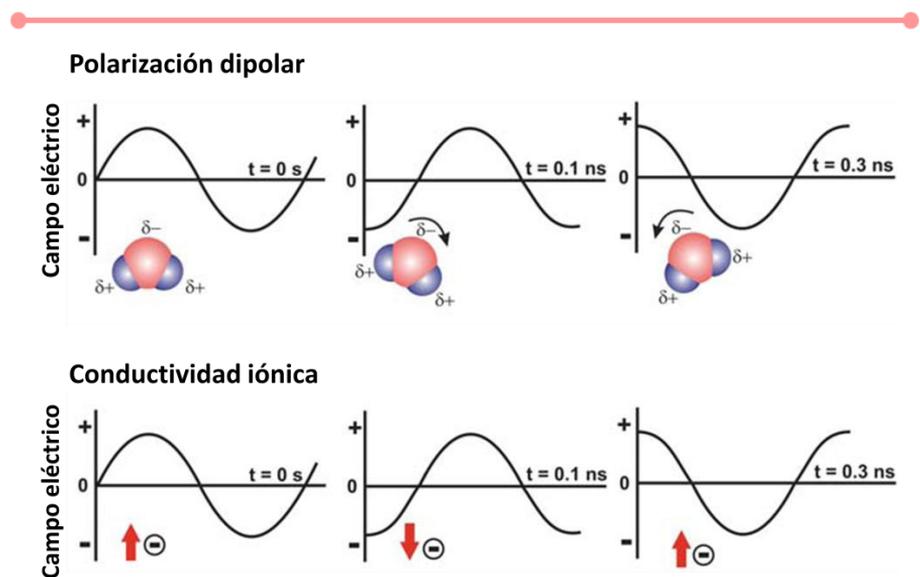


Figura 4.3. Mecanismos de polarización dipolar y de conductividad iónica para agua. Figura adaptada de la referencia 28.

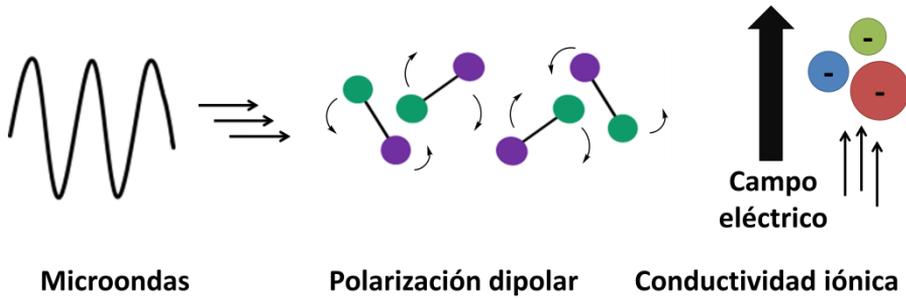


Figura 4.4. Comportamiento de los componentes de la muestra en presencia de las MO de acuerdo a los dos mecanismos de calentamiento dieléctrico: polarización dipolar y conductividad iónica.

Por otra parte, el mecanismo de conductividad iónica depende de la presencia de iones en la matriz, que oscilan debido al campo eléctrico de la onda, ya que son partículas cargadas (Figura 4.4). Esto provoca colisiones con las moléculas y átomos vecinos que causan movimiento y liberación de calor. La cantidad liberada es menor a la que se produce por polarización dipolar, por lo que se lo considera un proceso secundario.^{23,24}

Considerando lo expuesto anteriormente, se puede concluir que el factor principal involucrado en el calentamiento por MO son las propiedades dieléctricas del material irradiado. Estas propiedades dependen de su capacidad para convertir la energía electromagnética en energía térmica, y está dada por la tangente de pérdida dieléctrica ($\tan \delta$), que se define como:

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad (\text{ec. 4.1})$$

donde ϵ'' es la pérdida dieléctrica de la sustancia y ϵ' es la constante dieléctrica del material.^{23,24}

La pérdida dieléctrica de la sustancia (ϵ'') indica la eficiencia con la cual la radiación es convertida en calor. En cambio, la constante dieléctrica del material (ϵ'), describe la polarizabilidad de las moléculas

en el campo eléctrico. Para que ocurra la absorción eficiente de MO y, por lo tanto, un rápido calentamiento, es necesario que $\tan \delta$ tenga valores superiores a 0,5. Los valores de $\tan \delta$ para algunos solventes más comunes se muestran en la Tabla 4.1. En general, los solventes pueden clasificarse de absorción alta ($\tan \delta > 0,5$), de absorción media ($0,5 > \tan \delta > 0,1$) o de absorción baja ($\tan \delta < 0,1$).²⁴

Tabla 4.1. Valores de $\tan \delta$ para algunos solventes.

Absorción de MO	Solvente	$\tan \delta$
ALTA	Etilenglicol	1,350
	Etanol	0,941
	DMSO	0,825
	Metanol	0,659
	Nitrobenceno	0,589
MEDIA	2-butanol 	0,447
	DCB	0,280
	Ácido acético	0,174
	DMF	0,161
	Agua	0,123
BAJA	Cloroformo	0,091
	Acetonitrilo	0,062
	THF	0,047
	Diclorometano	0,042
	Hexano	0,020

El valor de $\tan \delta$ es dependiente de la temperatura y la frecuencia de trabajo. Además, es importante tener cuenta que todas las sustancias en la mezcla de reacción, y no solo el solvente, son responsables de la absorción de las MO. Es por eso que, en algunas ocasiones, se puede lograr un calentamiento eficiente en presencia de solventes de muy baja absorción o incluso en ausencia de solvente.²⁴

4.1.2.2. Calentamiento convencional vs. calentamiento por irradiación con MO

En la síntesis orgánica por calentamiento convencional se calienta el recipiente conteniendo la muestra utilizando un baño de aceite o un manto calefactor. De esta forma, la energía térmica es transmitida dentro de la mezcla de reacción mediante corrientes de convección y depende de la conductividad térmica de la muestra. Este proceso suele ser lento y, normalmente, las temperaturas de las paredes del recipiente son superiores a las del seno de reacción (Figura 4.5a).²⁹

En cambio, la irradiación por MO produce un calentamiento interno eficiente (calentamiento volumétrico desde el seno de la reacción) debido al acoplamiento directo de las MO con las moléculas. De esta forma, las paredes del recipiente se mantienen a menores temperaturas que la mezcla, generando gradientes inversos a los de calentamiento convencional (Figura 4.5b).²⁹

Generalmente, la MAOS reduce los tiempos de reacción. Esto se debe al calentamiento rápido y eficiente, sumado a las altas temperaturas localizadas e instantáneas generadas en el seno de la mezcla.^{29–32}

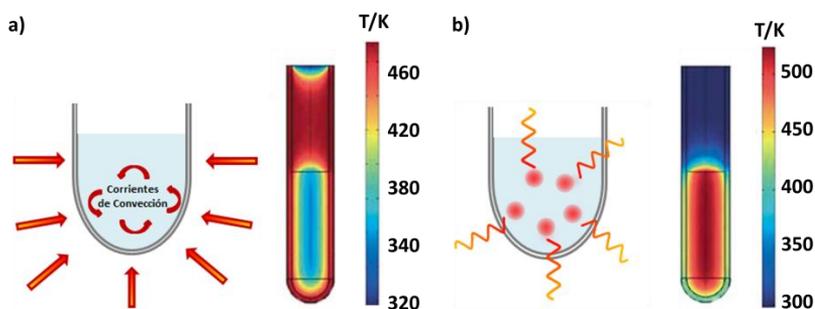


Figura 4.5. Comparación entre (a) calentamiento convencional y (b) por microondas. Figura adaptada de la referencia 29.

Los efectos observados en reacciones asistidas por MO son el resultado de un fenómeno puramente térmico o cinético. Éste depende exclusivamente de la capacidad de la mezcla de reacción para absorber eficientemente la energía de las MO, a través del calentamiento dieléctrico. Mientras más eficaz sea este proceso, más rápido será el aumento de temperatura de la mezcla, que se verá reflejado en la reducción del tiempo de reacción. Las condiciones tales como el uso de reactores cerrados y pequeños, alta potencia de irradiación y solventes con alta absorción de MO, también contribuyen al rápido aumento de la temperatura.²⁹⁻³²

Además, cabe destacar que en las reacciones asistidas por MO se obtienen perfiles de calentamiento diferentes a los convencionales. Por esto, cuando se trabaja con reacciones que poseen distribuciones de productos dependientes de perfiles cinéticos complejos, se encuentra selectividad hacia algunos de ellos y menor cantidad de productos secundarios.³³

4.1.2.3. Equipamiento y métodos disponibles

Actualmente, existen dos tipos de equipos diseñados específicamente para reacciones por MO. Estos se clasifican de acuerdo a la forma en la que las MO inciden en la muestra y se conocen como reactores microondas multimodo y monomodo. El primero está relacionado conceptualmente a los microondas domésticos, ya que el campo generado es homogéneo en todas sus direcciones. Las MO ingresan a una cavidad reflejándose en las paredes y siendo absorbidas por el/los reactores dentro (Figura 4.6a). Éstos se ubican en rotores que aseguran la absorción de las MO de la manera más homogénea posible. Los microondas multimodo presentan la ventaja de poder ser utilizados para trabajar a escala preparativa, ya que se pueden construir cavidades de gran tamaño.^{23,24}

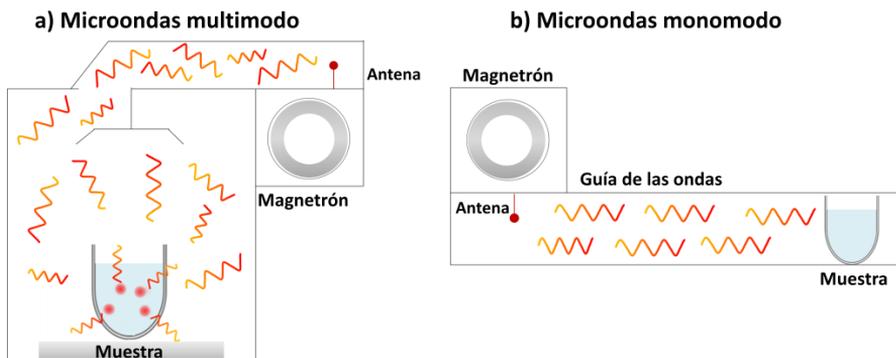


Figura 4.6. Diagrama de funcionamiento de un equipo de microondas (a) multimodo y (b) monomodo. Figura adaptada de referencia 24.

En cambio, el reactor de microondas monomodo se caracteriza por trabajar con una MO estacionaria. En estos equipos, las ondas electromagnéticas son conducidas desde la fuente hacia la cavidad con alta precisión, lo que genera un calentamiento eficiente y direccionado hacia el centro del reactor (Figura 4.6b). Las cavidades de los monomodos son de menor tamaño y solo son aptas para reacciones a baja escala.^{23,24}

El empleo de equipos de MO permite aplicar diferentes metodologías para la síntesis orgánica. De esta manera, se puede trabajar en un sistema abierto o cerrado, y controlar la presión, temperatura y potencia aplicada. Además, se pueden emplear métodos dinámicos, donde la potencia varía en función de la temperatura; métodos de potencia fija, en los que el usuario fija el valor máximo y un rango de temperatura de trabajo; y métodos combinados, los cuales permiten realizar varias etapas consecutivas modificando todas las variables en cada paso.

4.2. Objetivos específicos

Con el fin de obtener derivados de pirazoles de interés biológico y como precursores para la formación de pirazolo[1,2,3]triazinonas, en este capítulo se describen los resultados referidos al estudio de la síntesis de dos series de amino-pirazol-carbonitrilos. Para ello, se utilizaron tanto la síntesis orgánica convencional como la MAOS.

Los objetivos específicos planteados para esta parte del trabajo se detallan a continuación:

- Sintetizar 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos, empleando síntesis convencional o MAOS.
- Optimizar las condiciones para la obtención de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos mediante MAOS.
- Sintetizar 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos empleando síntesis convencional o MAOS.
- Comparar las metodologías utilizadas para sintetizar los diferentes amino-pirazol-carbonitrilos.

4.3. Resultados y discusión

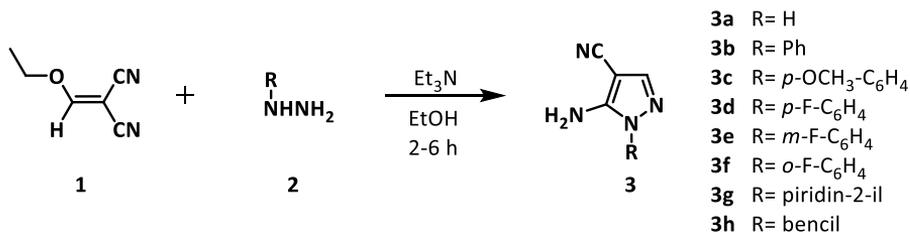
4.3.1. Síntesis de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de 5-amino-1*H*-pirazol-4-carbonitrilos **3** con diferentes sustituyentes en el *N*-1 (Esquema 4.6). Para ello, se utilizó una ruta sintética que consiste en una reacción de Knorr descrita en bibliografía,⁹ en la que se utiliza como reactivos precursores etoximetilmalononitrilo **1** y diferentes hidrazinas **2**. Utilizando dicha síntesis, se obtuvieron los pirazoles **3a-h** para lo cual se emplearon dos metodologías: calentamiento convencional y calentamiento por MO.

La síntesis convencional se realizó a partir de los reactivos **1** y **2** en etanol a reflujo por un período de 2-6 horas, dependiendo de la naturaleza de la hidrazina. De esta forma, la síntesis de los derivados **3d-h** (4-6 h) requirió más tiempo que para el caso de **3a-c** (2-4 h).

Cabe señalar que las hidrazinas de partida se emplearon en forma de sal, ya que se comercializan de esta forma para evitar su descomposición. Para la obtención de los pirazoles **3b-g** se utilizaron los clorhidratos de las hidrazinas correspondientes, mientras que para el **3a** se empleó el sulfato y para el compuesto **3h** el diclorhidrato de **2**. Además, para la síntesis de **3b** también se empleó la fenilhidrazina libre, lo que permitió comparar ambas fuentes de hidrazina. Se utilizó trietilamina (Et₃N) como base para desprotonar **2**, y así liberar el grupo NH₂, neutralizando el ácido correspondiente (clorhídrico o sulfúrico). Para los derivados **3b-g** se empleó un equivalente de base, mientras que para obtener **3a** y **3h** se utilizaron dos equivalentes de Et₃N.

Las síntesis asistidas por MO se realizaron en un sistema cerrado, utilizando un método dinámico, donde se fija la temperatura (T) y la potencia varía para mantener el sistema a T constante. Las reacciones se realizaron con control de presión, a una T de 100 °C, en un intervalo de tiempo de 2 a 7 min y potencia promedio de 30 W.



Esquema 4.6. Síntesis de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3a-h**.

Los resultados obtenidos para la síntesis de los compuestos **3a-h**, a partir de las sales de hidrazinas correspondientes y utilizando ambas metodologías, se resumen en la Tabla 4.2. En general, se obtuvieron rendimientos superiores empleando irradiación de MO como fuente de calentamiento, excepto para los pirazoles **3d** y **3f**. Además, los tiempos de reacción se disminuyeron considerablemente, de 2-6 horas cuando se empleó sistema a reflujo, a unos pocos minutos utilizando MO, lo que proporciona una gran mejora para la síntesis de estos núcleos.

Por otro lado, Smith C. J. y col. han reportado la síntesis en flujo asistida por MO de algunos de los pirazoles **3** empleando metanol como solvente a una temperatura entre 100-120 °C durante 0,8-4 min.¹² Si se comparan sus resultados con los obtenidos en este trabajo (Tabla 4.2), se puede observar que, en la mayoría de los casos, los rendimientos fueron similares. La excepción la constituye el derivado **3g** cuyo rendimiento fue considerablemente mayor (90%) cuando se empleó la síntesis en flujo asistida por MO.

Tabla 4.2. Síntesis de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3a-h**.

Compuesto	R	Síntesis convencional (%) ^a	Síntesis asistida por MO (%) ^a	Síntesis en flujo asistida por MO (%) ^{a,b}
3a	H	45	69	62
3b	Ph	78	88 ^c	89
3c	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	69	72	84
3d	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	97	79	85
3e	<i>m</i> -F-C ₆ H ₄	51	74	-
3f	<i>o</i> -F-C ₆ H ₄	91	81	-
3g	piridin-2-il	27	48	90
3h	bencil	49	54	-

(a) Compuesto aislado. (b) Valores extraídos de la referencia 12. (c) Valor empleando etanol:agua (3:1).

Para la obtención del pirazol **3b** se estudiaron diferentes condiciones experimentales, que se resumen en la Tabla 4.3. Se utilizaron ambas fuentes de fenilhidrazina (libre o clorhidrato) mediante síntesis convencional en etanol a reflujo. Se calentó durante 30 minutos, ya que a tiempos mayores se observó la formación de subproductos por cromatografía en capa delgada (TLC por sus siglas en inglés) cuando se empleó la hidrazina libre. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que las hidrazinas libres son inestables a temperatura ambiente, lo que indudablemente afecta al transcurso de la reacción.³⁴ En la síntesis asistida por MO se observó un comportamiento similar, por lo que la muestra se irradió solo durante 1 minuto cuando se empleó la hidrazina libre (Tabla 4.3).

Además, en las reacciones asistidas por MO, se modificó el solvente utilizado, disminuyendo la cantidad de solvente orgánico y

aumentando la proporción de agua, para lograr una síntesis de menor impacto ambiental. En la Tabla 4.3 se observa que se obtuvieron los mejores resultados cuando se utilizó la mezcla etanol: agua 3:1, es decir, se logró una importante disminución del solvente orgánico. El incremento aun mayor de agua en el medio de reacción no mejoró los porcentajes de obtención de **3b**. Esta situación puede atribuirse a las dificultades encontradas durante la etapa de extracción del producto a partir de la fase acuosa que puede haber generado pérdida en la recuperación de **3b**.

Tabla 4.3. Síntesis de 5-amino-1-fenil-pirazol-4-carbonitrilo **3b**.

Método	Fenilhidrazina	t	Sistema de solvente	Rendimiento 3b (%) ^c
Convencional ^a	Libre	30'	Etanol	56
Convencional ^a	Clorhidrato	30'	Etanol	63
MO ^b	Libre	1'	Etanol	47
MO ^b	Clorhidrato	2'	Etanol	67
MO ^b	Clorhidrato	2'	Etanol:Agua (3:1)	88
MO ^b	Clorhidrato	2'	Etanol:Agua (2:1)	74
MO ^b	Clorhidrato	2'	Etanol:Agua (1:1)	59
MO ^b	Clorhidrato	2'	Agua	20

(a) Reacciones realizadas a partir de **1** y **2b** en etanol, a reflujo por 30 min. (b) Reacciones realizadas a partir de **1** y **2b** con irradiación de MO a 100 °C, en sistema cerrado con control de presión, potencia promedio de 30 W. (c) Producto aislado.

Todos los pirazoles obtenidos son de estructura conocida y fueron caracterizados por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón (¹H), carbono (¹³C), *Heteronuclear Single*

Quantum Correlation (HSQC) y *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC). Esta información se encuentra en el Anexo.

El análisis del espectro de RMN ^1H del pirazol **3b** permitió asignar inequívocamente el protón aromático de la posición 3 del anillo de pirazol, con un desplazamiento característico a 7,68 ppm, los protones correspondientes al anillo fenilo y los H del grupo amino a 6,02 ppm. Además, se asignaron las señales correspondientes a los carbonos aromáticos y una señal característica del carbono del grupo CN a 114,2 ppm. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en bibliografía.^{9,12} A modo de ejemplo en la Figura 4.7 se observan los valores de desplazamiento químico (en ppm) encontrados para los hidrógenos y carbonos del compuesto **3b**.

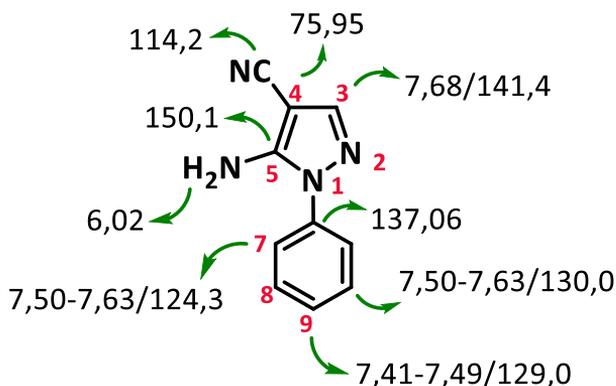
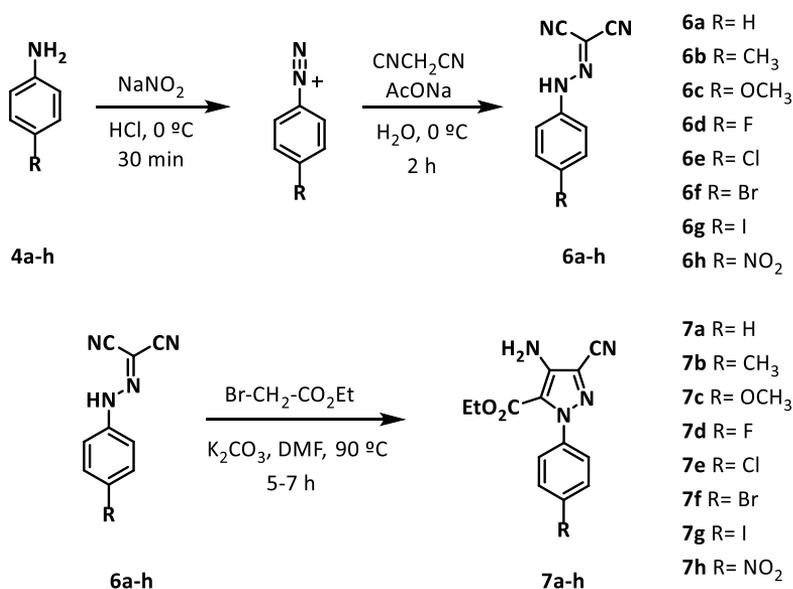


Figura 4.7. Asignaciones de H/C (en ppm) para el compuesto **3b**.

4.3.2. Síntesis de 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos

Para la obtención de 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos se planteó una síntesis del tipo de ciclación de Thorpe-Ziegler,¹ en dos pasos: primero la formación de la *N*-aril-dicianohidrazona **6** y luego la reacción con bromoacetato de etilo, para producir el cierre de anillo y formación del correspondiente pirazol **7** (Esquema 4.7).

Para la síntesis de *N*-aril-hidrazonas **6a-h**, se partió de distintas anilinas (**4**) disponibles comercialmente, utilizando el protocolo descrito en bibliografía.¹ Esta metodología implica la diazotación de **4** con una solución acuosa de nitrito de sodio en ácido clorhídrico a 0 °C, para formar la sal de diazonio *in situ*. Posteriormente, ésta se agrega gota a gota a una solución de acetato de sodio con malononitrilo que produce la condensación y origina la correspondiente hidrazona (Esquema 4.7). Esta técnica permitió obtener los compuestos **6** con excelentes rendimientos, como se observa en la Tabla 4.4.



Esquema 4.7. Formación de *N*-aril-dicianohidrazonas **6a-h** y 3-ciano-4-amino-pirazol carboxilatos de etilo **7a-h**.

Posteriormente, a partir de las hidrazonas **6**, se sintetizaron diferentes 4-amino-3-ciano-1*H*-pirazol-5-carboxilatos de etilo **7a-h**. Para la optimización de esta etapa se evaluaron distintas condiciones: síntesis convencional, MAOS a sistema abierto y cerrado, distintos solventes (tolueno y DMF), tiempos de reacción ($t_{\text{convencional}}$: 4-7 h, $t_{\text{MAOS-sist.abierto}}$: 2 min-2 h, $t_{\text{MAOS-sist.cerrado}}$: 1-10 min), temperatura (90-120 °C) y diferentes bases (Et_3N y K_2CO_3). A pesar de la modificación de diferentes variables durante la MAOS, no se lograron sintetizar los pirazoles esperados.

Las mejores condiciones encontradas corresponden al empleo de carbonato de potasio (K_2CO_3) en DMF a 90 °C por 5-7 horas mediante síntesis convencional (Esquema 4.7). Los rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Síntesis de *N*-aril-hidrazonas **6a-h** y 3-ciano-4-amino-pirazol carboxilatos de etilo **7a-h**.

R	Compuesto	Rendimiento (%) ^a	Compuesto	t de reacción (h)	Rendimiento (%)
H	6a	99	7a	6	39 ^a
CH ₃	6b	95	7b	5,5	38 ^a
OCH ₃	6c	92	7c	5	42 ^a
F	6d	86	7d	7	49 ^b
Cl	6e	99	7e	7	52 ^b
Br	6f	98	7f	7	40 ^b
I	6g	94	7g	6,5	55 ^a
NO ₂	6h	96	7h	7	18 ^b

(a) Producto aislado. (b) Producto purificado por recristalización.

Las condiciones de reacción seleccionadas permitieron la conversión completa de las hidrazonas **6**. Sin embargo, los rendimientos para la obtención de los pirazoles **7a-h** fueron de moderados a buenos, debido a las dificultades encontradas durante la extracción del producto del medio de reacción (DMF).

Los pirazoles **7a** y **7b** son de estructura conocida y fueron reportados con anterioridad en bibliografía.^{13,35} En cambio, los compuestos **7c-h** son nuevos y fueron caracterizados por RMN ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC. Esta información se encuentra en el Anexo.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto **7a** se puede asignar inequívocamente los protones correspondientes al grupo etilo del éster (1,11 y 4,18 ppm) de la posición 5 del anillo, los H del grupo amino (5,15 ppm) y los H aromáticos del anillo fenilo. Mediante el análisis del espectro de RMN ^{13}C , se pueden distinguir el carbono del grupo ciano (114,7 ppm) y el carbono del carbonilo (160,0 ppm), entre otros. Esta información se muestra en la Figura 4.8 como ejemplo para el compuesto **7a**.

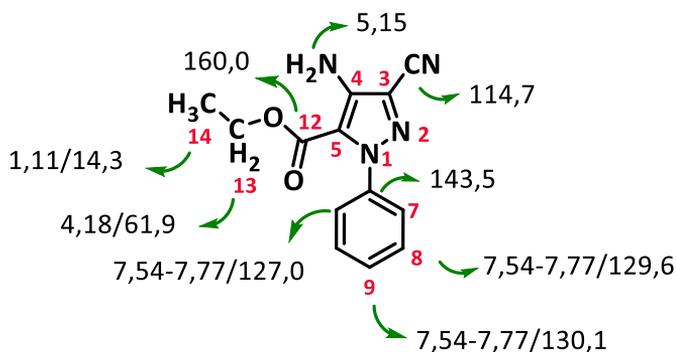


Figura 4.8. Asignaciones de H/C (en ppm) para el compuesto **7a**.

4.4. Sección experimental

4.4.1. Materiales y métodos generales

Todos los reactivos de partida utilizados fueron obtenidos comercialmente de Sigma-Aldrich y se emplearon sin purificación previa. Las cromatografías en capa delgada (TLC) se realizaron con sílica-gel Merck (60 DGF254).

Para realizar los experimentos de RMN se utilizó un equipo Bruker Avance II FT- 400 MHz (^1H a 400,16 MHz y ^{13}C a 100,56 MHz) a temperatura ambiente. Las soluciones fueron preparadas en acetona deuterada ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), cloroformo deuterado (CDCl_3), acetonitrilo deuterado (CD_3CN) o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm y fueron obtenidos tomando como referencia la señal residual del solvente no deuterado como estándar interno secundario. Los datos de RMN ^1H están informados indicando el desplazamiento químico (δ), la multiplicidad (s, singlete, d, doblete, t, triplete, q cuatriplete, m multiplete, br, ancho, dd, doble doblete, etc.), la constante de acoplamiento (J) en Hz y la integración (por ejemplo 1H).

La caracterización de los compuestos sintetizados se encuentra en la sección Anexo.

Las reacciones asistidas por microondas se realizaron en un reactor CEM *Focused Microwave Synthesis System*, modelo *Discover Labmate*, monomodo, equipado con un sensor infrarrojo para la medición de temperatura, control directo de presión, un sistema de refrigeración por aire comprimido y 300 W de potencia máxima.

4.4.2. Procedimiento general para la síntesis de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3a-h**

Para la síntesis de los compuestos **3a-h** por calentamiento convencional se siguieron los pasos que se detallan a continuación. En un erlenmeyer se colocaron 2,5 mmol de los clorhidratos o sulfatos de hidrazinas **2** en 1 mL de etanol y se neutralizaron con cantidades equivalentes de trietilamina (Et_3N) a 0 °C, empleando un baño de hielo. Posteriormente, se agregó la mitad del total (2,5 mmol) de etoximetilenmalononitrilo **1** a la mezcla de reacción, y se llevó la solución a reflujo. Luego, se agregó el etoximetilenmalononitrilo restante cuidadosamente, para evitar la pérdida del solvente a ebullición. La reacción se controló por TLC y se mantuvo a reflujo por 2-6 horas. Luego, el crudo de reacción se dejó enfriar en el *freezer* durante toda la noche para favorecer la precipitación del producto.

Para la síntesis del 5-amino-1-fenil-pirazol-4-carbonitrilo (**3b**) empleando fenilhidrazina libre, se utilizaron 3 mL de etanol, 6,5 mmol (0,64 mL) de la hidrazina y se agregaron 5,43 mmol de etoximetilenmalononitrilo, siguiendo los pasos anteriormente descritos. La reacción se mantuvo a reflujo durante 30 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego, se evaporó parcialmente el solvente para favorecer la precipitación del producto.

En todos los casos, el sólido obtenido fue recuperado mediante filtración al vacío y lavado con abundante agua fría. El producto se caracterizó por RMN ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC.

Para las síntesis asistidas por MO de los compuestos **3a-h**, en un tubo para irradiación por MO de 10 mL, equipado con una barra magnética, se colocaron 1,48 mmol de los clorhidratos o sulfatos de hidrazinas **2**, cantidades equivalentes de Et_3N y 1,23 mmol de etoximetilenmalononitrilo (**1**), en 2 mL de solvente (etanol y/o agua). La mezcla se irradió entre 2-7 min con agitación constante, a una temperatura fija de 100 °C. Las reacciones se realizaron en sistema

cerrado, utilizando una potencia promedio de 30 W y una presión controlada promedio de 44 psi.

Para el aislamiento del pirazol **3b**, el crudo de reacción se dejó enfriar en el *freezer* durante toda la noche, para favorecer su precipitación. El sólido obtenido fue recuperado mediante filtración al vacío y lavado con abundante agua fría.

Para la síntesis de los compuestos **3a**, **3c-h** se realizaron tres extracciones de los crudos de reacción, con 5 mL de cloroformo y agua cada una. La fase orgánica fue recuperada y secada con MgSO₄ anhidro. Luego de separar este último, se evaporó el solvente para favorecer la precipitación del producto. El sólido obtenido fue recristalizado de etanol, recuperado mediante filtración al vacío y lavado con etanol frío.

Los productos **3a-h** se caracterizaron por RMN ¹H, ¹³C, HSQC, y HMBC.

4.4.3. Procedimiento general para la síntesis de *N*-aril-hidrazonas **6a-h**

En un balón de 25 mL se colocó 1 mmol de anilina **4** y se agregaron 5 mL de H₂O y 1,1 mL de HCl 37 % p/p (solución acuosa). La solución se enfrió a 0 °C y se le adicionó gota a gota 1 mL de NaNO₂ 1 M. La mezcla resultante se mantuvo en agitación a 0 °C por 30 min. Luego, se agregó gota a gota, con agitación continua, a un segundo balón conteniendo una mezcla de: 0,09 mL de malononitrilo **5**, 4,22 g de acetato de sodio trihidratado y 8,5 mL de agua, a 0 °C. La mezcla reacción se mantuvo en agitación a 0 °C durante 2 horas, observándose la precipitación de la hidrazona **6**, insoluble en el medio de reacción. Posteriormente, el producto fue aislado mediante filtración al vacío y lavado con abundante agua fría, para eliminar el HCl excedente y otras posibles impurezas. Los productos **6a-h** se caracterizaron por RMN ¹H.

4.4.4. Procedimiento general para la síntesis de 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos **7a-h**

Una mezcla de la hidrazona correspondiente **6** (1 mmol), carbonato de potasio (1 mmol) y bromo acetato de etilo (1 mmol) en DMF (3 mL) fueron calentados en un equipo de reflujo a 90 °C. El tiempo de reacción se determinó mediante TLC frente a testigos de los reactivos, hasta la desaparición total de los mismos, siendo de 5-7 horas, dependiendo de la hidrazona utilizada. Finalizada la reacción, el crudo se volcó sobre una mezcla de hielo y agua, y se mantuvo a 4 °C durante toda la noche. El sólido obtenido fue aislado por filtración al vacío, lavado con agua fría y, posteriormente, recristalizado de etanol.

Los productos **7a-h** se caracterizaron por RMN ^1H , ^{13}C , HSQC-DEPT y HMBC.

4.5. Conclusiones

Con el fin de obtener compuestos precursores de azapurinas de interés biológico, se sintetizaron dos grandes familias de pirazoles de estructuras similares, conteniendo los grupos ciano y amino en diferentes posiciones adyacentes en el anillo.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de diferentes 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3a-h**, por calentamiento convencional y por irradiación con MO. Para las reacciones empleando MO se evaluaron diferentes condiciones con el fin de optimizar la síntesis de estos compuestos.

En general, se obtuvieron mejores rendimientos utilizando MO, y se lograron disminuir considerablemente los tiempos de reacción. Particularmente, para la obtención del 5-amino-1-fenil-pirazol-4-carbonitrilo **3b** se pudieron optimizar las condiciones de reacción en MO y reemplazar parte del solvente orgánico empleado por agua, logrando una síntesis de menor impacto ambiental.

Posteriormente, se sintetizaron los 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos **7a-h**. Para ello, primero se sintetizaron las diciano-hidrazonas **6a-h**, obteniendo excelentes rendimientos, tanto para sustituyentes dadores como tomadores de densidad electrónica.

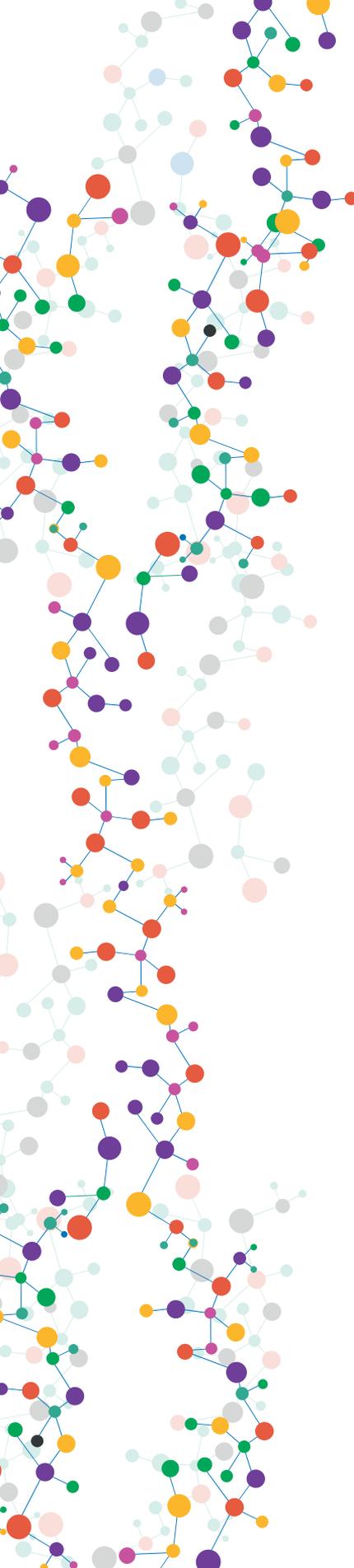
Luego, se optimizaron las condiciones de reacción para la obtención de los pirazoles **7a-h**, a partir de las diciano-hidrazonas **6**, mediante síntesis convencional. Los rendimientos obtenidos fueron de moderados a buenos. Sin embargo, esta vía sintética no se logró optimizar mediante irradiación con MO.

4.6. Referencias bibliográficas

1. Corre, L., Tak-Tak, L., Guillard, A., Prestat, G., Gravier-Pelletier, C., Busca, P. Microwave-assisted preparation of 4-amino-3-cyano-5-methoxycarbonyl-*N*-arylpyrazoles as building blocks for the diversity-oriented synthesis of pyrazole-based polycyclic scaffolds. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 409–423 (2015).
2. Knorr, L. Einwirkung von Acetessigester auf Hydrazinchinizinderivate. *Chem. Ber.* **17**, 546–552 (1883).
3. Patel, M. V., Bell, R., Majest, S., Henry, R., Kolasa, T. Synthesis of 4,5-Diaryl-1*H*-pyrazole-3-ol derivatives as Potential COX-2 Inhibitors. *J. Org. Chem.* **69**, 7058–7065 (2004).
4. Padwa, A., Pearson, W. H. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Vol. 59: Synthetic Applications of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles and Natural Products*. John Wiley & Sons, Nueva York, (2002).
5. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2**, 565–598 (1963).
6. Oliveira-campos, A. M. F., Griffiths, J., Kaja, M., Hrdina, R. Synthesis of novel derivatives of 4-amino-3, 5-dicyanopyrazole. *J. Chem. Res.* 115–117 (2004).
7. Fevig, J. M., Cacciola, J., Buriak, J. Jr, Rossi, K. A., Knabb, R. M., Luetzgen, J. M., Wong, P. C., Bai, S. A., Wexler, R. R., Lam, P. Y. S. Preparation of 1-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-ones as potent, selective and bioavailable inhibitors of coagulation factor Xa. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**, 3755–3760 (2006).
8. Granik, V. G., Kadushkin, A. V. Synthesis of amino derivatives of five-membered heterocycles by Thorpe-Ziegler cyclization. *Adv. Heterocycl. Chem.* **72**, 79–125 (1999).
9. Colomer, J. P., Moyano, E. L. New application of heterocyclic diazonium salts. Synthesis of pyrazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ones and imidazo[4,5-*d*][1,2,3]triazin-4-ones. *Tetrahedron Lett.* **52**, 1561–1565 (2011).
10. Moyano, E. L., Colomer, J. P., Yranzo, G. I. New application of heterocyclic diazonium salts: Synthesis of new pyrazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ones. *European J. Org. Chem.* **2008**, 3377–3381 (2008).
11. Cheng, C. C., Robins, R. K. Potential Purine Antagonists. VI. Synthesis of 1-Alkyl- and 1-Aryl-4-substituted Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines. *J. Org. Chem.* **21**, 1240–1256 (1956).
12. Smith, C. J., Iglesias-Sigüenza, F. J., Baxendale, I. R., Ley, S. V. Flow and

- batch mode focused microwave synthesis of 5-amino-4-cyanopyrazoles and their further conversion to 4-aminopyrazolopyrimidines. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 2758–2761 (2007).
13. Wu, M. H., Hu, J. H., Sheil, D. S., Brémond, P., Guo, H. Regiospecific synthesis of 6-aryl-3-cyano-5-alkylamino/arylamino-1-*p*-tolyl-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7(6*H*)-ones via iminophosphorane-mediated annulation. *Tetrahedron* **66**, 5112–5120 (2010).
 14. Goncalves, M. S. T., Oliveira-Campos, A. M. F., Rodrigues, L. M., Proenca, M. F. R. P. Synthesis of 4-Amino-3,5-dicyano-arylpyrazoles, Part 2: Isolation and Characterization of by-products. *Synth. Commun.* **42**, 1695–1703 (2012).
 15. Moseley, J. D., Kappe, C. O. A critical assessment of the greenness and energy efficiency of microwave-assisted organic synthesis. *Green Chem.* **13**, 794–806 (2011).
 16. Sadler, S., Moeller, A. R., Jones, G. B. Microwave and continuous flow technologies in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **7**, 1107–1128 (2012).
 17. Wathey, B., Tierney, J., Lidström, P., Westman, J. The impact of microwave-assisted organic chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today* **7**, 373–380 (2002).
 18. Garella, D., Boretto, E., Di Stilo, A., Martina, K., Cravotto, G., Cintas, P. Microwave-assisted synthesis of N-heterocycles in medicinal chemistry. *Med. Chem. Commun.* **4**, 1323–1343 (2013).
 19. Mavandadi, F., Pilotti, Å. The impact of microwave-assisted organic synthesis in drug discovery. *Drug Discov. Today* **11**, 165–174 (2006).
 20. Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Labrege, L., Rousell, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **27**, 279–282 (1986).
 21. Giguere, R. J., Bray, T. L., Duncan, S. M., Majtich, G. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **27**, 4945–4948 (1986).
 22. Brown, W. H., Foote, C. S., Iverson, B. L., Anslyn, E. V. *Organic Chemistry*. Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, (2012).
 23. Loupy, A. *Microwaves in Organic Synthesis*. Wiley-VCH, Darmstadt, (2002).
 24. Kappe, C. O., Dallinger, D., Murphree, S. S. *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols*. Wiley-VCH, Weinheim (2009).
 25. Mingos, D. M. P., Baghurst, D. R. Applications of Microwave Dielectric

- Heating Effects to Synthetic Problems in Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **20**, 1–47 (1991).
26. Gabriel, C., Gabriel, S., Grant, E. H., Halstead, B. S. J., Mingos, D. M. P. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chem. Soc. Rev.* **27**, 213–223 (1998).
 27. Borja, E. F. HR, la estrella de los diagramas en astrofísica. *Cultura Científica, UPV/EHU* <https://culturacientifica.com/2016/10/21/hr-la-est> (2016).
 28. Bilecka, I. & Niederberger, M. Microwave chemistry for inorganic nanomaterials synthesis. *Nanoscale* **2**, 1358 (2010).
 29. Kappe, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chemie* **43**, 6250–6284 (2004).
 30. Perreux, L., Loupy, A. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron* **57**, 9199–9223 (2001).
 31. Cvangros, J., Toma, S., Marque, S., Loupy, A. Synthesis of phosphonium salts under microwave activation-Leaving group and phosphine substituents effects. *Can. J. Chem.* **82**, 1365–1371 (2004).
 32. Loupy, A., Maurel, F., Sabatié-Gogová, A. Improvements in Diels-Alder cycloadditions with some acetylenic compounds under solvent-free microwave-assisted conditions: Experimental results and theoretical approaches. *Tetrahedron* **60**, 1683–1691 (2004).
 33. Kappe, C. O., Pieber, B., Dallinger, D. Microwave effects in organic synthesis: Myth or reality? *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 1088–1094 (2013).
 34. Rivilli, M. J. L., Moyano, E. L., Yranzo, G. I. An alternative approach toward 2-aryl-2H-pyrazolo[4,3-c]-quinolin-3-ones by a multistep synthesis. *Tetrahedron Lett.* **51**, 478–481 (2010).
 35. Desai, N. D., Shah, R. D. Improved Protocol for Thorpe Reaction: Synthesis of 4-Amino-1-arylpyrazole using Solid–Liquid Phase-Transfer Conditions. *Synth. Commun.* **38**, 316–327 (2008).



PARTE II

SÍNTESIS DE AZAPURINAS

Capítulo 5

SÍNTESIS DE
PIRAZOLO[1,2,3]TRIAZIN-4-ONAS

5.1. Introducción

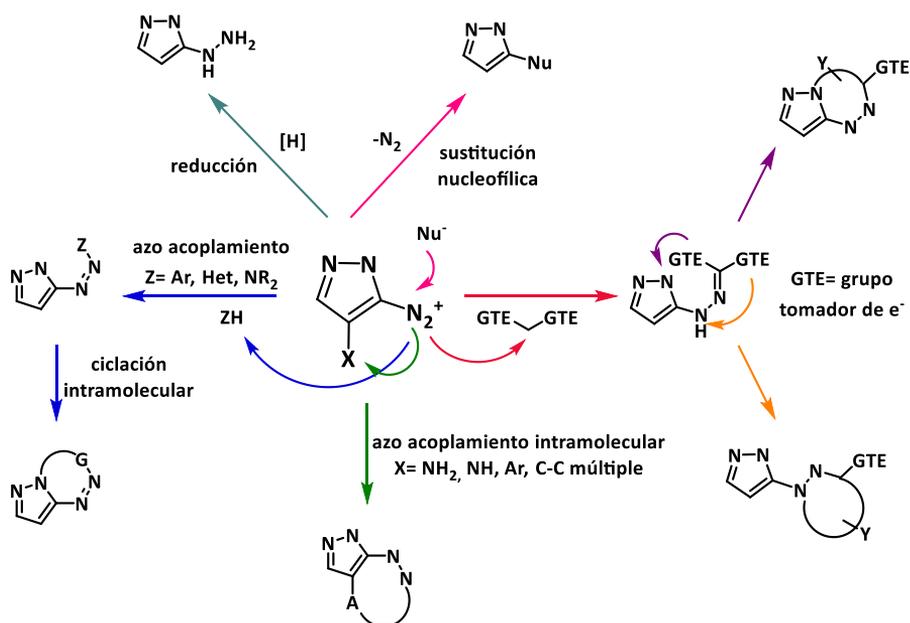
5.1.1. Antecedentes de la síntesis de pirazolotriazinas

Las reacciones de sales de diazonio de pirazoles han sido ampliamente estudiadas, y permiten la obtención de intermediarios de suma importancia para la síntesis de heterociclos. Con este tipo de reacciones se pueden generar un gran número de derivados de pirazoles tales como hidrazinas, triazenos, formazanes (azohidrazonas), hidrazonas y azo compuestos, entre otros. Las reacciones que puede sufrir el grupo diazo de un pirazol se resumen en el Esquema 5.1.¹

En algunos casos, los derivados de azo compuestos o hidrazonas obtenidos sufren una condensación intramolecular espontánea. La ciclación puede ocurrir mediante el ataque del grupo diazo a un fragmento nucleofílico adyacente, o a través de su acoplamiento con el N endocíclico del anillo de pirazol o el N del fragmento hidrazona. Estas reacciones dan como resultado poliheterociclos condensados o unidos linealmente, tal como se observa en el Esquema 5.1.¹

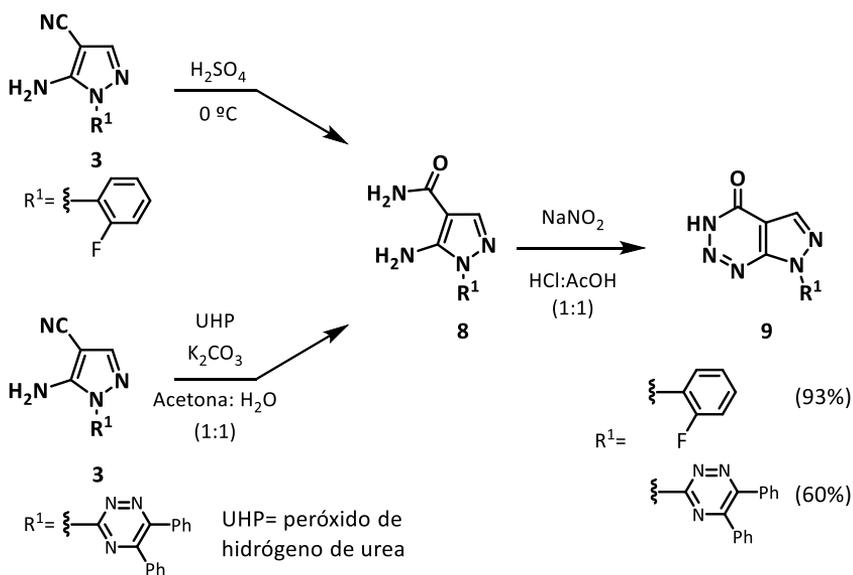
Las sales de diazonio de pirazoles conteniendo un sustituyente propenso al ataque electrofílico (NH_2 , NH , OH , SH , alquilo, arilo, etc.) en la posición *orto* al grupo diazo (sustituyente X, Esquema 5.1), son susceptibles a la ciclación intramolecular espontánea, formando un heterociclo condensado al núcleo del pirazol. De esta manera, se pueden sintetizar pirazolo[3,4-*c*]piridazinas, pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazinas, pirazolo[3,4-*e*][1,2,3,4]tetrazinas y otros policiclos, dependiendo de la naturaleza del sustituyente que se encuentre en posición *orto* al grupo diazo en el pirazol de partida.¹

A continuación, se resumen algunos ejemplos más relevantes para la obtención de pirazolo[1,2,3]triazinas, objeto de estudio de este trabajo, a través de la formación de la sal de diazonio de los correspondientes pirazoles de partida.



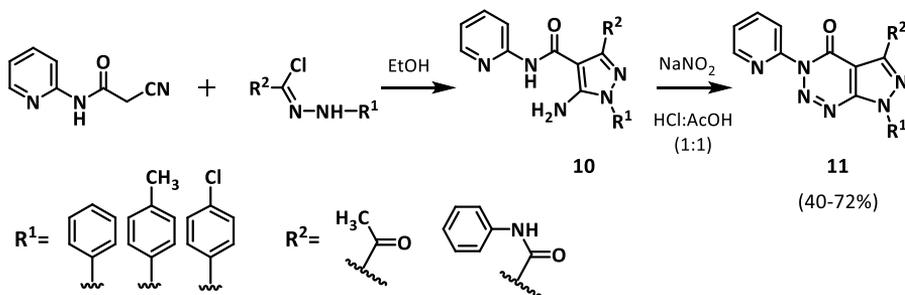
Esquema 5.1. Ejemplos de transformaciones de sales de diazonio de α -pirazoles.

Diversos autores han descrito la formación de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazinas a partir de 5-amino-pirazol-4-carboxamidas **8**.^{2,3} En algunos casos, se parte de 5-amino-pirazoles-4-carbonitrilos **3**, por lo que el primer paso consta de una modificación del grupo ciano en la posición 4 del anillo para la obtención del sustituyente amida. En el Esquema 5.2 se muestran dos ejemplos diferentes, donde se parte de un pirazol-4-carbonitrilo **3** para la generación de la carboxamida **8** correspondiente, bajo distintas condiciones de reacción. Una vez obtenida **8**, se la hace reaccionar con nitrito de sodio en medio ácido, para formar la sal de diazonio en la posición 5 del pirazol. El ataque electrofílico del grupo diazo sobre la amida conduce a la ciclación intramolecular y formación del anillo de triazina, produciendo la pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ona **9**.^{2,3}



Esquema 5.2. Síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **9** a partir de 5-amino-pirazol-4-carboxamida **8**.

Por otro lado, se ha descrito la síntesis de una pirazolocarboxamida **10** sustituida en el grupo amida.⁴ Cuando este tipo de compuestos son sometidos a condiciones de diazotación, se produce la formación de la sal de diazonio correspondiente y posterior ciclación intramolecular, obteniéndose la pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ona **11** sustituida en el nitrógeno 3 (Esquema 5.3).⁴

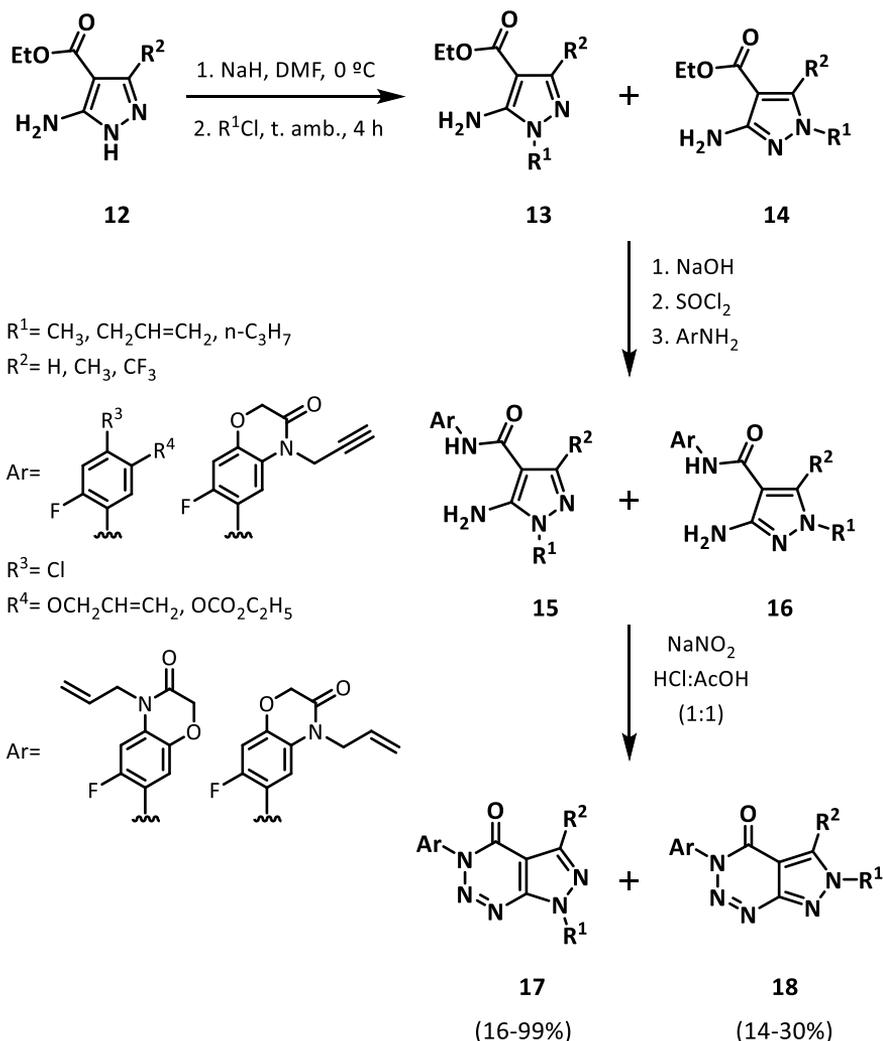


Esquema 5.3. Obtención de pirazolotriazinona **11** N-sustituida.

Li y colaboradores⁵ describieron la obtención de dos familias de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas sustituidas en el N-3 del anillo de triazina. En el Esquema 5.4 se muestran ambas vías sintéticas para la obtención de las pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **17** y **18**, que difieren en la posición del sustituyente R¹, según sea el pirazol de partida. En los dos casos, para la obtención de las triazinonas se sintetiza como intermediario el derivado 4-carboxamida (**15** ó **16**) del pirazol correspondiente (**13** ó **14**). Las condiciones de reacción para formar el anillo de triazinona son las mismas mencionadas para los ejemplos anteriores. Éstas consisten en formar la sal de diazonio del 5-amino-pirazol-4-carboxamida para que se produzca la ciclación mediante el ataque electrofílico intramolecular al grupo amida.⁵

El compuesto de partida en el Esquema 5.4 es el NH-pirazol **12**. La alquilación produce una mezcla de productos, los pirazoles **13** y **14**, ya que la sustitución se puede dar en ambos nitrógenos endocíclicos. A partir de éstos, se obtienen las carboxamidas correspondientes **15** y **16**, de polaridad muy similar, es por eso que se utiliza su mezcla para la posterior reacción de diazotación. El último paso da como resultado la formación de las pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **17** y **18**, sustituidas en el N-3.⁵

Al analizar la vía sintética del Esquema 5.4, se puede deducir que la pirazolotriazinona resultante depende de la naturaleza del pirazol de partida. De esta forma, se pueden obtener distintas series de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas de acuerdo a las posiciones de los sustituyentes del sustrato. Cabe aclarar que, la posición relativa entre los sustituyentes carboxamida, amina y R² en los pirazoles **15** y **16** es la misma, es por eso que se obtienen las pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazinonas **17** y **18**, cuya fusión entre los anillos de pirazol y triazinona se mantiene igual.



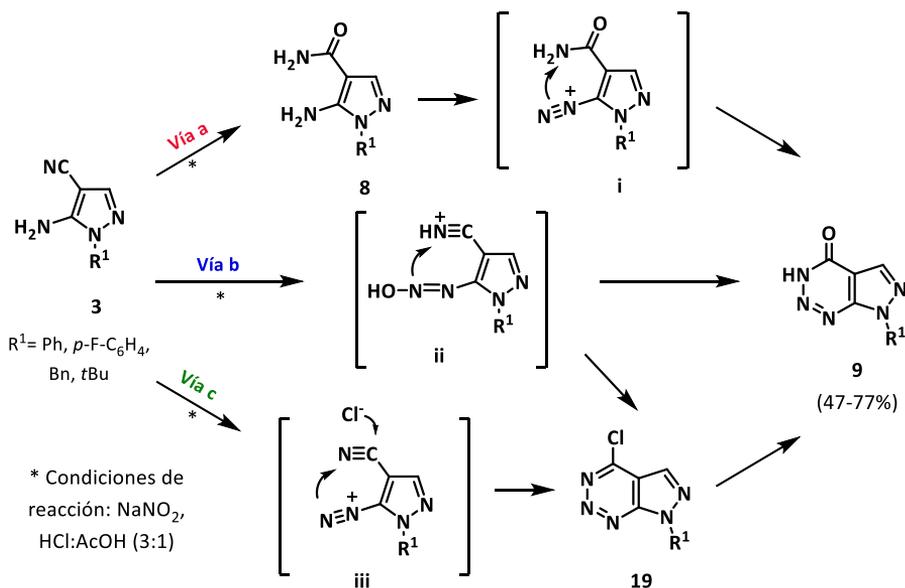
Esquema 5.4. Síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **17** y **18** sustituidas en el *N*-3 a partir del etil 5-amino-pirazol-4-carboxilato **12**.⁵

Por otro lado, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una metodología sencilla para la obtención de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazinonas, mediante la diazotación directa de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3**.^{6,7} De esta forma, se puede preparar un gran número de pirazolotriazinonas, con buenos rendimientos, mediante un proceso *one-pot*, sin sintetizar previamente el

intermediario amino-pirazol-4-carboxamida que se observó en los ejemplos anteriores.^{6,7}

Tres mecanismos diferentes se han planteado para explicar la reacción de los 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3**, que se muestran en el Esquema 5.5. La vía a propone la formación de una pirazol-4-carboxamida **8** *in situ*, seguido de la diazotación y ciclación intramolecular, para dar lugar a la pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazinona **9**.⁶

La vía b sugiere la formación del ion nitrilio **ii**, que luego puede ciclar para formar la pirazolotriazinona **9**, o dar lugar a la pirazolotriazina **19**, clorada en posición 4, previamente a la formación de **9**. Se ha propuesto que la hidrólisis del compuesto **19**, para obtener **9**, se encuentra muy favorecida, ya que no se pudo detectar experimentalmente la presencia de **19**, bajo ninguna condición evaluada.⁶



Esquema 5.5. Mecanismos propuestos para la obtención de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazinonas **9** a partir de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3**.⁶

Por último, la vía *c*, plantea la diazotación inicial del pirazol de partida y formación del intermediario **iii**, seguido de un ataque de los iones cloruros. Así, se obtiene la pirazolotriazina clorada **19**, que por hidrólisis da como resultado el compuesto **9**.⁶

La diazotación directa de los amino-pirazol-carbonitrilos es un método sintético sencillo y eficiente, que permite generar una familia de pirazolotriazinonas modificando únicamente el pirazol de partida. Esta metodología presenta ventajas desde el punto de vista sintético, debido a la vasta funcionalización que puede lograrse en los productos que se obtienen.

Teniendo en cuenta los antecedentes sintéticos expuestos, y la amplia actividad biológica que poseen los análogos de purinas, en esta Tesis Doctoral se desarrolló específicamente la síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas y las pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-4-onas, cuyas estructuras se observan en la Figura 5.1. Para ello, se utilizaron las series de amino-pirazol carbonitrilos **3** y **7**, sintetizados anteriormente.

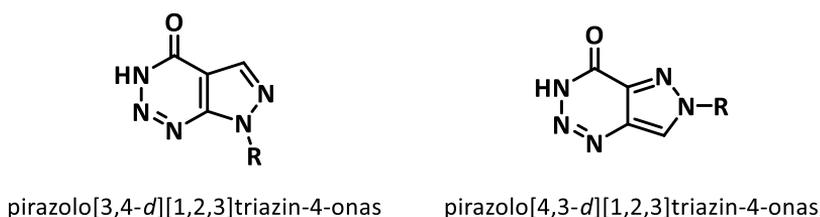


Figura 5.1. Estructuras de los núcleos de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas y pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-4-onas.

5.2. Objetivos específicos

Con el fin de obtener análogos de purinas de interés biológico, en este capítulo se estudió la síntesis de dos familias de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas. Para ello, se utilizó como precursores los amino-pirazol-carbonitrilos **3** y **7**, sintetizados previamente. Además, se sintetizaron derivados *N*3-heteroaril de una serie de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas.

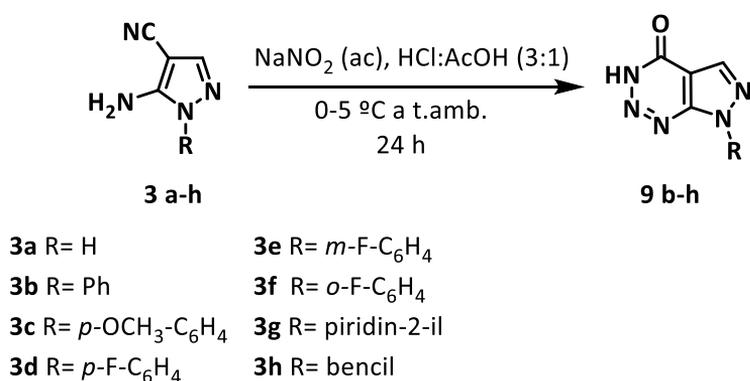
Los objetivos específicos de esta parte de la investigación se detallan a continuación:

- Sintetizar pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas a partir de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3a-h**.
- Sintetizar pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos a partir de etil 3-ciano-4-amino-pirazol-5-carboxilatos **7a-h**.
- Sintetizar nuevos derivados de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas funcionalizadas en *N*-3.
- Realizar el estudio teórico y experimental del mecanismo de reacción involucrado en la obtención de pirazolotriazinonas 3-sustituidas.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas

La síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas a partir de 5-amino-pirazoles 4-carbonitrilos fue desarrollada en nuestro grupo de investigación.^{6,7} Esta metodología consiste en la reacción del grupo amino de la posición 5 del anillo de pirazol con NaNO_2 , en medio ácido, a 0 °C, para generar la sal de diazonio correspondiente. Inmediatamente, se produce una ciclación intramolecular del ion diazonio, dando lugar a la formación de las pirazolotriazinonas, tal como se describió en la sección anterior. Por medio de esta metodología, se sintetizaron las pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **9b-h** (Esquema 5.6). Los compuestos **9b**, **9d** y **9h** fueron sintetizados previamente en nuestro grupo de trabajo,⁷ mientras que los núcleos restantes fueron obtenidos por primera vez durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Para llevar a cabo la síntesis de estas pirazolotriazinonas se utilizaron como compuestos de partida 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3a-h**, obtenidos anteriormente.



Esquema 5.6. Síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazinonas **9b-h** a partir de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3**.

Los rendimientos obtenidos para la síntesis de las pirazolotriazinas **9b-h** se muestran en la Tabla 5.1. En general, éstos fueron de moderados a muy buenos, excepto para el pirazol **3a**, a partir del cual no se obtuvo la pirazolotriazinona correspondiente, sino que se recuperó el sustrato en su mayor parte.

Tabla 5.1. Síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **9b-h**.

Compuesto	R	Rendimiento (%) ^a
9a	H	- ^b
9b	Ph	77
9c	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	88
9d	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	70
9e	<i>m</i> -F-C ₆ H ₄	52
9f	<i>o</i> -F-C ₆ H ₄	64
9g	piridin-2-il	39
9h	bencil	50

(a) Producto aislado. (b) Sin conversión.

La estabilidad y reactividad de las sales de pirazoldiazonio dependen fuertemente de la naturaleza del/de los sustituyente/s en el anillo. De esta forma, grupos dadores de densidad electrónica generalmente estabilizan el grupo diazo, mientras que sustituyentes tomadores lo desestabilizan, aumentando su electrofilicidad.¹

Si se tienen en cuenta estas consideraciones, se puede explicar por qué no se pudo obtener la pirazolotriazinona **9a**. Por lo tanto, la falta de conversión de **3a** podría atribuirse al carácter del sustituyente del N-1, que evitaría la formación de la sal de diazonio. Sin embargo,

también podría ocurrir que se forme la sal de diazonio en baja proporción, pero que sea inestable y no alcance a ciclar para formar el anillo de triazinona.

Los compuestos **9b-h** fueron caracterizados mediante RMN. La estructura de los tautómeros de las 3*H*-pirazolotriazinonas fue confirmada por experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC-DEPT y HMBC. Dicha información se encuentra en la sección Anexo.

Entre las señales más características, para el compuesto **9b** se observó un singlete correspondiente al H-5 a 8,62 ppm y un singlete ancho a 15,30 ppm, indicando la presencia del grupo $-\text{NH}$. En el espectro de RMN de ^{13}C se asignaron los carbonos aromáticos, entre ellos el C-5, característico del anillo de pirazol, a 135,40 ppm y el C del grupo carbonilo a 154,06 ppm. A modo de ejemplo, en la Figura 5.2 se observan los desplazamientos químicos de H y C para el compuesto **9b**.

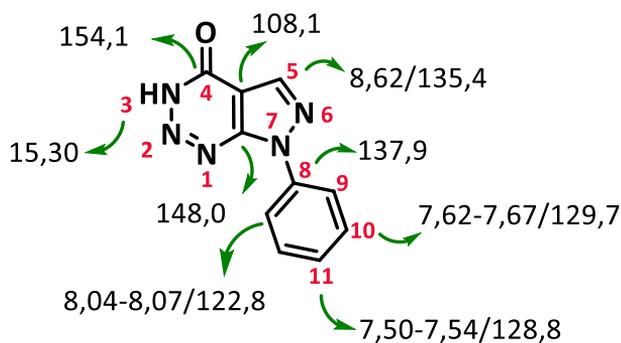
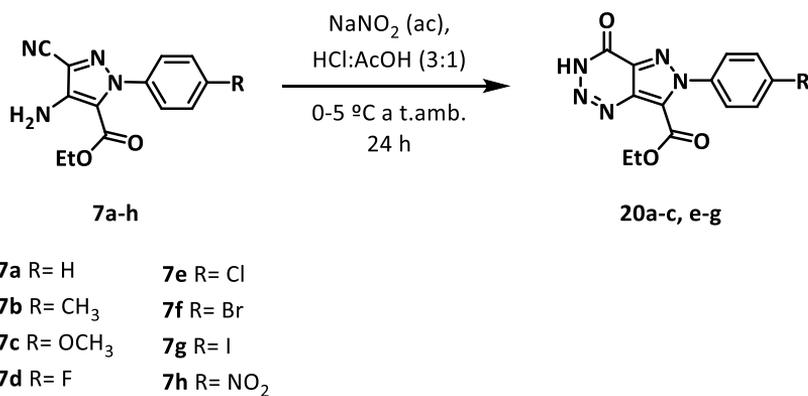


Figura 5.2. Asignaciones de H/C (en ppm) para el compuesto **9b**.

5.3.2. Síntesis de pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos

Se llevó a cabo la síntesis de nuevos derivados de pirazolotriazinonas, los 4-oxo-pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos de etilo **20**. Para ello, se utilizó la metodología previamente descrita, utilizada para la síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazinonas **9**.

Los compuestos **20** se obtuvieron a partir de los pirazoles **7a-h**, previamente sintetizados, como se muestra en el Esquema 5.7. Los rendimientos alcanzados para la formación de esta nueva serie de pirazolotriazinonas se observa en la Tabla 5.2. En general, éstos fueron moderados, debido a las dificultades encontradas en la separación de los compuestos de la mezcla de reacción. Para el caso de la diazotación de **7d** y **7h**, no se obtuvieron las correspondientes pirazolotriazinonas, ya que no hubo conversión del pirazol luego de las 24 horas de reacción. Dicho hecho se podría atribuir, probablemente, al carácter electronegativo de sus sustituyente (F y NO₂), que desestabilizarían o incluso impedirían la formación de la sal de diazonio.



Esquema 5.7. Síntesis de 4-oxo-pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos de etilo **20** a partir de etil 3-ciano-4-amino-pirazol-5-carboxilatos **7**.

Tabla 5.2. Síntesis de 4-oxo-pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos de etilo **20**.

Compuesto	R	Rendimiento (%) ^a
20a	H	35
20b	CH ₃	38
20c	OCH ₃	28
20d	F	- ^b
20e	Cl	31
20f	Br	36
20g	I	33
20h	NO ₂	- ^b

(a) Producto purificado por cromatografía en columna.

(b) Sin conversión.

Al comparar los resultados obtenidos para la síntesis de las pirazolotriazinonas **9** y **20**, se observó que los rendimientos fueron mayores en el caso de los derivados **9**. En ambas series, se observó la influencia del sustituyente del N-1 del pirazol de partida, en la estabilidad de la sal de diazonio, ya que para **3a**, **7d** y **7h**, no se lograron las pirazolotriazinonas correspondientes. Además, la presencia del grupo carboetoxi en la familia de los pirazoles **7** también podría estar involucrado en la estabilidad de la sal de diazonio.

Asimismo, se presentaron algunas dificultades durante los pasos posteriores a la síntesis de los productos **20**, en la recuperación de los productos desde el medio de reacción. Esto hizo que los rendimientos fueran menores que los obtenidos para las pirazolotriazinonas **9**. La presencia del grupo carboetoxi en el C-7 de la

familia de pirazolotriazinonas **20** también podría estar implicado en las dificultades encontradas en los pasos de separación y purificación.

Por otro lado, cabe destacar que la metodología empleada para la formación del ion diazonio se logró utilizar en una nueva familia de amino-pirazoles carbonitrilos. De esta forma, se obtuvieron los pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos **20**, mediante la diazotación directa de sus precursores, utilizando un método *one-pot* sencillo. Esto podría indicar que la variación de la posición de los grupos ciano y amino en el anillo pirazol no afecta a la formación de la triazinona, siempre y cuando se encuentren en posiciones adyacentes.

Todos los compuestos obtenidos son nuevos y fueron caracterizados por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) y RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC. Dicha información se encuentra en la sección Anexo. A modo de ejemplo, en la Figura 5.3 se observan los desplazamientos químicos de los carbonos y las correlaciones H-C de largo alcance obtenidas a partir del espectro HMBC para el compuesto **20b**. Este análisis permitió la asignación de ambos grupos carbonilos, uno correspondiente al anillo de triazina (152 ppm) y el otro del grupo carboetoxi (157 ppm). Además, se estableció una correlación entre el H-3 del NH (15 ppm) y el carbono del grupo carbonilo (152 ppm) de la triazina, lo que confirma la presencia del tautómero *3H*.

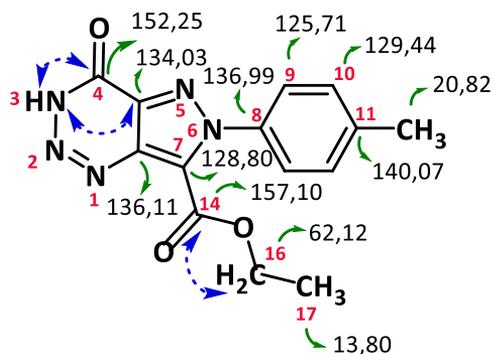


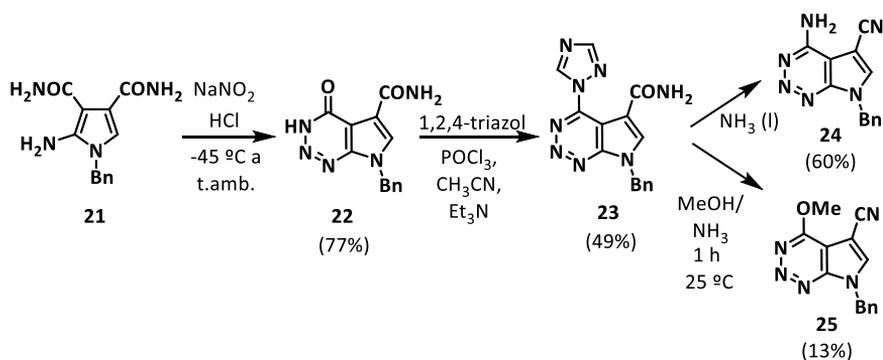
Figura 5.3. Asignación de ^{13}C (en ppm) y correlaciones HMBC para 4-oxo-6-(*p*-tolil)-4,6-dihidro-3*H*-pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilato de etilo, **20b**.

5.3.3. Síntesis de pirazolotriazinonas funcionalizadas en el N-3

En esta sección se llevó a cabo la síntesis de nuevos derivados de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas **9** funcionalizadas en el N-3, a partir de una reacción de acople con pérdida de nitrógeno. A continuación, se describen los antecedentes más relevantes que se tuvieron en cuenta para realizar el estudio teórico y experimental del mecanismo de reacción involucrado en la obtención de dichos compuestos.

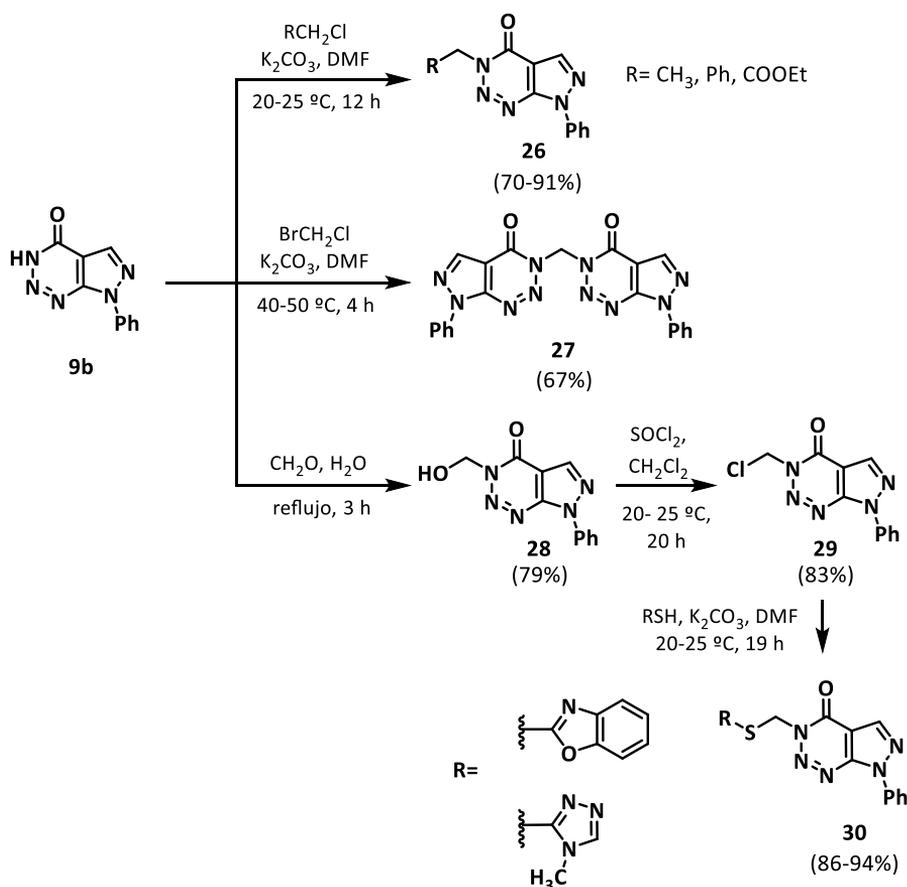
5.3.3.1. Reactividad de las azolo[1,2,3]triazinas

La síntesis de las azolo[1,2,3]triazin-4-onas, ha sido extensamente estudiada, ya que presentan una amplia actividad biológica debido a su similitud estructural con las bases de purinas. Además, estos heterociclos pueden ser modificados en distintas posiciones o sufrir rupturas en el anillo, lo que conduce a una gran variedad de derivados.⁸ Diversos autores han descrito la síntesis de azolo[1,2,3]triazin-4-onas y posterior modificación en el grupo carbonilo. De esta manera, se pueden obtener las azolo-triazinas 4-sustituidas.^{2,9,10} Por ejemplo, Migawa y col.¹⁰ han reportado la síntesis de 7-bencil-pirrolo[2,3-*d*][1,2,3]triazin-4-ona **22**, y la posterior modificación en el grupo carbonilo (Esquema 5.8).



Esquema 5.8. Obtención de derivados de pirrolo[1,2,3]triazinas 4-sustituidas.

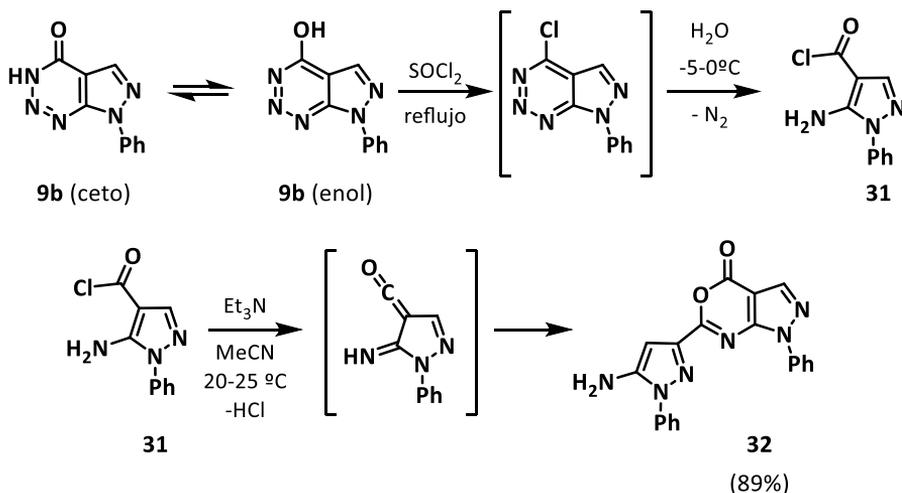
Asimismo, se han estudiado modificaciones en el *N*-3 del anillo de las azolotriazinas. Así, se pueden obtener derivados *N*-alquil, *N*-aril o incluso con otros sustituyentes más complejos.¹¹ En el Esquema 5.9 se resumen las síntesis de azolotriazinas **26-30** sustituidas en el *N*-3, reportada por Gurenko y col.⁸ En este ejemplo, la reacción de la pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ona **9b** con bromoclorometano da como resultado el compuesto **27**. En su estructura, el anillo de pirazolotriazinona está sustituido en el *N*-3 por otra molécula de **9b**, unidas entre sí por un grupo metileno.⁸



Esquema 5.9. Obtención de derivados de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas sustituidas en *N*-3.

Por otro lado, se han descrito reacciones donde se produce una ruptura del anillo de triazina de la azolo[1,2,3]triazin-4-ona, con pérdida de nitrógeno. Como resultado, se obtiene el derivado azolo correspondiente. Diversos autores han estudiado el mecanismo por el cual se produce la extrusión de nitrógeno. En todos los casos se ha encontrado como intermediario de estas reacciones una iminocetena, ¹²⁻¹⁴ que se encuentra en equilibrio con su forma cíclica, una azetinona. ¹⁵⁻¹⁹

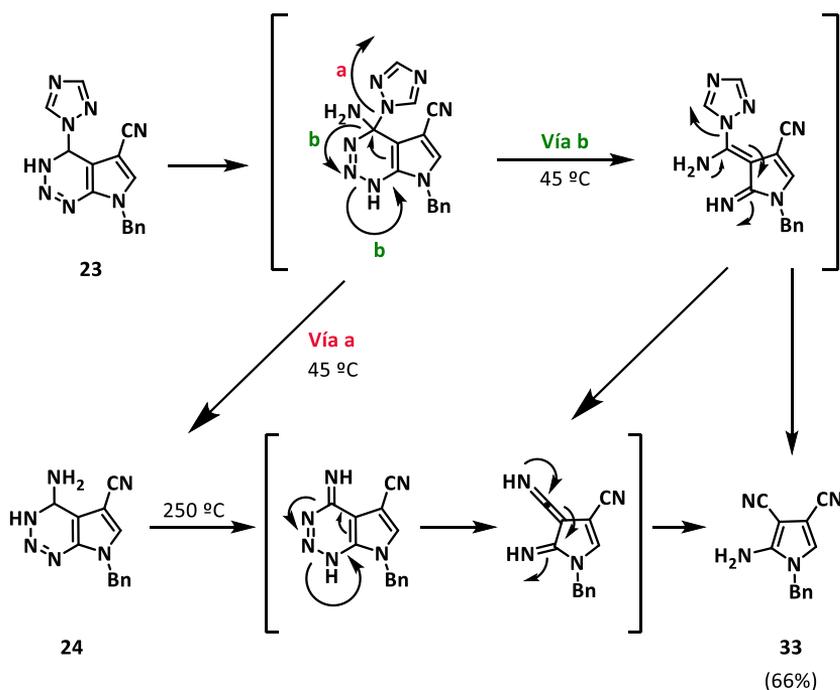
Khutova y col., ¹⁴ han estudiado la reacción de 7-fenilpirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ona **9b** con cloruro de tionilo y luego su hidrólisis a bajas temperaturas. Como resultado, se obtiene el cloruro de ácido **31** del 5-aminopirazol, producto de la pérdida de nitrógeno del compuesto **9b**. La reacción de este cloruro de ácido con Et₃N en acetonitrilo da como resultado la iminocetena correspondiente, por pérdida de HCl. Esta iminocetena dimeriza para obtener, finalmente, la 6-(pirazol-4-il)-pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]oxazin-4-ona **32** (Esquema 5.10). ¹⁴



Esquema 5.10. Síntesis de oxazin-4-ona **32** a partir de **9b** mediante la dimerización del intermediario iminocetena.

Además, se ha reportado que, bajo condiciones drásticas de reacción, a temperaturas mayores a 250 °C, se produce la ruptura del anillo de triazina de pirrolo[1,2,3]triazinas, seguido de una pérdida de nitrógeno, obteniéndose como resultado el pirrol **33**. El mecanismo propuesto para esta reacción se representa en el Esquema 5.11.^{10,20}

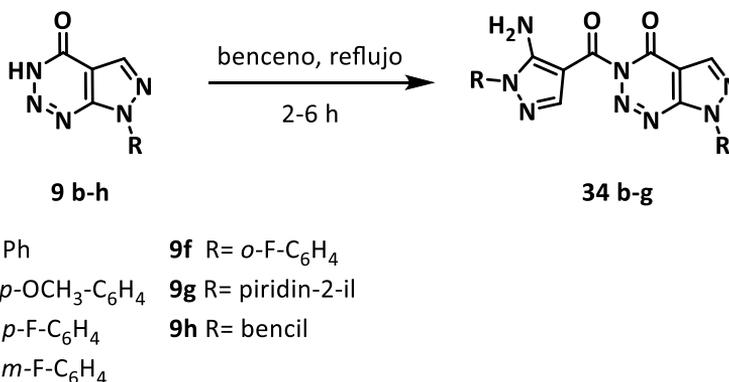
Las reacciones de pérdida de nitrógeno de las azolotriazinas para la preparación de heterociclos no han sido muy estudiadas, con excepción de algunos casos específicos. Teniendo esto en cuenta, se llevó a cabo la síntesis de 3-(5-amino-1*H*-pirazol-4-carbonil)-3,7-dihidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas, a partir de pirazolotriazinonas **9**, obtenidas previamente. La síntesis de estos derivados involucró una etapa de eliminación de nitrógeno a partir de la pirazolotriazina sustrato, y su mecanismo fue estudiado exhaustivamente por métodos teóricos y experimentales.



Esquema 5.11. Ruptura del anillo de triazina con pérdida de nitrógeno para la obtención del derivado de pirrol **33**.^{10,20}

5.3.3.2. Síntesis de 3-(5-amino-1*H*-pirazol-4-carbonil)-3,7-dihidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas

Se llevó a cabo la síntesis de pirazolotriazinonas sustituidas en el *N*-3 a partir de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **9b-h**. Para ello, se realizó el tratamiento térmico de las pirazolotriazinonas **9** en benceno a reflujo, por un período de 2-6 horas, dependiendo del sustrato de partida. Bajo estas condiciones, se obtuvieron como producto 3-(5-amino-1*H*-pirazol-4-carbonil)-3,7-dihidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **34**, tal como se muestra en el Esquema 5.12. Los rendimientos obtenidos para los compuestos **34b-g** se detallan en la Tabla 5.3. Estos valores fueron de moderados a buenos, excepto para el compuesto **34g**, cuyo rendimiento fue solamente del 9% (determinado de la mezcla de reacción por RMN), observándose la formación de subproductos.



Esquema 5.12. Síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas *N*-sustituidas **34** a partir de las pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **9**.

Tabla 5.3. Síntesis de 3-(5-amino-pirazol-4-carbonil)pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **34**.

Compuesto	R	t (h)	Rendimiento (%)
34b	Ph	1,5	67 ^a
34c	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	3	46 ^a
34d	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	1,5	62 ^a
34e	<i>m</i> -F-C ₆ H ₄	2	51 ^a
34f	<i>o</i> -F-C ₆ H ₄	1,5	66 ^a
34g	piridin-2-il	6	9 ^b
34h	bencil	6	- ^c

(a) Producto aislado. (b) Determinado por RMN ¹H. (c) No hubo conversión.

La elucidación estructural de los compuestos **34b-g** requirió de un análisis espectroscópico exhaustivo y las estructuras fueron confirmadas por experimentos de RMN ¹H, ¹³C, HSQC, HMBC, IR y EMAR.

A modo de ejemplo, en el análisis del espectro RMN ¹H del compuesto **34b**, se pudo observar un singlete a 7,74 ppm, asignado al H-13 del anillo de pirazol. Además, aparece un singlete a 8,54 ppm correspondiente al H-5 de la pirazolotriazina y una señal ancha atribuida a la presencia de los protones del sustituyente amino (6,94 ppm). Los espectros RMN ¹³C y 2D permitieron asignar ambos C carbonílicos, uno correspondiente al anillo de triazina a 152,9 ppm, y el que une la triazina con el anillo de pirazol, a 163,6 ppm. Además, se pudieron distinguir los carbonos olefínicos 5 (136,5 ppm), 13 (142,6 ppm), 5a (109,4 ppm), 7a (148,6 ppm) y 12 (100,7 ppm). En la Figura 5.4 se muestran los valores de desplazamiento químico obtenidos para algunos H, C y las correlaciones más relevantes de **34b**.

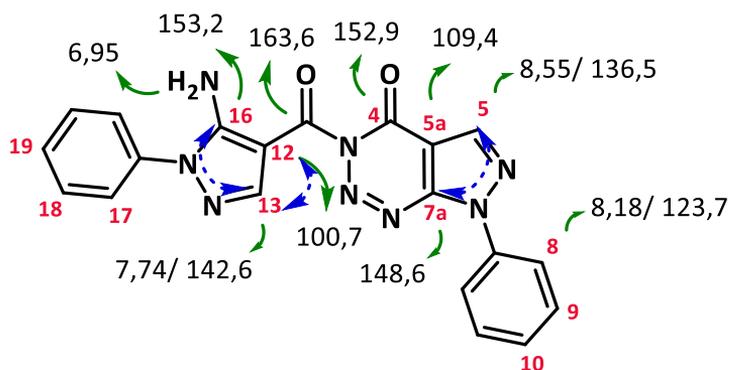


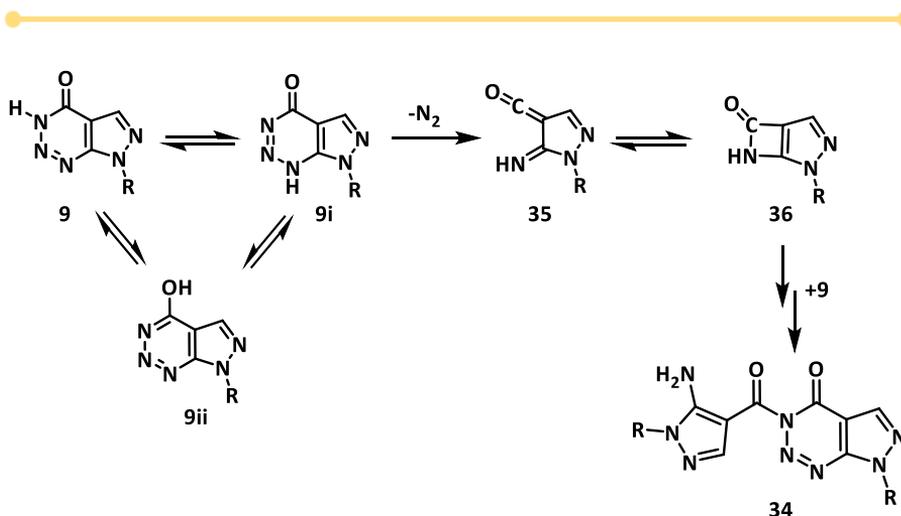
Figura 5.4. Asignaciones de los H/C (en ppm) y correlaciones principales para el compuesto **34b**.

Mediante EMAR, se determinó la masa exacta de cada uno de estos compuestos. Además, en el análisis del espectro IR, se encontró la presencia de dos bandas correspondientes al estiramiento C=O de ambos enlaces carbonilos, a 1716 y 1692 cm^{-1} , y una señal típica a del estiramiento del enlace N-H a 3461 cm^{-1} .

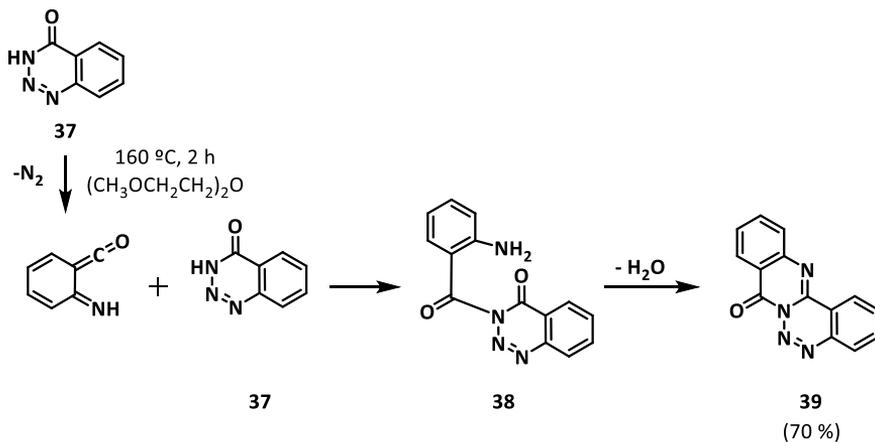
5.3.3.3. Estudio del mecanismo de reacción para la obtención de 3-(5-amino-1H-pirazol-4-carbonil)-3,7-dihidro-4H-pirazolo[3,4-d][1,2,3]triazin-4-onas

La síntesis de 3-(5-amino-pirazol-4-carbonil)pirazolotriazinonas **34** consiste en una reacción de combinación de dos moléculas de pirazolotriazinona **9** e involucra la pérdida de nitrógeno. Como se detalló previamente, este tipo de reacciones se encuentra descrito en bibliografía solo para núcleos de benzotriazinonas, mientras que no se conocen antecedentes para el caso de derivados de azolotriazinonas. Teniendo esto en cuenta, se llevó a cabo un estudio experimental y teórico con el fin de proponer un mecanismo de reacción para la formación de los derivados **34**.

En primer lugar, se planteó la posibilidad de la formación del intermediario iminocetena **35**, mediante la pérdida de una molécula de nitrógeno a partir de uno de los tautómeros de **9**, en un paso concertado. El intermediario **35** puede coexistir con su análogo cíclico, azetinona **36**, como se observa en el Esquema 5.13. La formación de una iminocetena, como intermediario de reacción, puede ser considerada análoga a la conversión térmica de 1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-onas para dar quinazolin[3,2-*c*][1,2,3]benzotriazin-8-onas reportadas en bibliografía.^{21,22} En dicha reacción (Esquema 5.14), el intermediario mencionado se formaría a partir de 1,2,3-benzotriazin-4-ona **37**, mediante la pérdida de nitrógeno molecular. Esta iminocetena reacciona posteriormente con una especie nucleofílica, en este caso otra molécula de 1,2,3-benzotriazin-4-ona **37**, para dar lugar, finalmente, al producto quinazolin[3,2-*c*][1,2,3]benzotriazin-8-ona **39**, por eliminación de una molécula de agua.^{21,22}

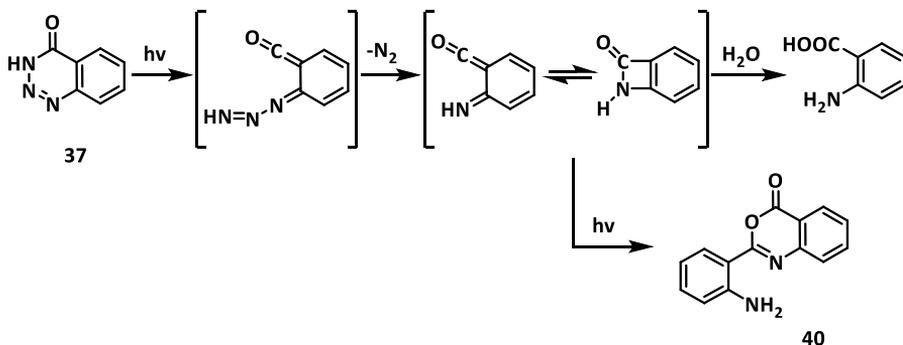


Esquema 5.13. Formación de iminocetena **35** como posible intermediario de reacción en el tratamiento térmico de pirazolotriazinonas **9**.



Esquema 5.14. Termólisis de 1,2,3-benzotriazin-4-ona **37** para la generación de quinazolin[3,2-*c*][1,2,3]benzotriazin-8-ona **39**.

Además, se ha reportado la reacción fotoquímica de **37** (Esquema 5.15) en la cual se plantea la apertura del anillo de triazina seguido de una pérdida de nitrógeno molecular, para dar lugar al intermediario iminocetena, que en presencia de agua se hidroliza y forma el ácido 2-aminobenzoico. En ausencia de agua, la iminocetena dimeriza, dando como resultado el producto benzo[1,3]oxazin-4-ona **40**, como se observa en el Esquema 5.15.²³

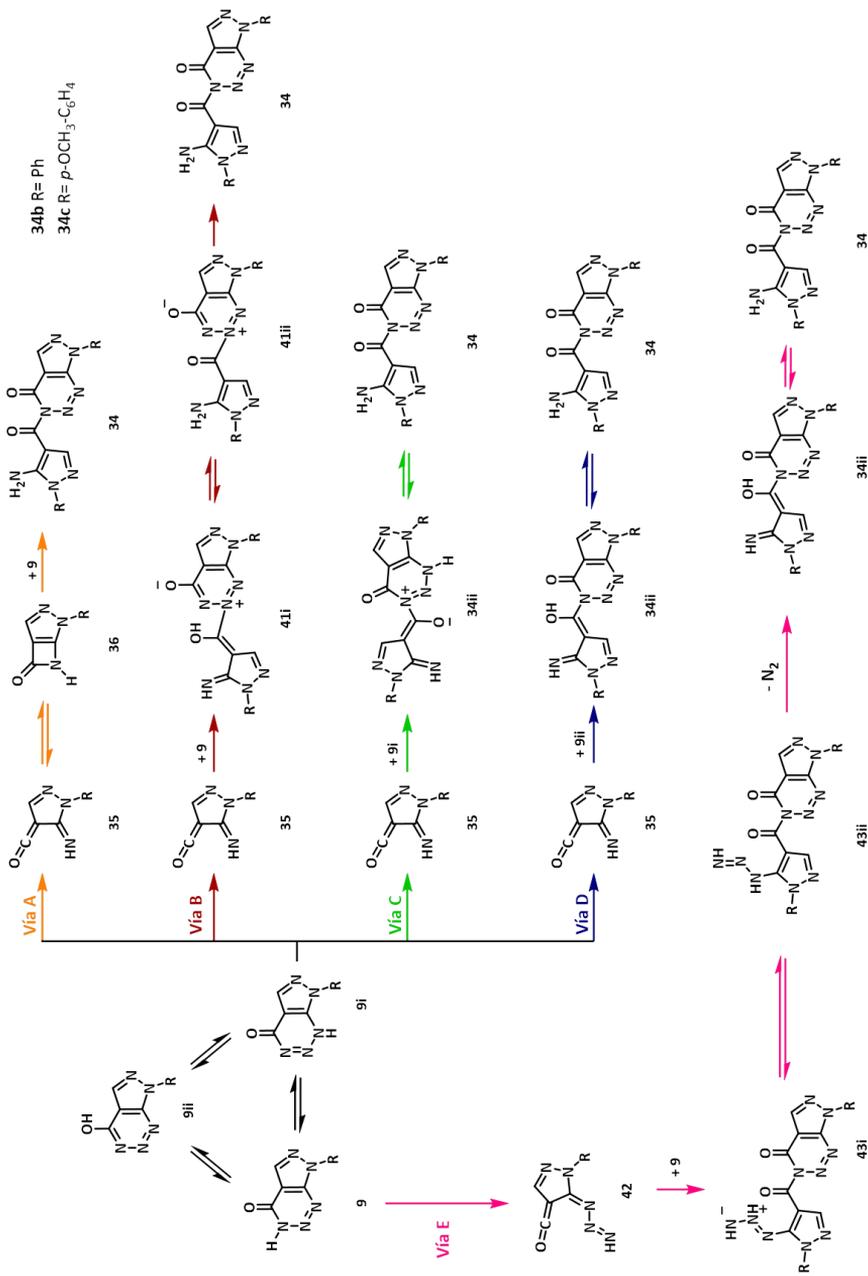


Esquema 5.15. Reacción fotoquímica de 1,2,3-benzotriazin-4-ona **37**.

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos en bibliografía, es probable que en el mecanismo de reacción, para la obtención de los compuestos **34**, esté involucrado un intermediario iminocetena **35**, el cual sufriría un ataque nucleofílico de otra molécula de **9**. Sin embargo, no puede descartarse otra vía de reacción, en ausencia del intermediario **35**. Con estas consideraciones, se llevó a cabo un estudio teórico computacional, para intentar confirmar las vías de reacción más probables. Estos cálculos fueron realizados en un proyecto en colaboración con el Dr. Mariano Vera de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Mar del Plata.

Para realizar los cálculos teóricos se utilizaron como compuestos de partida las pirazolotriazinonas **9b** y **9c**. La primera de ellas conteniendo un anillo fenilo sin sustituir en el N-7 y la segunda con un grupo dador de electrones en la posición *para* del anillo fenilo (*p*-OMe-C₆H₄). Dichas pirazolotriazinonas se seleccionaron con el fin de comparar cómo influye la naturaleza del sustituyente en la reactividad de la molécula. Se realizó una exploración de las superficies de energía libre, a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) para la formación de **34b** y **34c**, planteándose cinco vías de reacción más probables, designadas como vía A a E. Por definición, las energías libres relativas obtenidas se determinaron a 298,15 K, considerando el valor de la energía libre relativa de **9b** y **9c** como cero a dicha temperatura. El procedimiento computacional aplicado ha sido comprobado y utilizado previamente en otros estudios de mecanismo de reacción.¹⁹

En el Esquema 5.16 se observa las cinco vías consideradas, designadas como vías A a E de manera simplificada. Solo se muestran los intermediarios de reacción, mientras que los estados de transición, junto con las energías relativas calculadas para cada estructura fueron omitidos y se detallan en los esquemas posteriores.



Esquema 5.16. Vías de reacción A-E planteadas para la formación de 34.

Las vías A-D (Esquema 5.16) tienen como primer intermediario en común a la iminocetena **35**, que luego reacciona con distintos tautómeros de **9**, de acuerdo a cada ruta propuesta. La pérdida de una molécula de nitrógeno a partir del tautómero **9i**, da lugar a la formación de **35**, que es considerablemente estable (-24,9 kcal/mol para R = Ph y -24,8 kcal/mol para R = *p*-OMe-C₆H₄). A modo representativo, se observa en la Figura 5.5 el estado de transición para la formación de **35b** (**TS9i-35b**) y el potencial electrostático de dicho intermediario. Analizando esta imagen se puede apreciar que **35** es un electrófilo fuerte, por lo que podría atacar intermolecularmente al nitrógeno nucleofílico del anillo de triazinona **9** o intramolecularmente al grupo imino de la propia molécula, generando el derivado azetinona **36**.

Una vez formada la iminocetena **35**, la reacción que tendría lugar dependerá del carácter nucleofílico de los N de cada tautómero de **9**. En la Figura 5.6 se observa el potencial electrostático para los tautómeros de **9c** (distribución de carga similar para **9b**, R = Ph).

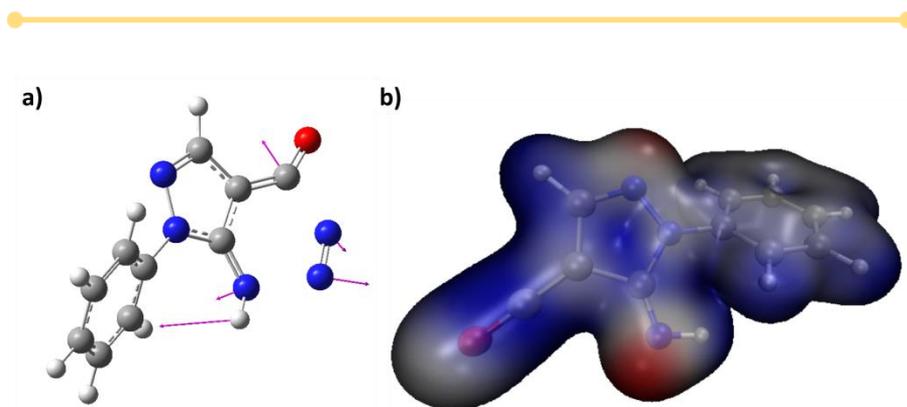


Figura 5.5. (a) Estructura del estado de transición **TS9i-35b**. Pérdida concertada de una molécula de nitrógeno a partir de **9ib**. (b) Potencial electrostático de la iminocetena **35b**. Referencia de colores: rojo = valores negativos, azul = valores positivos.

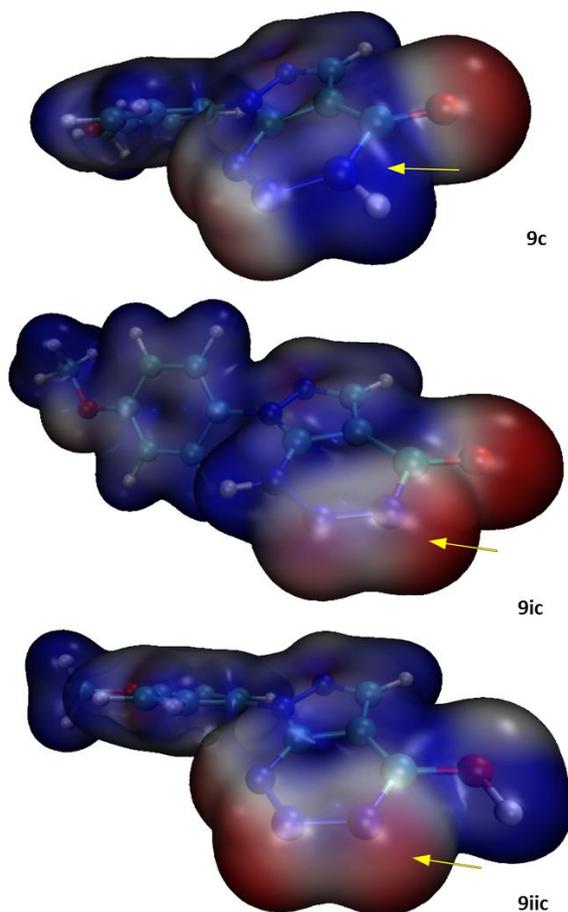


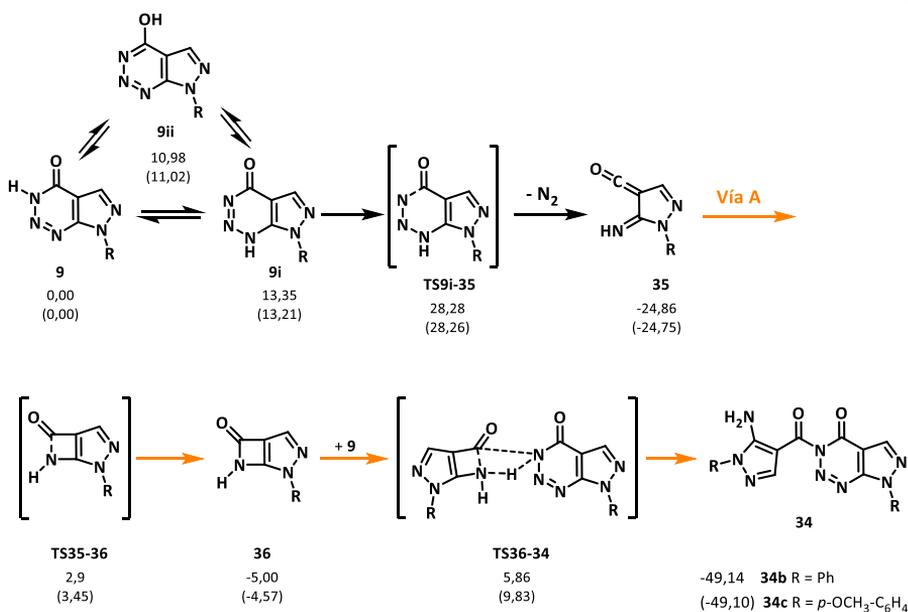
Figura 5.6. Potencial electrostático de los tautómeros **9c**, **9ic** y **9iic** (distribución de carga similar para R = Ph). La flecha amarilla indica el N-3, que corresponde al N involucrado en el enlace C-N en el producto **34**. Referencia de colores: rojo = valores negativos, azul = valores positivos.

Al estudiar la Figura 5.6, se puede deducir que el N-3 de **9c** (flecha amarilla), que estaría involucrado en formación del enlace C-N en el producto **34c** no es nucleofílico. Por lo tanto, la reacción directa de la iminocetena **35c** con una molécula de **9c**, para dar **34c**, puede ser descartada. Sin embargo, el acoplamiento directo de **35c** con el N-3 de los tautómeros **9ic** o **9iic** puede ser considerado, ya que en ambos el N-3 (flecha amarilla) es nucleofílico.

Además, en el caso del tautómero **9c** los N-1 y N-2 tienen un carácter nucleofílico mayor que N-3 (Figura 5.6). De esta manera, se podría considerar una vía donde el C electrofílico de la iminocetena podría atacar a alguno de estos nitrógenos.

Al considerar el carácter nucleofílico de los N de cada tautómero, se plantearon las vías A-D, las cuales se detallan a continuación. En los esquemas de cada vía de reacción se muestra, debajo de cada estructura, la energía libre relativa obtenida para R = Ph y en paréntesis para R = *p*-OCH₃-C₆H₄.

La vía A (Esquema 5.17) sugiere la formación de la azetinona **36**, producto del ataque intramolecular del C de la cetena **35** al NH imino, que da lugar al cierre de anillo. La azetinona puede atacar directamente al N-3 de **9**, ya que este estado de transición se inicia transfiriendo el H-3, lo que le confiere al N-3 un carácter nucleofílico (Figura 5.7c). Por último, el **TS36-34** da lugar a la formación de **34**.



Esquema 5.17. Descripción de la vía A planteada para la obtención de **34**.

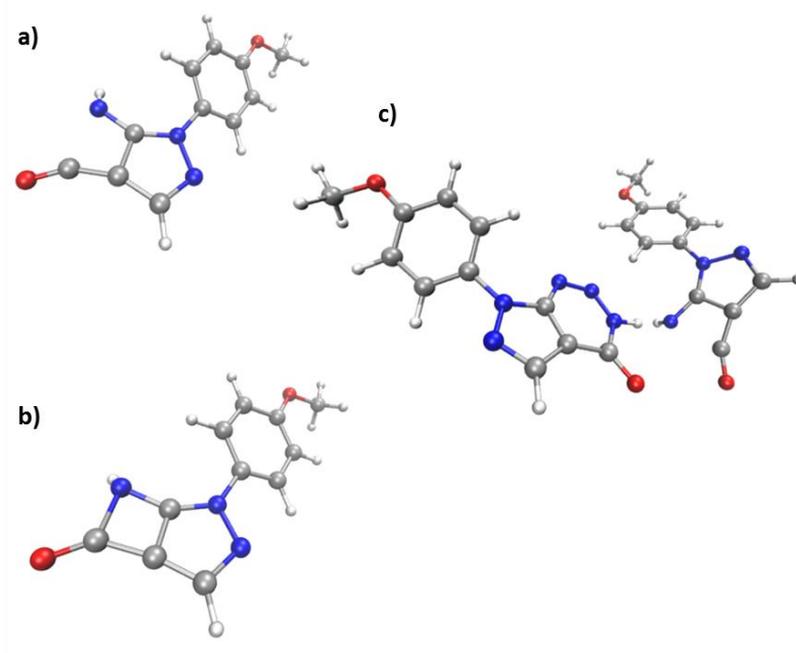
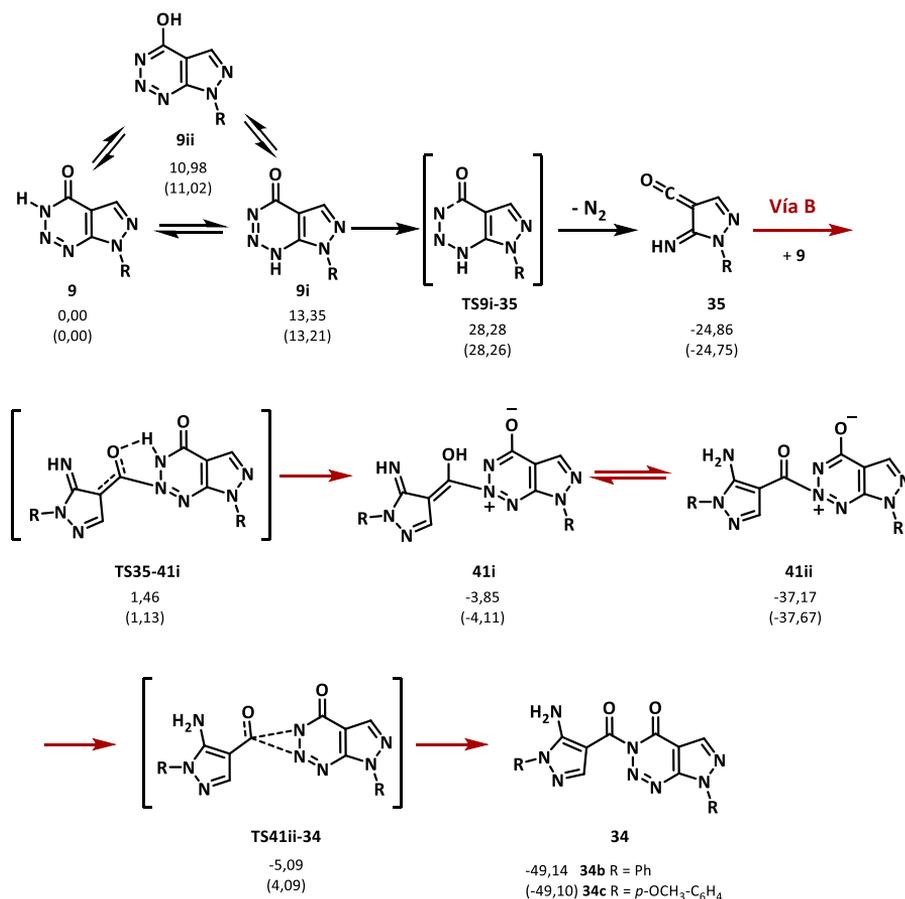


Figura 5.7. Estructuras encontradas a lo largo de la vía A para (a) **TS35-36c**, (b) **36c** y (c) **TS36-34c**.

En la Figura 5.7 se muestran las estructuras de: (a) el estado de transición **TS35-36c**, (b) el intermediario azetina **36c** y (c) el **TS36-34c** a lo largo de la vía A, para el derivado conteniendo $R = p\text{-OMe-C}_6\text{H}_4$.

En la vía B se propone el encuentro de la iminocetena **35** con **9**, que originaría **41i**, a través del estado de transición **TS35-41i** (Esquema 5.18). En este caso, el enlace C-N se formaría entre el N-2 del anillo de triazinona y el carbono de la cetena de **35**, ya que corresponde al N más nucleofílico de **9**, como se mencionó anteriormente. Luego, **41i** continúa reaccionando y se produce una migración 1,2 del grupo ceto a través del estado de transición **TS41ii-34** para generar, finalmente, el producto **34** (Esquema 5.18).

Esquema 5.18. Descripción de la vía B planteada para la obtención de **34**.

En la Figura 5.8 se muestran los estados de transición **TS41i-34b** y **TS41i-24c** donde se produce la migración 1,2 del grupo ceto desde el N-2 al N-3. La energía encontrada para dicho estado de transición fue considerablemente menor para el caso de R = Ph. Esto podría atribuirse a que el grupo *p*-OMe-C₆H₄, con mayor carácter donador de electrones, modificaría sustancialmente la distribución electrónica del sistema π, tanto del anillo fenilo como de la pirazolotriazinona. Por lo tanto, el **TS41i-34c** tiene un carácter de enlace mayor, lo que implica que este tipo de migración sea más difícil, que para el caso de **TS41i-34b**.

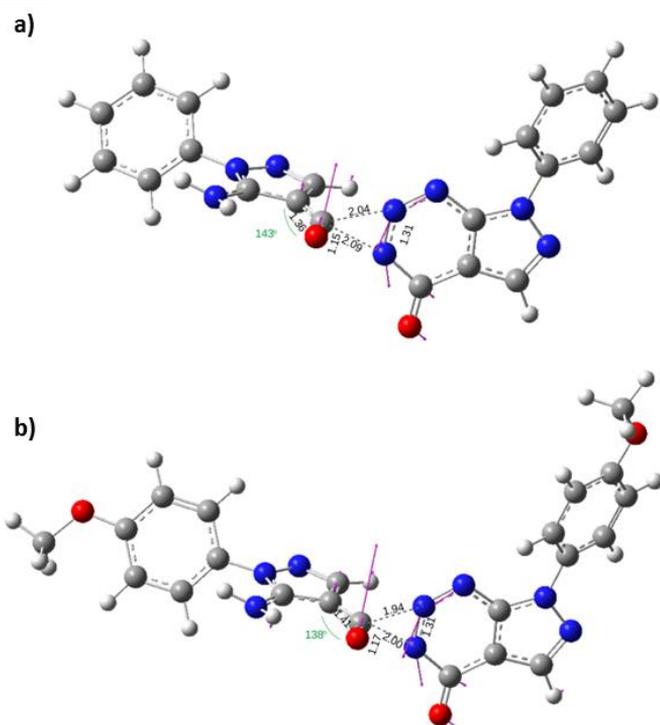
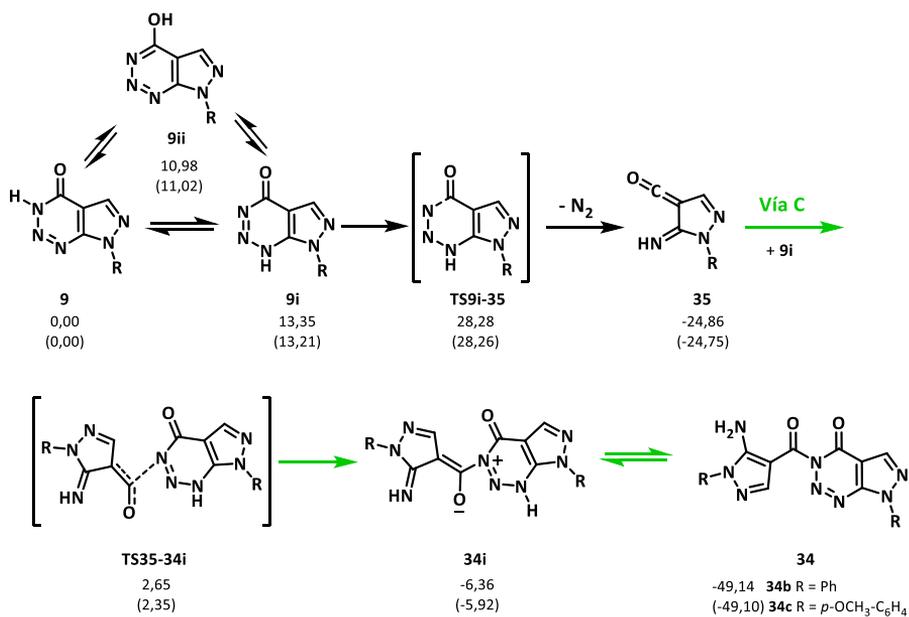
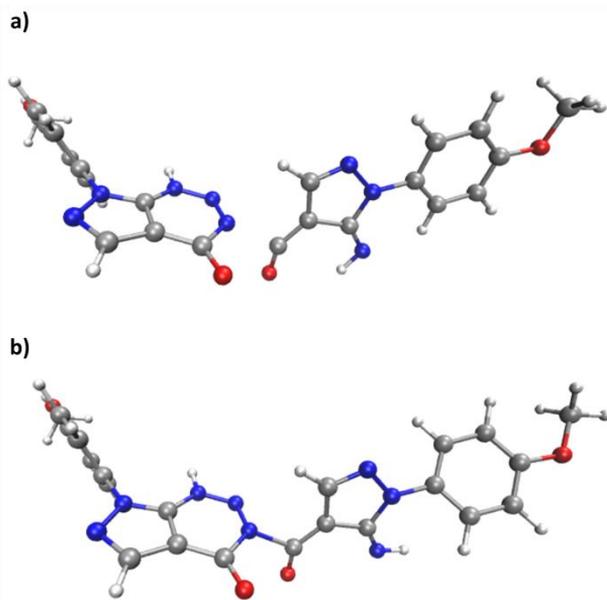


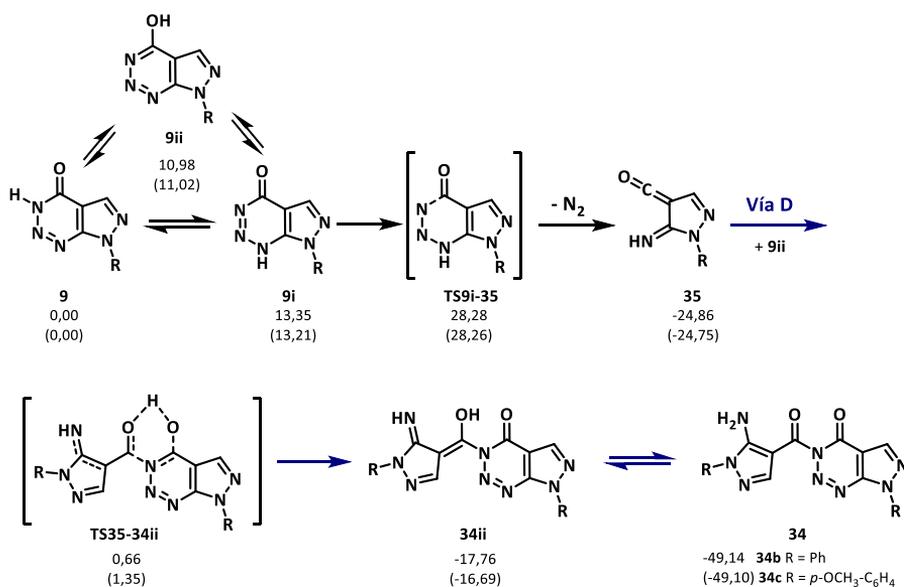
Figura 5.8. Estructura de los estados de transición (a) **TS41i-34b** y (b) **TS41i-34c** a lo largo de la vía B.

En la vía C (Esquema 5.19) se propone la reacción de la iminocetena **35** con el tautómero **9i**, que da lugar a la formación de **34i** a través del estado de transición **TS35-34i** (Figura 5.9a). Su energía relativa es de aproximadamente 2,5 kcal/mol, similar para ambos sustituyentes. Por último, la isomerización de **34i** (Figura 5.9b) genera el producto **34**.

Esquema 5.19. Descripción de la vía C planteada para la obtención de **34**.Figura 5.9. Estructuras de (a) estado de transición **TS35-34i** y (b) tautómero **34i**, a lo largo de la vía C para R = *p*-OMe-C₆H₄.

Por su parte, la vía D sugiere la formación de **35**, seguida de un encuentro con el tautómero **9ii**, dando lugar al estado de transición **TS35-34ii**, para formar **34ii** (Esquema 5.20). Este compuesto es un tautómero del producto final, por lo que el último paso involucra su isomerización a **34**.

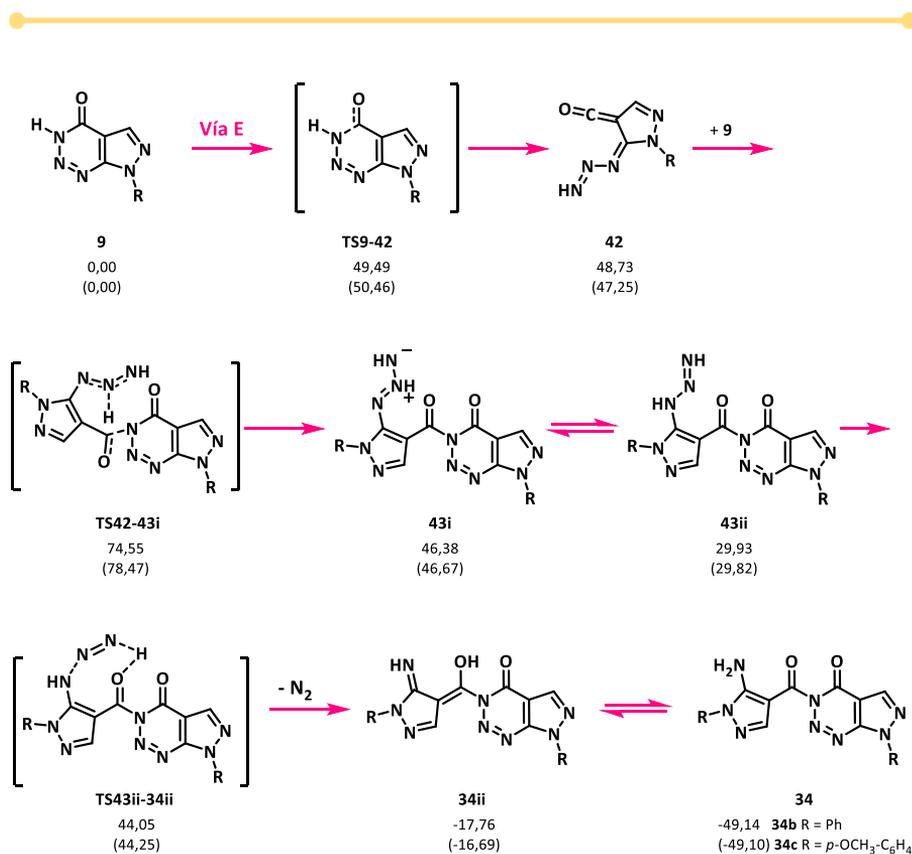
Las vías A-D analizadas hasta aquí, poseen una etapa en común que corresponde a la pérdida temprana de una molécula de nitrógeno por parte del tautómero **9i**, para formar la iminocetena **35**. Sin embargo, se pueden plantear rutas adicionales que consideren una pérdida de nitrógeno en un paso posterior. De esta forma, se planteó la vía E, que constituye una ruta de menor energía libre, dentro de las posibilidades contempladas.



Esquema 5.20. Desarrollo de la vía D planteada para la obtención de **34**.

La vía E (Esquema 5.21) sugiere la apertura del anillo de triazinona **9** para dar lugar a la formación del triazeno ceteno **42**, de carácter nucleofílico, y que retiene los átomos de nitrógeno del sustrato. El acoplamiento de **42** con otra molécula de **9** produciría el aducto **43i**, que mediante una tautomerización genera **43ii**. Este intermediario puede, finalmente, liberar una molécula de nitrógeno formando **34ii**, un tautómero del producto **34**.

En la Figura 5.10a se puede observar el estado de transición **TS43ii-34ii**, a partir del cual se liberaría una molécula de nitrógeno, para formar **34ii** (Figura 5.10b).



Esquema 5.21. Desarrollo de la vía E planteada para la obtención de **34**.

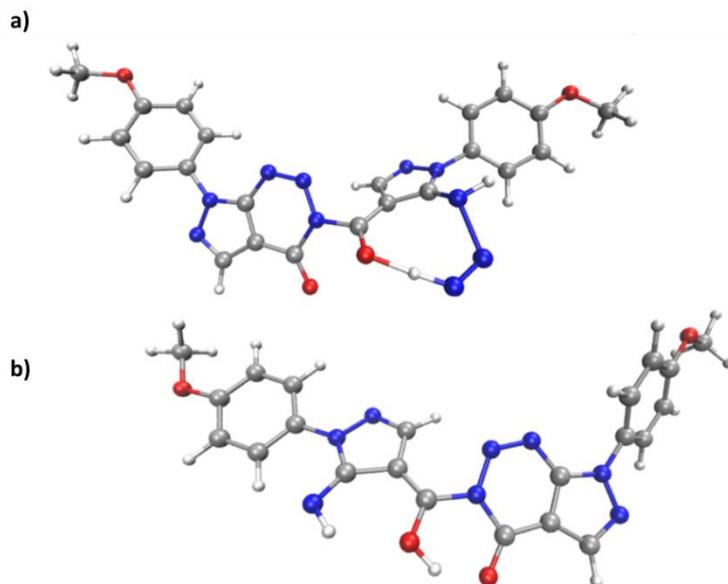


Figura 5.10. (a) Estado de transición **TS43ii-34ii**. (b) Tautómero **34ii**.

Es importante aclarar que, todos los estados de transición e incluso hasta el intermediario más estable formulados a lo largo de la vía E, presentaron valores de energía libre considerablemente más altas que el estado de transición de mayor energía planteado en las vías restantes.

Con fines comparativos, en la Figura 5.11 se muestran los perfiles de energía libre obtenidos para cada una de las vías tanto para (a) $R = \text{Ph}$ como para (b) $R = p\text{-OMe-C}_6\text{H}_4$. En general, ambos derivados evaluados siguen caminos similares a lo largo de las vías A-D, pasando a través del intermediario clave, la iminocetena **35**. Además, se observa que la vía E es la de mayor energía para ambos casos, por lo que podría ser considerada como la ruta menos probable.

Considerando los resultados teóricos obtenidos por cálculos computacionales, se plantearon distintas estrategias para tratar de confirmar experimentalmente el intermediario iminocetena **35**.

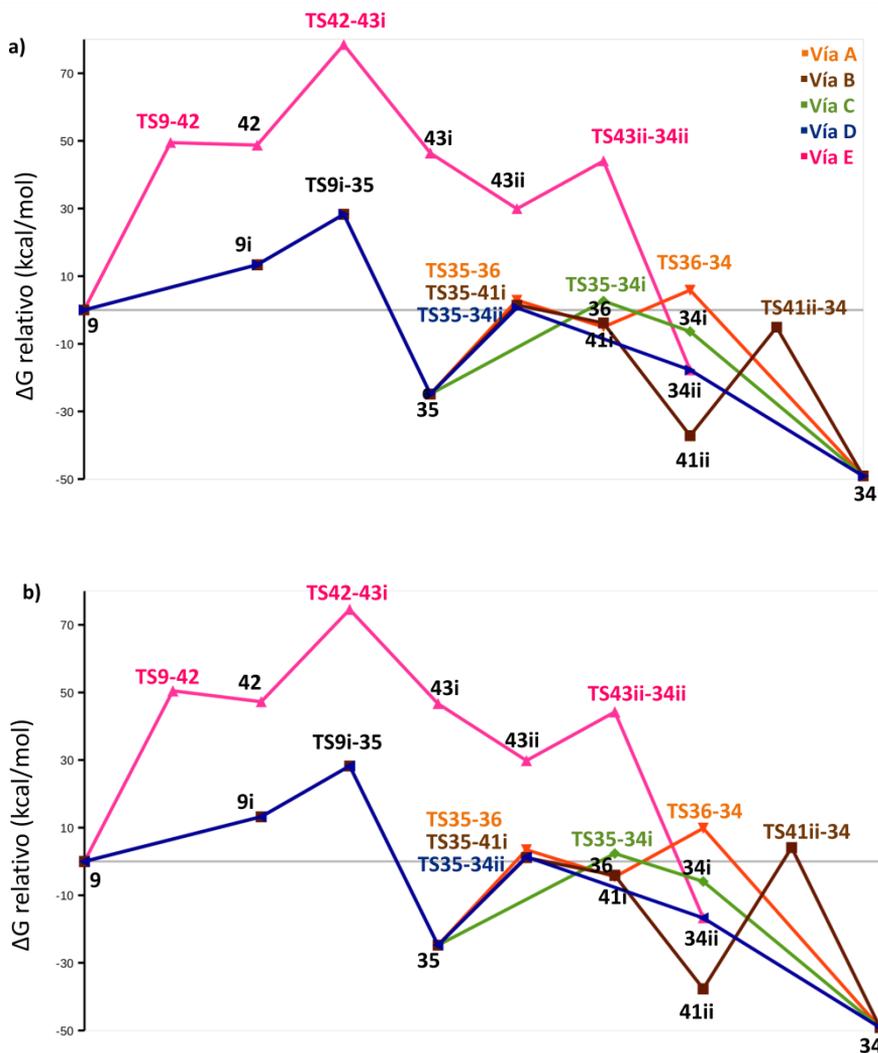


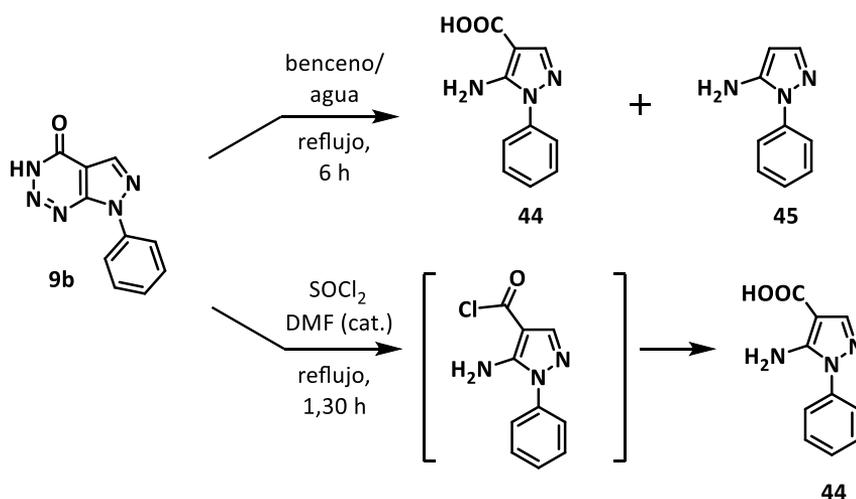
Figura 5.11. Perfiles de energía libre de las vías A-E para (a) $R = \text{Ph}$ y (b) $R = p\text{-OMe-C}_6\text{H}_4$.

Se conoce que los derivados ceteno son hidrolizados en medio acuoso, dando como resultado grupos ácidos.^{18,23} Teniendo esto en cuenta, se realizó la termólisis de la pirazolotriazinona **9b**, en una mezcla de benceno/agua, por 6 horas. Como resultado, se obtuvieron dos productos principales, el aminoácido pirazol **44** (63 %) y el

5-aminopirazol **45** (11 %), que se muestran en el Esquema 5.22.²⁴ La formación de una pequeña proporción de **45** podría explicarse mediante la descarboxilación de **44**, debido a las condiciones de reflujo prolongadas, tal como se ha descrito para otros ácidos carboxílicos de pirazoles.¹⁴

En otro ensayo se llevó a cabo la reacción de **9b** con cloruro de tionilo (SOCl_2) como solvente y cantidades catalíticas de DMF, llevando la mezcla de reacción a la temperatura de reflujo del SOCl_2 (76 °C), durante 1,30 horas (Esquema 5.22). Nuevamente, se obtuvo como producto principal el pirazol **44**, con un 52% de rendimiento. En este caso, probablemente, se forme primero el cloruro de ácido del pirazol, el cual se hidroliza *in situ* para dar lugar a **44**.²⁴

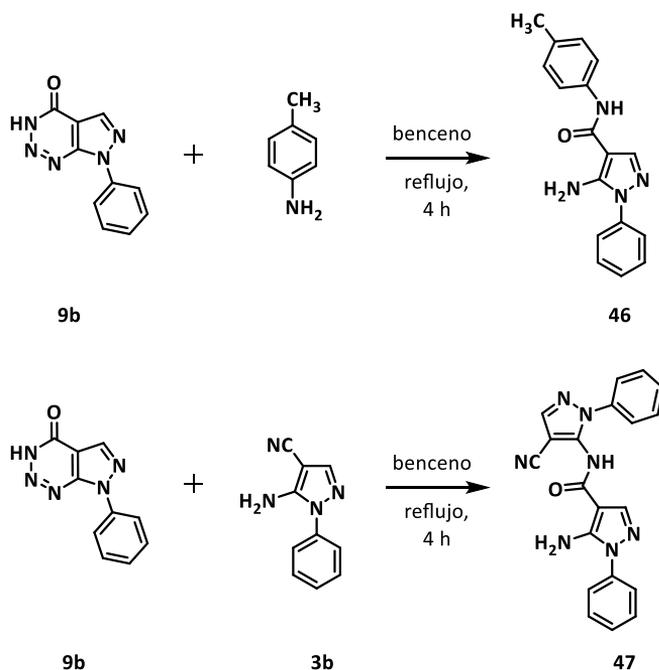
La formación del aminoácido pirazol **44** en ambas experimentos realizados (Esquema 5.22), estaría indicando la presencia de un intermediario del tipo iminocetena **35**, postulado anteriormente para las vías A-D.



Esquema 5.22. Formación de pirazoles **44** y **45** a partir de **9b**.

A continuación, para evaluar la importancia de una especie nucleofílica en el medio de reacción, se realizaron reacciones de **9b** con diferentes nucleófilos, *p*-toluidina y 5-amino-pirazol-4-carbonitrilo **3b** (Esquema 5.23).

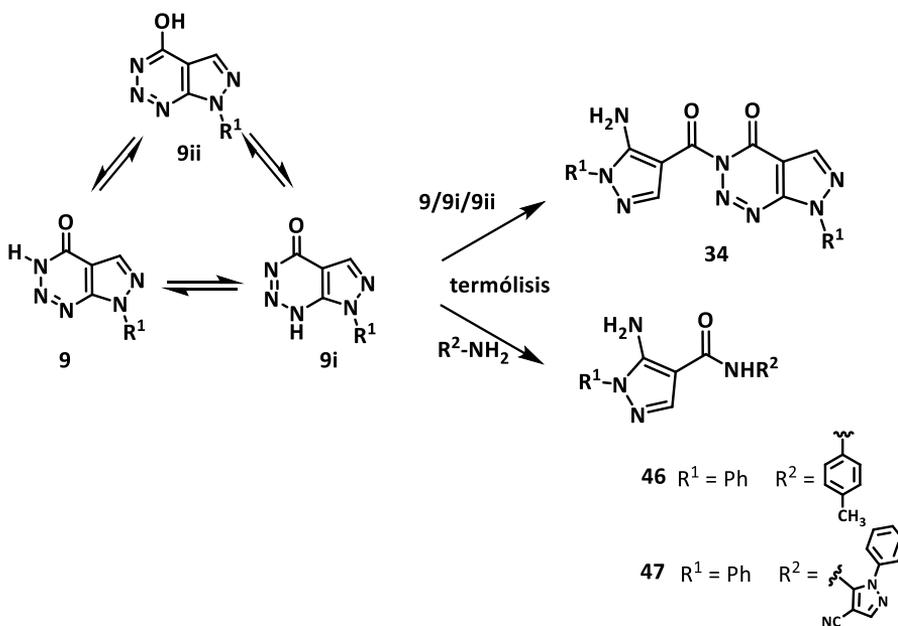
En la reacción de **9b** con *p*-toluidina hay pérdida de una molécula de nitrógeno, y un ataque de la anilina al anillo de triazina, para dar lugar al pirazol **46** (59 %). Cuando se hizo reaccionar **9b** con **3b**, como especie nucleofílica, se obtuvo el pirazol **47** (59 %), lo que estaría indicando nuevamente la adición nucleofílica a **9b** (Esquema 5.23). Uno de los resultados más significativos fue que, en ninguno de los experimentos realizados se pudo detectar la formación del compuesto **34b**. Este resultado indicaría que, la pirazolotriazinona **9b** puede reaccionar con una especie nucleofílica (amina o agua), más rápidamente que con otra molécula de **9b**, originando los productos amidas o ácidos correspondientes.



Esquema 5.23. Reacciones de **9b** con distintas especies nucleofílicas.

A modo de resumen, en el Esquema 5.24 se muestran los productos generados a partir de **9**, bajo condiciones de termólisis, en ausencia y presencia de nucleófilos. De esta forma, se pueden obtener amidas conteniendo el núcleo de pirazol, con gran versatilidad, mediante la aplicación de una metodología sencilla.

Considerando los resultados obtenidos experimentalmente y las vías A-E planteadas, es probable que en la reacción de obtención de las amidas **34**, **46** y **47**, a partir de las pirazolotriazinonas **9** esté implicado un intermediario del tipo iminocetena **35**. Sin embargo, las vías A-D, donde está involucrado **35**, serían igualmente probables, ya que todas ellas presentan curvas de energías similares.



Esquema 5.24. Síntesis de amidas heterocíclicas a partir de pirazolotriazinonas **9** y diferentes nucleófilos.

5.4. Sección experimental

5.4.1. Materiales y métodos generales

Todos los reactivos de partida utilizados fueron obtenidos comercialmente de Sigma-Aldrich y se emplearon sin purificación previa. Las cromatografías en capa delgada se realizaron con sílica-gel Merck (60 DGF254).

Para realizar los experimentos de RMN se utilizó un equipo Bruker Avance II FT- 400 MHz (^1H a 400,16 MHz y ^{13}C a 100,56 MHz) a temperatura ambiente. Las soluciones fueron preparadas en acetona deuterada, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, cloroformo deuterado (CDCl_3), acetonitrilo deuterado (CD_3CN) o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm y fueron obtenidos tomando como referencia la señal residual del solvente no deuterado como estándar interno secundario. Los datos de RMN ^1H están informados indicando el desplazamiento químico (δ), la multiplicidad (s, singlete, d, doblete, t, triplete, q cuatriplete, m multiplete, br, ancho, dd, doble doblete, etc.), la constante de acoplamiento (J) en Hz y la integración (por ejemplo 1H).

Los espectros de masas fueron obtenidos mediante cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (CG-MS) en un equipo Shimadzu GCMS QP-5050A, con una fuente de ionización electrónica de 70 eV y una columna capilar VF-5 ms (5 % fenil 95 % dimetilpolimetilsiloxano) de 30 m de largo por 0,25 mm de diámetro interno por 0,25 μm de espesor de film. Las muestras analizadas se disolvieron utilizando acetona grado HPLC.

Los espectros de EMAR fueron obtenidos utilizando la técnica de ionización por electroespray (ESI) y detección por Q-TOF (por sus siglas en inglés, *Quadrupole time of flight*). Los espectros FT-IR fueron realizados en un equipo Nicolet iN10 (*Thermo Scientific*, USA) con un detector MCT (telururo de mercurio y cadmio) y fueron recolectados

en alta resolución (8 cm^{-1}) con 64 escanes. La caracterización de los compuestos sintetizados se encuentra en la sección Anexo.

5.4.2. Procedimiento general para la síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas 9b-h y pirazolo [4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos 20a-c, e-g

Una solución de NaNO_2 (1,8 mmol/mL) se adicionó gota a gota a una de pirazol **3** ó **7** en $\text{HCl}:\text{AcOH}$ (3:1, 20 mL) con continua agitación, a $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Se dejó que la mezcla alcance temperatura ambiente y se mantuvo con agitación continua durante 24 horas. El precipitado formado fue recuperado mediante filtrado y diluido con 20 mL de agua. Luego, se extrajo con diclorometano (3 x 30 mL) y fue secado con MgSO_4 anhidro. La solución resultante, una vez filtrada, fue concentrada a sequedad y el crudo resultante fue purificado por cromatografía en columna, con diclorometano/acetato de etilo en diferentes proporciones. Los productos se caracterizaron por EMAR y RMN ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC.

5.4.3. Procedimiento general para la síntesis de 3-(5-amino-pirazol-4-carbonil)-pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas 34b-g

Se adicionaron 10 mL de benceno a 0,25 mmol de pirazolotriazina **9** y se calentó la mezcla a reflujo con agitación por 2-6 horas. Luego, el solvente fue evaporado y el sólido obtenido fue purificado por cromatografía en columna, con diclorometano/acetato de etilo en diferentes proporciones.

Los productos se caracterizaron por RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, IR y EMAR.

5.4.4. Síntesis del ácido 5-amino-1-fenil-1*H*-pirazol-4-carboxílico **44**

Método 1: una mezcla de pirazolotriazin-4-ona **9b** (0,22 mmol), benceno (7,2 mL) y agua (0,8 mL) fue sometida a reflujo, con agitación constante, durante 6 horas. Luego, se enfrió la mezcla de reacción y se obtuvo un sólido blanco, que fue recuperado por filtración al vacío. Este precipitado fue analizado e identificado como 5-amino-1-fenil-1*H*-pirazol **45** por RMN. Los datos espectrales obtenidos coincidieron con los valores reportados en literatura.²⁵ El sobrenadante también fue recuperado y ambas fases fueron separadas. La fase orgánica fue secada con MgSO₄ anhidro, filtrada y evaporada a presión reducida, obteniéndose un sólido amarillo. Éste fue redissuelto en acetona y analizado por CG-MS. Dicho análisis mostró como producto principal el ácido 5-amino-1-fenil-1*H*-pirazol-4-carboxílico **44** (63 %) y en menor proporción a **45** (11 %).

Método 2: 0,24 mmol de pirazolotriazina **9b** fueron tratados con SOCl₂ (3 mL) a reflujo, con cantidades catalíticas de DMF por 1,30 horas. Luego, la mezcla fue evaporada a presión reducida y el sólido resultante fue lavado con tres porciones consecutivas de 15 mL de CH₂Cl₂, para facilitar la eliminación del SOCl₂ remanente. El sólido fue purificado por cromatografía en columna utilizando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂:PhCH₃:CH₃OH (8:1:1). Como resultado se obtuvo un sólido amarillo identificado como **44** con un 52 % de rendimiento. El producto se caracterizó por RMN ¹H, ¹³C, y CG-MS.

5.4.5. Síntesis de 5-amino-1-fenil-*N*-(*p*-tolil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida **46**

Se adicionaron 4 mL de benceno a una mezcla de pirazolotriazinonas **9b** (0,11 mmol) y *p*-toluidina (0,25 mmol) y se calentó a reflujo, con agitación constante, por 4 horas. Luego, se

mantuvo la solución a temperatura ambiente por 24 horas y se formó un sólido amarillo. El precipitado fue recuperado por filtración al vacío, lavado con abundante agua fría y secado para dar la carboxamida **46** como un sólido amarillo con un rendimiento del 59 %. El producto se caracterizó por RMN ^1H y ^{13}C .

5.4.6. Síntesis de 5-amino-*N*-(4-ciano-1-fenil-1*H*-pirazol-5-il)-1-fenil-1*H*-pirazol-4-carboxamida **47**

Una mezcla de pirazolotriazinona **9b** (0,50 mmol) y 5-amino-1-fenil-1*H*-pirazol-4-carbonitrilo **3b** (0,50 mmol) en benceno (15 mL) fue calentada a reflujo con agitación constante por 4 horas. Luego, se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente y el solvente fue evaporado a presión reducida. El residuo sólido obtenido fue purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ en diferentes proporciones, para dar **47** como un sólido amarillo con un 59 % de rendimiento. El producto se caracterizó por RMN ^1H , ^{13}C , y CG-MS.

5.4.7. Cálculos teóricos

La exploración de la superficie de energía potencial se llevó a cabo utilizando el paquete de programas Gaussian 09 a nivel DFT.²⁶

Todos los puntos estacionarios más relevantes del mecanismo a lo largo de las vías de reacción planteadas, tales como reactivos, estados de transición, intermediarios y productos, fueron calculados a nivel de teoría CAM-B3LYP/6-311+G(d,p).²⁷ Además, fueron caracterizados por medio de la diagonalización de la matriz Hessiana y posterior análisis de las frecuencias, para obtener las correcciones térmicas y de punto cero para la energía electrónica, entalpía y energía libre de Gibbs.

En algunos casos, para confirmar la conexión entre los estados de transición calculados y los mínimos designados, fue necesaria la implementación de simulaciones de coordenadas intrínsecas de reacción (*Intrinsic Reaction Coordinates*, IRC). Todas las optimizaciones y análisis de frecuencias fueron obtenidas utilizando el modelo IEFPCM para benceno,²⁸ el solvente utilizado en la síntesis de **34**.

Para la visualización de los resultados y generación de imágenes se utilizaron los programas Molden y VMD 1.8.9.²⁹

Las energías libres relativas reportadas para las vías A-E se determinaron a 298,15 K, considerando la energía de dos equivalentes de los reactivos **9b** y **9c** como cero, respectivamente.

5.5. Conclusiones

Con el fin de obtener compuestos análogos de purinas de interés biológico, se sintetizaron dos familias de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas. Para ello, se utilizaron como precursores los amino-pirazol-carbonitrilos **3a-h** y **7a-h**, cuya síntesis fue descrita en el Capítulo 4.

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **9b-h** a partir de 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3**, empleando una metodología desarrollada previamente en nuestro grupo de investigación.^{6,7} En general, se obtuvieron muy buenos rendimientos (50-88 %) para la síntesis de **9**, excepto para el pirazol **3a** (R=H), donde no se observó conversión. Esto se podría atribuir al carácter del sustituyente del N-1, que podría evitar la formación de la sal de diazonio o que se forme en baja proporción y que sea inestable y no alcance a ciclar para formar el anillo de triazinona.

Empleando la misma metodología se prepararon nuevos pirazolo[4,3-*d*][1,2,3] triazin-7-carboxilatos **20a-c,e-g**, utilizando como precursores los pirazoles **7a-h**. Los rendimientos de **20** fueron moderados (28-38 %) y menores a los obtenidos en las síntesis de las pirazolotriazinonas **9**, probablemente debido a las dificultades encontradas durante las etapas de separación y purificación del producto desde el medio de reacción. Además, se observó la influencia del sustituyente del arilo del N-1 en la estabilidad de la sal de diazonio. De esta manera, no se lograron obtener las pirazolotriazinonas correspondientes, cuando se emplearon los pirazoles **7d** y **7h**, debido al carácter electronegativo de sus sustituyentes en el grupo arilo, F y NO₂ respectivamente. Éstos podrían desestabilizar o incluso impedir la formación de la sal de diazonio.

Por otro lado, cabe destacar que la metodología empleada para la obtención de pirazolotriazin-4-onas a partir de amino-pirazol-carbonitrilos, se logró expandir utilizando una nueva serie de pirazoles **7**. De esta forma, se obtuvieron núcleos de pirazolo[4,3-

d[1,2,3]triazin-7-carboxilatos **20**, mediante la diazotación directa de amino-pirazoles, utilizando un método *one-pot* sencillo. Los resultados que se desprenden de este estudio indicarían que la variación de la posición de los grupos ciano y amino en el anillo de pirazol no afecta a la formación de la triazinona, siempre y cuando estos grupos se encuentren en posiciones adyacentes entre sí, y el proceso de diazotación sea efectivo.

En segundo lugar, se llevó a cabo la funcionalización de las pirazolotriazin-4-onas **9** en el N-3, a través de una reacción de acople con pérdida de nitrógeno. Como resultado se obtuvieron los compuestos **34b-g** con rendimientos de moderados a buenos. La elucidación estructural de 3-(5-amino-1*H*-pirazol-4-carbonil)-3,7-dihidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas requirió de un análisis exhaustivo y fue confirmada por experimentos de RMN ¹H, ¹³C y 2D, IR y EMAR.

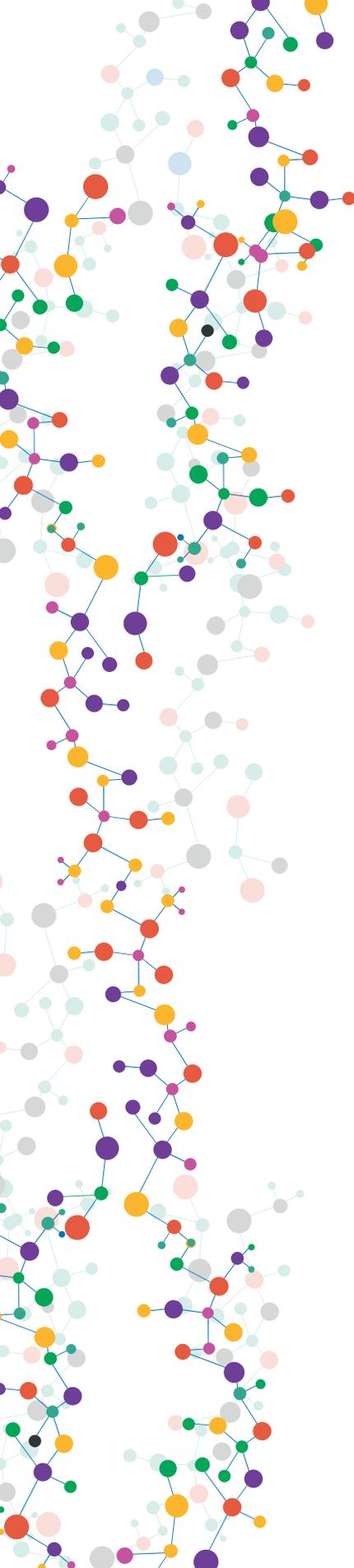
Por último, se realizó un estudio teórico y experimental del mecanismo de reacción que podría estar involucrado en la formación de **34** a partir de **9**. Analizando los datos obtenidos, y lo descrito en bibliografía para heterociclos similares, se plantearon cinco vías de reacción diferentes, de las cuales cuatro de ellas (vías A-D) presentaron intermediarios de energías similares. Además, se postuló un intermediario en común entre estas vías, la iminocetena **35**, que estaría involucrada en el mecanismo de reacción.

5.6. Referencias bibliográficas

1. Ledenyova, I. V, Didenko, V. V, Shikhaliev, K. S. Chemistry of Pyrazolo-3(5)-diazonium salts (Review). *Chem. Heterocycl. Compd.* **50**, 1214–1243 (2014).
2. Kelley, J. L., Wilson, D. C., Styles, V. L., Soroko, F. E., Cooper, B. R. 7-(2-fluorobenzyl)-4-(substitued)7H-imidazo[4,5-d]-1,2,3-triazines and -7H-pyrazolo[3,4-d]-1,2,3-triazines. Synthesis and Anticonvulsant Activity. *J. Heterocycl. Chem.* **32**, 1417–1421 (1995).
3. Harb, A. A., Abbas, H. H., Mostafa, F. H. Pyrazoles as Building Blocks in Heterocyclic Synthesis: Synthesis of Pyrazolo [3,4-d]pyrimidine, Pyrazolo[3,4-e][1,4]diazepine, Pyrazolo[3,4-d][1,2,3]triazine and Pyrolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidine Derivatives. *J. Iran. Chem. Soc.* **2**, 115–123 (2005).
4. Dawood, K. M., Farag, A. M., Khedr, N. A. Facile route to novel 2-pyridone, pyrazolo [3,4-d]-1,2,3-triazine and pyrazolo[3,4-d]-and [1,5-a]-pyrimidine derivatives. *Arkivoc* **2008**, 166–175 (2008).
5. Li, H.-B., Zhu, Y.-Q., Song, X.-W., Hu, F.-Z., Liu, B., Li, Y.-H., Niu, Z.-X., Liu, P., Wang, Z.-H., Song, H.-B., Zou, X.-M., Yang, H.-Z. Novel Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitors: 3H-Pyrazolo[3,4-d][1,2,3]triazin-4-one Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9535–9542 (2008).
6. Moyano, E. L., Colomer, J. P., Yranzo, G. I. New application of heterocyclic diazonium salts: Synthesis of new pyrazolo[3,4-d][1,2,3]triazin-4-ones. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3377–3381 (2008).
7. Colomer, J. P., Moyano, E. L. New application of heterocyclic diazonium salts. Synthesis of pyrazolo[3,4-d][1,2,3]triazin-4-ones and imidazo[4,5-d][1,2,3]triazin-4-ones. *Tetrahedron Lett.* **52**, 1561–1565 (2011).
8. Gurenko, A. O., Khutova, B. M., Klyuchko, S. V., Vasilenko, A. N., Brovarets, V. S. Synthesis of novel pyrazolo[3,4-d][1,2,3]triazines. *Chem. Heterocycl. Compd.* **50**, 577–585 (2014).
9. Krawczyk, S., Migawa, M. T., Drach, J. C., Townsend, L. B. Synthesis of 4-Substituted Imidazo[4,5-d][1,2,3]triazine(2-Azapurine)nucleosides. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **19**, 39–68 (2000).
10. Migawa, M. T., Townsend, L. B. Synthesis and unusual chemical reactivity of certain novel 4,5-disubstituted 7-benzylpyrrolo[2,3-d][1,2,3]triazines. *J. Org. Chem.* **66**, 4776–4782 (2001).
11. Saravanan, J., Mohan, S., Roy, J. J. Synthesis of some 3-substituted amino-4,5-tetramethylene thieno[2,3-d][1,2,3]-triazin-4(3H)-ones as potential antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 4365–4369

- (2010).
12. Peet, N. P. Oxamates Derived from 5-Aminopyrazoles. *J. Heterocycl. Chem.* **23**, 193–197 (1986).
 13. Khutova, B. M., Klyuchko, S. V., Gurenko, A. O., Vasilenko, A. N., Bayla, A. G., Rusanov, E. B., Brovarets, V. S. Conversion of 7-aryl-7H-pyrazolo[3,4-*d*]-[1,2,3]triazin-4-ols by the action of phosphorus pentoxide, pentasulfide and oxychloride. *Chem. Heterocycl. Compd.* **48**, 1251–1261 (2012).
 14. Khutova, B. M., Klyuchko, S. V., Gurenko, A. O., Vasilenko, A. N., Rusanov, E. B., Brovarets, V. S. Reaction of 7-phenyl-7H-pyrazolo-[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-ol with thionyl chloride. *Chem. Heterocycl. Compd.* **49**, 922–929 (2013).
 15. Smalley, R. K., Suschitzky, H. Thermolysis of isatoic anhydride and benzotriazinone. *Tetrahedron Lett.* **29**, 3465–3469 (1966).
 16. Hey, D. H., Rees, C. W., Todd, A. R. Pyrolysis of 3-Phenyl-1,2,3-benzotriazin-4-one. *J. Chem. Soc.* 1028–1029 (1968).
 17. Archer, J. G., Barker, A. J., Smalley, R. K. 1,2,3-Benzotriazin-4-ones and Related Systems. Part II. Thermolytic Decomposition of Substituted 1,2,3-Benzotriazin-4-ones and Isatoic Anhydrides. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1169–1173 (1973).
 18. Chiu, S. J., Chou, C. H. Facile synthesis of reactive benzoazetinone by flash vacuum pyrolysis of isatoic anhydride. *Tetrahedron Lett.* **40**, 9271–9272 (1999).
 19. Malvacio, I., Moyano, E. L., Vera, D. M. A. Gas-phase synthesis of 3-carboethoxy-quinolin-4-ones. A comprehensive computational mechanistic study to uncover the dark side of the Gould–Jacobs reaction. *RSC Adv.* **6**, 83973–83981 (2016).
 20. Migawa, M. T., Townsend, L. B. An unprecedented nitrogen elimination reaction: mechanistic studies using ¹⁵N-labeled 4-amino-7-benzylpyrrolo[2,3-*d*][1,2,3]triazine-5-carbonitrile. *Org. Lett.* **1**, 537–539 (1999).
 21. Murray, A. W., Vaughan, K. Thermolysis of 1,2,3-Benzotriazin-4-(3*H*)-one. *J. Chem. Soc.* **4**, 2070–2074 (1970).
 22. Unissa Baig, G., Stevens, M. F. G., Vaughan, K. Triazines and Related Products. Part 27. Thermolysis of 4-Anilino-1,2,3-benzotriazines. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 999–1003 (1984).
 23. Ménager, M., Pan, X., Wong-Wah-Chung, P., Sarakha, M. Photochemistry of the pesticide azinphos methyl and its model molecule 1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-one in aqueous solutions: Kinetic

- and analytical studies. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **192**, 41–48 (2007).
24. Castro, S. S. Estudio de Reacciones Aza-Diels-Alder de Azolo-1,2,3-triazinas con 5-aminopirazoles y su Aplicación en la Síntesis de Nuevos Pirazoles Fusionados. Tesis de grado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (2008).
 25. Ege, G., Franz, H. Aminopyrazoles. III (1). Novel 'One-Flask' Preparation of 1-Phenylpyrazol-3-amine. *J. Heterocycl. Chem.* **19**, 1265–1266 (1982).
 26. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A., Ogliaro, J. E., Peralta F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, N. J., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Foresman, Ö. Farkas J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. Gaussian, Inc. (2009).
 27. Yanai, T., Tew, D. P., Handy, N. C. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **393**, 51–57 (2004).
 28. Scalmani, G., Frisch, M. J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J. Chem. Phys.* **132**, 114110 (2010).
 29. Visual Molecular Dynamics (VMD), version 1.8.9. Available at: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>.



PARTE III

ESTUDIO *IN VITRO* E *IN SÍLICO* DE POTENCIALES INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

Capítulo 6

ESTUDIOS DE INHIBICIÓN EN TIROSINASA

6.1. Introducción

6.1.1. Función y regulación de la enzima tirosinasa

La enzima tirosinasa (EC: 1.14.18.1) es una polifenoloxidasa (PPO) ampliamente distribuida en la naturaleza, puede encontrarse en los microorganismos, plantas y animales. La PPO está involucrada en la ruta sintética de las melaninas.¹ Este pigmento se encuentra en el cabello, la piel, alrededor de la retina, y cumple la función de protección de la radiación UV. Sin embargo, su acumulación puede producir hiperpigmentación y desórdenes en la piel como lunares, manchas o incluso melanomas, que a veces pueden originar un cáncer de piel. Por otro lado, una disminución en los niveles de melanina puede desencadenar otras enfermedades, como vitíligo y cáncer de piel debido a la larga exposición a los rayos UV.^{2,3}

Entre las enzimas que se encuentran implicadas en la melanogénesis, la tirosinasa es la responsable de los dos primeros pasos. En primer lugar, la PPO oxida la L-tirosina a L-DOPA (actividad monofenolasa) y luego, oxida este último metabolito a dopaquinona (actividad difenolasa) (Figura 6.1). Para llevar a cabo dichas oxidaciones utiliza oxígeno molecular.⁴

Los tipos de melaninas se diferencian en las etapas finales de su biosíntesis, lo que determina su estructura, composición, tamaño y tipo de pigmento. Las eumelaninas son pigmentos de color negro o pardo de alta masa molecular. En cambio, las feomelaninas tienen un color amarillento-rojizo y contienen azufre en su composición. En la Figura 6.1 se observan las rutas sintéticas de eumelanina y feomelanina. Como se puede ver en la imagen, ambas biosíntesis comienzan con la oxidación catalizada por la tirosinasa.⁴

L-tirosina. Además, L-DOPA, producto de la hidroxilación de la tirosina, es un cofactor de la reacción, por lo que anula el período de retardo en cantidades catalíticas.⁵

Las actividades de monofenolasa y difenolasa se dan junto con la reducción de oxígeno molecular a agua, en el sitio activo de la enzima.⁶ La tirosinasa es una proteína que contiene dos sitios activos, con dos iones de cobre cada uno, coordinados por seis o siete residuos de histidina y uno de cisteína.⁷ Los sitios activos se encuentran cerca de la superficie de la proteína, por lo que moléculas análogas a los sustratos de la enzima pueden llegar a ellos fácilmente. La estructura de la tirosinasa se puede observar en la Figura 6.2.^{8,9}

Debido a las implicancias de esta enzima en la melanogénesis, la tirosinasa ha sido ampliamente estudiada y constituye una diana terapéutica de suma importancia para el tratamiento de los desórdenes de hiperpigmentación. A continuación, se describen algunos de los inhibidores conocidos de tirosinasa.

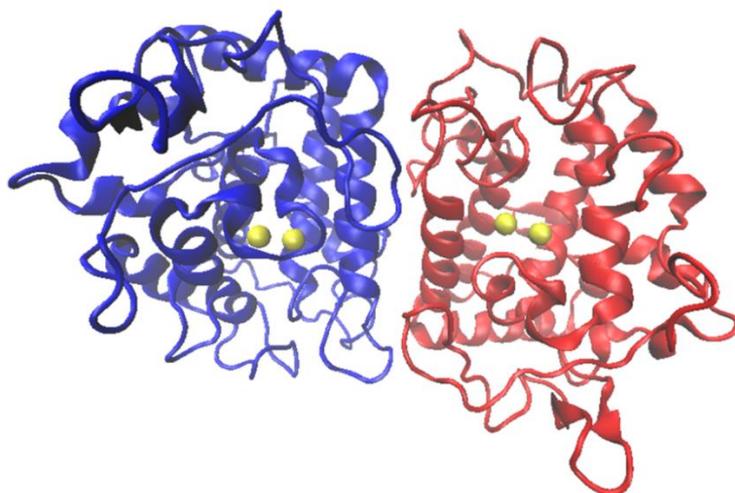


Figura 6.2. Estructura tridimensional de la tirosinasa. Los iones de Cu dentro de cada sitio activo se encuentran de color amarillo. PDB: 3NRZ.⁹

6.1.2. Inhibidores de tirosinasa

Como se expresó anteriormente, el empleo de compuestos inhibidores de tirosinasa disminuye la formación de melanina interrumpiendo los primeros pasos de su ruta sintética. Los inhibidores de la melanogénesis se han estudiado ampliamente por la industria farmacéutica y de cosmética, para obtener agentes blanqueadores de la piel. Actualmente, existen diversos compuestos descritos como inhibidores de tirosinasa, provenientes de métodos sintéticos, productos naturales, *screening* virtuales y estudios de *docking* basados en su estructura.^{4,10}

Uno de los inhibidores más conocidos es el ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil-4H-piran-4-ona), que es un antibiótico producido por numerosas especies de hongos *Aspergillus* y *Penicillium*.^{11,12} Este compuesto es un inhibidor del tipo competitivo que se une fuertemente tanto al complejo dicobre (II) en la actividad monofenolasa de la tirosinasa, como al aducto dicobre-oxígeno en la actividad difenolasa. En ambos casos, evita la unión con el correspondiente sustrato. Dichas interacciones entre el ácido kójico y los centros de Cu de la enzima se pueden observar en la Figura 6.3.¹³

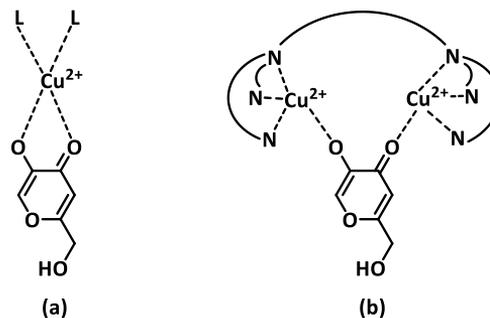


Figura 6.3. Unión del ácido kójico con el Cu del sitio activo de la tirosinasa, en la inhibición de su actividad (a) monofenolasa y (b) difenolasa. Figura extraída de referencia 13.

Numerosos compuestos de estructura y orígenes muy diversos, han sido descritos como inhibidores de tirosinasa. Por ejemplo, análogos del ácido kójico derivados de hidroxibenzaldehidos,¹⁴ resorcinoles,^{15,16} la rifampicina,¹⁷ derivados de chalconas¹⁸ (entre ellos el resveratrol)¹⁹, 2-quinazolin-4(3*H*)-ona,²⁰ 3-heteroarilcumarinas,²¹ 3,5-diaril-pirazoleninas,²² 1,3,4-tiadiazoles,²³ neuroflavonas (de la especie *Campylotropis hirtella*),²⁴ y flavanonas (dalenin),²⁵ entre otros. Las estructuras de dichos compuestos se observan la Figura 6.4.

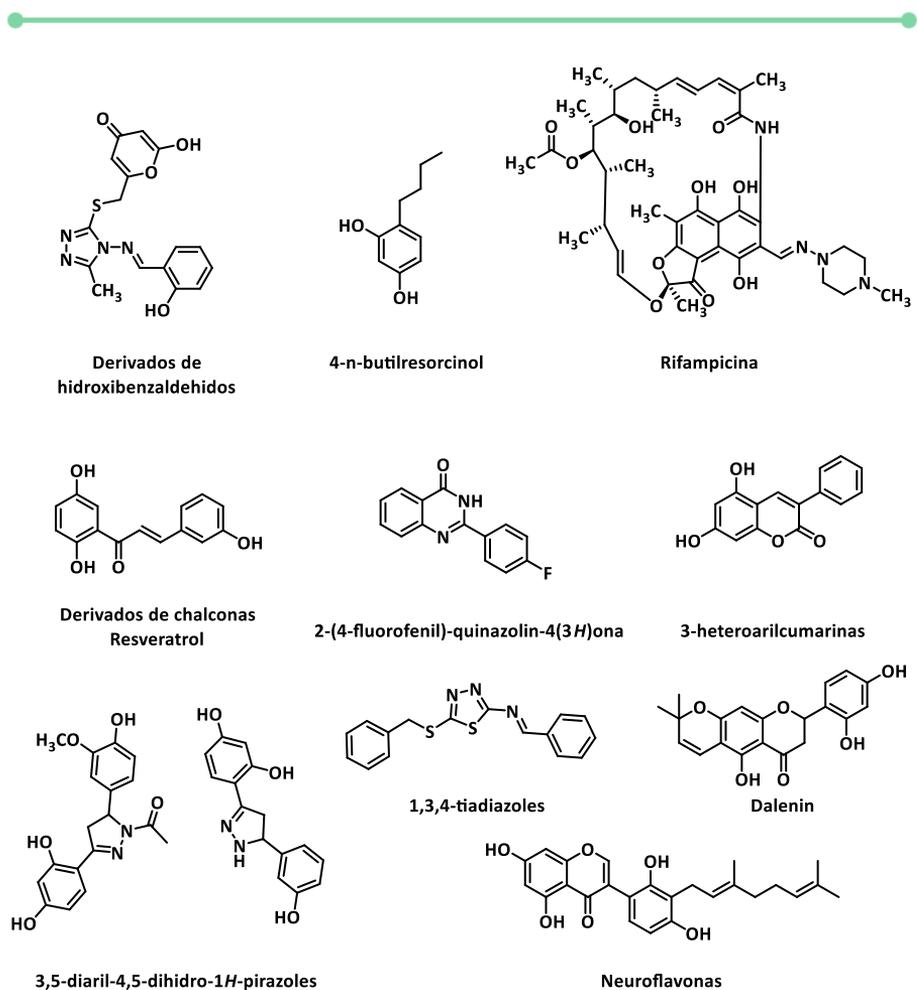


Figura 6.4. Ejemplos de compuestos descritos como inhibidores de tirosinasa.

6.2. Objetivos específicos

Considerando los inhibidores descritos para la enzima tirosinasa y las similitudes estructurales con algunas de las familias de compuestos reportados durante la Parte II de esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo un estudio de inhibición enzimática de dichos compuestos.

Se planteó el siguiente objetivo específico:

- Evaluar los compuestos 5-amino-pirazoles-4-carbonitrilos **3a-h**, 3-ciano-4-amino-pirazol carboxilatos de etilo **7a-h**, pirazolo[3,4-*d*][1,2,3] triazin-4-onas **9b-h** y pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos de etilo **20a-c,e-g** sintetizados previamente, como potenciales inhibidores de tirosinasa mediante ensayos *in vitro*.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Actividad inhibitoria *in vitro* de tirosinasa

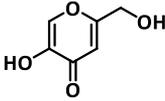
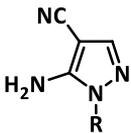
Teniendo en cuenta la amplia variedad de heterociclos de bajo peso molecular existentes como inhibidores de tirosinasa, se estudiaron los compuestos obtenidos durante la Parte II de este trabajo, como potenciales inhibidores de esta enzima. Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales de la Universidad Católica de Córdoba, bajo la dirección de la Dra. M. Cecilia Carpinella.

En una primera instancia, se realizó una evaluación *in vitro* de las familias de pirazoles **3a-h** y **7a-h** y las pirazolo[1,2,3]triazinas **9b-h** y **20a-c, e-g**, como potenciales inhibidores de la enzima tirosinasa. Para ello, se utilizó la técnica descrita en bibliografía y se evaluaron los compuestos a una concentración inicial de 1 mg/mL.^{16,25} En esta metodología se utiliza una placa de 96 pocillos con L-tirosina, que es el sustrato de la enzima, y tirosinasa. La reacción enzimática que ocurre es la oxidación de L-tirosina a dopacromo, un compuesto coloreado. La formación de dicho compuesto se monitorea y cuantifica mediante espectrofotometría UV a 450 nm.

Aquellos compuestos que mostraron inhibición de la enzima a 1 mg/mL, fueron evaluados a diferentes concentraciones para determinar su concentración inhibitoria media (IC₅₀). Este valor corresponde a la cantidad necesaria de compuesto para disminuir la actividad enzimática en un 50 %.

Como resultado, se obtuvo que las pirazolo[1,2,3]triazinas **9** y **20** y los 3-ciano-4-amino-pirazol carboxilatos de etilo **7a-h** resultaron inactivos frente a la tirosinasa. En cambio, la familia de pirazoles **3a-h** mostró inhibición de la enzima, obteniéndose valores de IC₅₀ del rango milimolar y micromolar, lo cual se detalla en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de los pirazoles **3** frente a la enzima tirosinasa.

Estructura	Compuesto	R	IC ₅₀ (μM) ^b
	Ácido kójico ^a	-	128±1
	3a	H	320±1
	3b	Ph	193±1
	3c	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	1135±1
	3d	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	1364±2
	3e	<i>m</i> -F-C ₆ H ₄	702±1
	3f	<i>o</i> -F-C ₆ H ₄	3242±2
	3g	piridin-2-il	1200±2
	3h	bencil	449±1

(a) Control positivo. (b) Los valores de IC₅₀ son el promedio ± desviación estándar de al menos tres mediciones independientes.

Comparando los valores de IC₅₀ de **3a-h** obtenidos con el del ácido kójico, el inhibidor de referencia, se pudo observar que el pirazol **3b** presentó un valor de IC₅₀ similar. Sin embargo, en ninguno de los casos se logró mejorar la actividad inhibitoria con respecto al inhibidor de referencia. Sería necesario sintetizar una mayor cantidad de derivados para poder establecer una relación de estructura-actividad y así optimizar las estructuras de los pirazoles ensayados para poder utilizarlos como posibles inhibidores de tirosinasa.

Además, se podrían realizar estudios de *docking* para poder determinar tanto el modo de unión de estos compuestos con la tirosinasa, como los fragmentos moleculares necesarios para la inhibición de la enzima. Cabe aclarar que estos estudios no fueron abordados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

6.4. Metodología

6.4.1. Ensayos de actividad en tirosinasa

Los ensayos de actividad de tirosinasa se realizaron de acuerdo al protocolo descrito en bibliografía.^{16,25} Para ello, se utilizó la enzima tirosinasa comercial proveniente del hongo *Agaricus bisporus* y L-tirosina como sustrato, obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

En primer lugar, se preparó un buffer de fosfato 0,05 M y pH igual a 6,5. Luego, se prepararon una solución de L-tirosina 0,45 mg/mL y una de tirosinasa de 2500 U/mL, utilizando dicho buffer. Para cada compuesto a ensayar, se prepararon soluciones madres en DMSO y diluidas a la concentración correspondiente con buffer.

Para cada medida se colocaron 146 μ L de buffer fosfato, 10 μ L de la solución del compuesto a medir (o de buffer en caso del control), 4 μ L de enzima y 40 μ L de L-tirosina. La reacción fue monitoreada realizando mediciones de absorbancia a $\lambda=450$ nm a diferentes tiempos: 0, 5, 10 y 15 minutos, para detectar la presencia de dopacromo. Para ello, se utilizó un lector de microplaca BIO RAD iMark. Entre cada medición se incubó la muestra en un baño termostatzado a 37 °C. Como control positivo se utilizó ácido kójico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Cada medición se realizó por duplicado y el ensayo se repitió tres veces para cada concentración de compuesto a ensayar. Los porcentajes de inhibición de tirosinasa se calcularon de la siguiente forma:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[\frac{(Abs_{comp.10'} - Abs_{comp.0'}) \cdot 100}{(Abs_{control10'} - Abs_{control 0'})} \right]$$

Los resultados obtenidos del porcentaje de inhibición fueron expresados como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Las IC₅₀ fueron estimadas utilizando el método de Probit.

6.5. Conclusiones

En este capítulo se describe la evaluación de los compuestos sintetizados durante la Parte II de este trabajo, como potenciales inhibidores *in vitro* de tirosinasa.

Como resultado, solo la familia de los 5-amino-pirazol-4-carbonitrilos **3a-h** resultaron activos, por lo que fueron evaluados a distintas concentraciones para determinar sus IC₅₀. Se obtuvieron valores de IC₅₀ del rango milimolar y micromolar. Los compuestos **3a** y particularmente **3b**, presentaron valores de inhibición de tirosinasa próximos al ácido kójico, el inhibidor de referencia.

Sin embargo, no se lograron obtener compuestos considerablemente más activos que el ácido kójico frente a tirosinasa. Para lograrlo sería de suma utilidad complementar estos datos experimentales con estudios teóricos para determinar el modo de unión de estos compuestos con la enzima. También se podría completar el estudio con datos del tipo relación estructura-actividad y así optimizar la estructura de potenciales inhibidores de tirosinasa.

6.6. Referencias bibliográficas

1. Ingle, S. S., Khobragade, C. N. In silico drug docking and screening for the drug discovery of new tyrosinase inhibitors. *J. Pharm. Res.* **6**, 704–708 (2013).
2. Chen, Q.-X., Kubo, I. Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4108–4112 (2002).
3. Okombi, S., Rival, D., Mariotte, A., Perrier, E., Boumendjel, A. Analogues of *N*-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2252–2255 (2006).
4. Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. *Drug Discov. Today* **22**, 282–298 (2017).
5. Solomon, E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563–2605 (1996).
6. Zaidi, K. U., Ali, A. S., Ali, S. A., Naaz, I. Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochem. Res. Int.* **2014**, 1–16 (2014).
7. Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., Sugiyama, M. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* **281**, 8981–8990 (2006).
8. Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 1–11 (1995).
9. Deri, B., Kanteev, M., Goldfeder, M., Lecina, D., Guallar, V., Adir, N., Fishman, A. The unravelling of the complex pattern of tyrosinase inhibition. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
10. Pillaiyar, T., Manickam, M., Jung, S. Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009–2014). *Expert Opin. Ther. Patents* **25**, 1–14 (2015).
11. Park, K., Huh, S. Y., Choi, H. R., Kim, D. Biology of melanogenesis and the search for hypopigmenting agents. *Dermatologica Sin.* **28**, 53–58 (2010).
12. Takahashi, S., Kamiya, T., Saeki, K., Nezu, T., Takeuchi, S., Tanuma, S. Structural insights into the hot spot amino acid residues of mushroom tyrosinase for the bindings of thujaplicins. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 8112–8118 (2010).
13. Battaini, G., Monzani, E., Casella, L., Santagostini, L., Pagliarin, R. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper

- complexes by kojic acid. *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 262–268 (2000).
14. Xie, W., Zhang, H., He, J., Zhang, J., Yu, Q., Luo, C., Li, S. Synthesis and biological evaluation of novel hydroxybenzaldehyde-based kojic acid analogues as inhibitors of mushroom tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 530–532 (2017).
 15. Kolbe, L., Mann, T., Gerwat, W., Batzer, J., Ahlheit, S., Scherner, C., Wenck, H., Stab, F. 4-n-butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **27**, 19–23 (2013).
 16. Chiari, M. E., Joray, M. B., Ruiz, G., Palacios, S. M., Carpinella, M. C. Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: Isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. *Food Chem.* **120**, 10–14 (2010).
 17. Chai, W., Lin, M., Song, F., Wang, Y., Xu, K., Huang, J., Fu, J., Peng, Y. Rifampicin as a novel tyrosinase inhibitor: inhibitory activity and mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* **102**, 425–430 (2017).
 18. Nadeem, M., Sakeh, N. M., Zareen, S., Gul, S., Mun, K., Ul-haq, Z., Adnan, S., Shah, A., Ahmad, S. Design and synthesis of chalcone derivatives as potent tyrosinase inhibitors and their structural activity relationship. *J. Mol. Struct.* **1085**, 97–103 (2015).
 19. Liu, P., Shu, C., Liu, L., Huang, Q., Peng, Y. Design and synthesis of thiourea derivatives with sulfur-containing heterocyclic scaffolds as potential tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 1866–1871 (2016).
 20. Wang, R., Chai, W., Yang, Q., Wei, M., Peng, Y. 2-(4-Fluorophenyl)-quinazolin-4(3H)-one as a novel tyrosinase inhibitor: Synthesis, inhibitory activity, and mechanism. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 4620–4625 (2016).
 21. Pintus, F., Matos, M. J., Vilar, S., Hripcsak, G., Varela, C., Uriarte, E., Santana, L., Borges, F., Medda, R., Di, A., Era, B., Fais, A. New insights into highly potent tyrosinase inhibitors based on 3-heteroaryl coumarins: Anti-melanogenesis and antioxidant activities, and computational molecular modeling studies. *Bioorg. Med. Chem.* **25**, 1687–1695 (2017).
 22. Zhou, Z., Zhuo, J., Yan, S., Ma, L. Design and synthesis of 3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles as new tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 2156–2162 (2013).
 23. Tang, J., Liu, J., Wu, F. Molecular docking studies and biological evaluation of 1,3,4-thiadiazole derivatives bearing Schiff base moieties as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Chem.* **69**, 29–36 (2016).

24. Tan, X., Hun, Y., Park, C., Lee, K., Yoon, J., Wook, D., Dong, K., Woo, K., Curtis-long, M. J., Hun, K. Highly potent tyrosinase inhibitor, neorauflavane from *Campylotropis hirtella* and inhibitory mechanism with molecular docking. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 153–159 (2016).
25. Chiari, M. E., Vera, D. M. A., Palacios, S. M., Carpinella, M. C. Tyrosinase inhibitory activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*. *Bioorganic Med. Chem.* **19**, 3474–3482 (2011).



PARTE III

**ESTUDIO *IN VITRO* E
IN SÍLICO DE POTENCIALES
INHIBIDORES ENZIMÁTICOS**

Capítulo 7

**ESTUDIOS DE
INHIBICIÓN EN XANTINA OXIDASA**

7.1. Introducción

7.1.1. Función y regulación de xantina oxidasa

La enzima xantina oxidoreductasa (XOR, EC: 1.17.3.2) es una enzima del tipo hidroxilasa de molibdeno que cumple un rol fundamental en el catabolismo de las purinas. La XOR está involucrada en el metabolismo de una gran cantidad de compuestos endógenos y exógenos de importancia fisiológica, farmacológica y toxicológica.¹

La XOR existe en dos formas alternativas en mamíferos: xantina deshidrogenasa (XDH) y xantina oxidasa (XO). Bajo circunstancias normales, la enzima existe en su forma deshidrogenada XDH, pero puede ser convertida en su forma oxidasa XO reversiblemente mediante la oxidación de sus residuos Cys en los puentes disulfitos, o irreversiblemente por proteólisis.²

La XO es una proteína homodimérica con una masa molecular de aproximadamente 300 kDa, compuesta por dos subunidades idénticas. Cada subunidad contiene un átomo de molibdeno, una molécula de flavina (FAD) y dos centros metálicos hierro-azufre (2Fe-2S). Los tres dominios de la enzima se observan en la Figura 7.1.^{2,3}

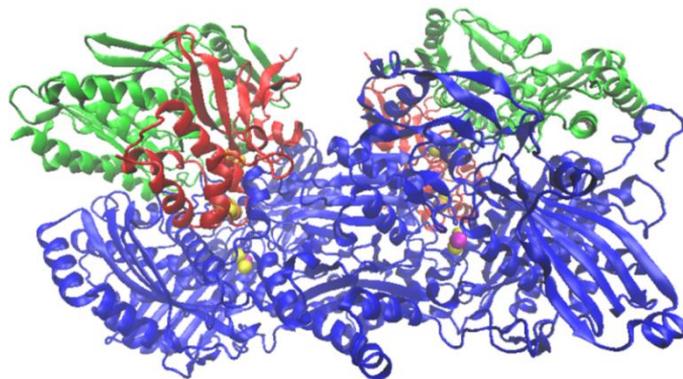


Figura 7.1. Estructura de xantina oxidasa, PDB:3NRZ. Los dominios de Fe (naranja)-S (amarillo), FAD y Mo (púrpura) están coloreados rojo, verde y azul, respectivamente.²

La XO cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina, y luego de ésta a ácido úrico. Dicha oxidación tiene lugar en el centro de molibdeno de la enzima y resulta en la reducción de Mo(VI) a Mo(IV). A continuación, se produce una transferencia electrónica del centro de Mo vía los centros metálicos de Fe-S hacia FAD, donde la enzima es re-oxidada por NAD⁺ u oxígeno molecular (aceptor de electrones externo). Este mecanismo de acción de la XO se representa en la Figura 7.2.⁴⁻⁶

La XO está involucrada en la vía de catabolismo de purinas, en la degradación de ADN y ARN. En un primer paso, la degradación de ADN y ARN en las células produce nucleótidos de desoxiadenosina, desoxiguanosina, adenosina y guanosina. Luego, estos compuestos son sometidos a hidrólisis catalizada por nucleotidasas o fosfatasas, dejando libre los nucleósidos adenosina y guanosina.^{7,8}

Tanto la adenina como la guanina, sufren inicialmente desaminación hidrolítica: la adenina es desaminada cuando todavía se encuentra unida a la pentosa, en forma de adenosina, mientras que la guanina está libre.^{7,8}

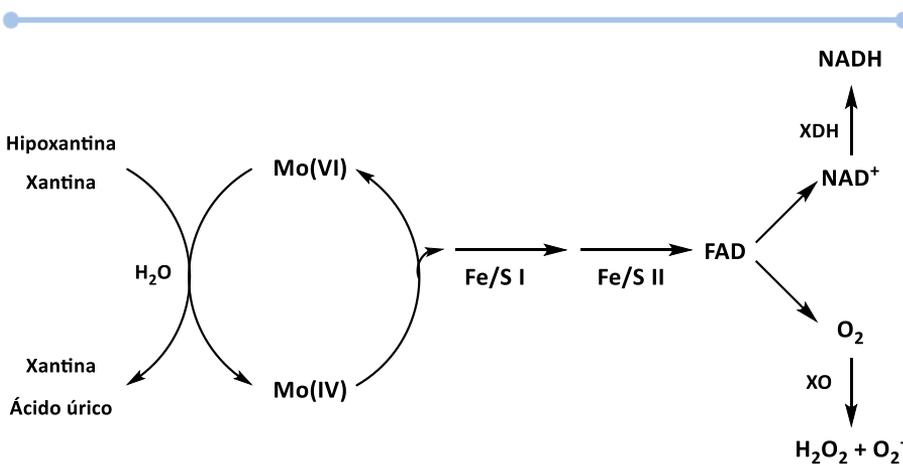


Figura 7.2. Acción de la XO y transferencia de electrones dentro de los distintos dominios de la enzima.

La adenosina desaminasa forma inosina a partir de adenosina (Figura 7.3). Luego, una reacción de fosforilación catalizada por la nucleósido fosforilasa, separa la inosina en hipoxantina y pentosafosfato. En la etapa siguiente, la hipoxantina se convierte en xantina por acción de la XO, mediante la oxidación en el C-2.^{7,8}

Por otro lado, la guanina inicia su catabolismo por desaminación hidrolítica catalizada por guanasa, formando xantina (Figura 7.3). En este punto, las vías catabólicas de adenina y guanina convergen, mediante la formación de un intermediario en común, la xantina. Finalmente, la xantina se oxida en el C-8 por acción de la XO, formando ácido úrico, compuesto poco soluble que se excreta principalmente (~80 %) por orina; el resto se degrada y es eliminado como CO₂ y NH₃ o urea. Todo el proceso descrito para el catabolismo de purinas se puede observar en la Figura 7.3.^{7,8}

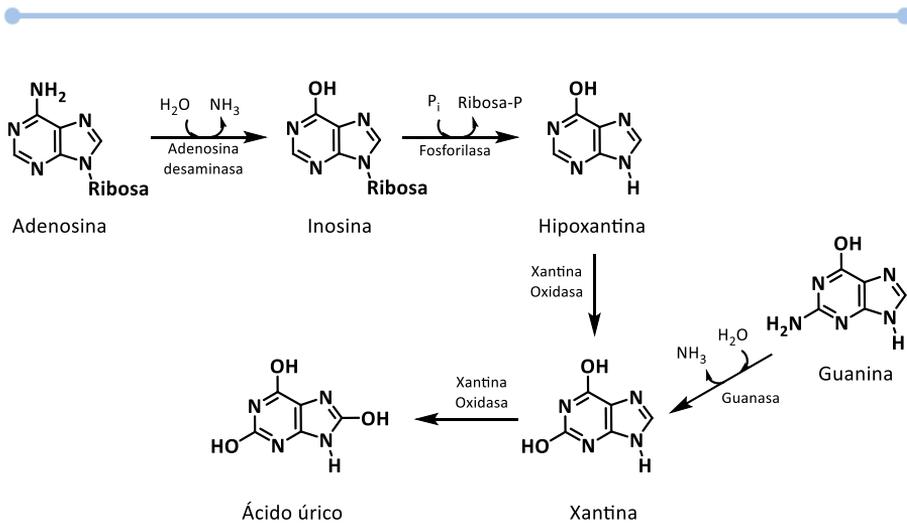


Figura 7.3. Catabolismo de las purinas.

En la Figura 7.4 se puede ver un esquema más general del catabolismo de las purinas, donde están incluidas las fuentes de purinas. La biosíntesis de las bases púricas está regulada cuidadosamente por la enzima fosforribosil pirofosfato (PRPP). De esta forma, se pueden sintetizar purinas a partir de los intermediarios de su vía catalítica (vía en líneas rojas, Figura 7.4).⁸

Las bases púricas no son un requerimiento dietario indispensable, ya que las bases nitrogenadas se producen en las células con tal eficiencia que el organismo podría prescindir del aporte externo. Cuando se ingieren dietas ricas en ácidos nucleicos, aumenta el ingreso de purinas y, en consecuencia, se incrementa la producción de ácido úrico y la excreción de uratos por orina. Un adulto normal produce alrededor de 500 mg de ácido úrico por día. En plasma, este compuesto alcanza una concentración de 4 a 6 mg/dL. A pH sanguíneo la mayor parte del ácido úrico se encuentra desprotonado en el grupo OH del C-8 ($pK_a=5,75$) y se ioniza a urato. En cambio, cuando la orina se acidifica, aumenta la proporción de ácido úrico y tiende a precipitar.⁷

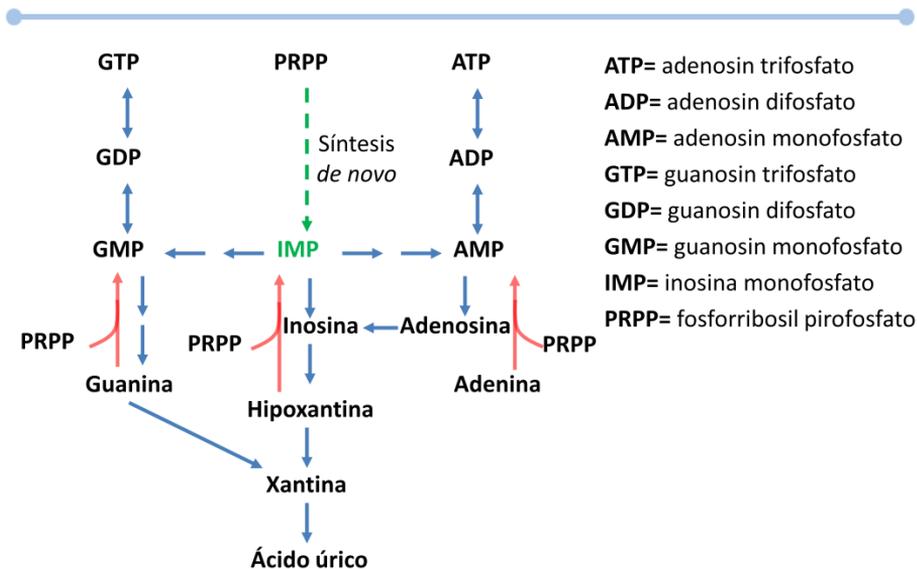


Figura 7.4. Vías de síntesis y degradación metabólica de purinas.⁸

La gota es una enfermedad que se caracteriza por niveles elevados de ácido úrico en sangre, conocido como hiperuricemia, y en orina, llamada uricosuria. La precipitación de uratos en articulaciones produce artritis muy dolorosa. También se producen precipitaciones en cartílagos (pabellón de la oreja) formando nódulos conocidos como tofos.⁷ La gota primaria es un trastorno metabólico de origen genético. Más frecuentemente, la hiperuricemia se debe a la sobreproducción de ácido úrico y precursores (purinas), debido a alguna alteración genética. En otros casos, el defecto radica en el sistema responsable del transporte y secreción de uratos en túbulos renales. Esta gota renal es relativamente menos frecuente que la metabólica.^{7,9}

Asimismo, existe una gota secundaria a las hiperuricemias que acompaña a la nefritis crónica, policitemia, leucemia, etc. Cuando hay una sobreproducción de lactato y compuestos cetónicos (acetoacetato y 3-hidroxiacetato) también se observa la hiperuricemia, ya que estos ácidos compiten con los uratos por los sistemas de excreción en riñón.^{7,9}

Como la XO está involucrada en la vía metabólica de degradación de purinas, se han descrito diversos fármacos inhibidores de esta enzima para reducir los niveles de ácido úrico, y así tratar la hiperuricemia. Usualmente, en la reacción catalizada por XO está involucrado un ataque nucleofílico a un carbono deficiente en electrones, adyacente a un átomo de nitrógeno en un compuesto heterocíclico. Es por eso que los análogos de purinas, al ser heterociclos nitrogenados, pueden actuar como sustratos de la XO.^{1,2}

A continuación, se resumen algunos ejemplos de inhibidores de XO como potenciales candidatos para ser empleados en el tratamiento de hiperuricemia o gota.

7.1.2. Inhibidores de xantina oxidasa

La XO ha sido seleccionada como blanco para el tratamiento de hiperuricemia y la gota. El empleo de inhibidores de XO disminuye la cantidad de ácido úrico formado e incrementa la cantidad de los precursores solubles hipoxantina y xantina que se excretan fácilmente por orina.

Los compuestos descritos como inhibidores de XO se pueden clasificar en dos grandes grupos: compuestos análogos de purinas y compuestos no análogos de purinas. Uno de los fármacos más utilizados perteneciente al primer grupo es el Alopurinol.¹⁰ Este compuesto tiene una estructura similar a la hipoxantina y produce la inhibición "suicida" de XO. El Alopurinol se une al sitio activo de la enzima y es oxidado a oxipurinol o aloxantina. Este compuesto permanece unido a la enzima y la bloquea, disminuyendo la producción de xantina y, por ende, de ácido úrico. El mecanismo de acción de Alopurinol se puede observar en la Figura 7.5 (flecha roja).^{7,11}

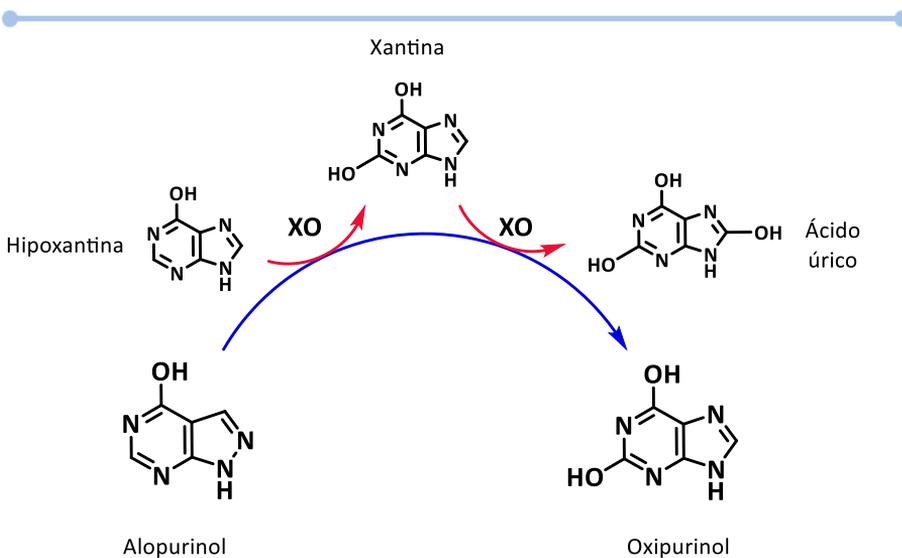
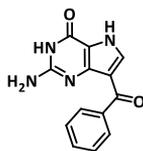


Figura 7.5. Inhibición de la biosíntesis de ácido úrico con Alopurinol. Figura extraída de la referencia 11.

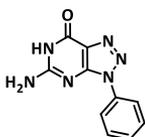
Otros fármacos disponibles comercialmente como inhibidores de XO son Febuxostat, Piraxostat y Topiroxostat. A diferencia del Alopurinol, estos compuestos son no análogos de purinas. Sus estructuras se pueden observar en la Figura 7.6.^{10,12,13}

Por otro lado, numerosas familias de compuestos han sido estudiadas como inhibidores de XO. Se han descritos análogos de guanina, adenina, hipoxantina, y xantina, como inhibidores de XO. Algunos ejemplos de estos derivados son las benzoil-9-deazaguaninas, 9-fenil-8-azaguaninas, 8-azaadenina, 8-arilhipoxantinas, entre otras, que se encuentran en la Figura 7.6.^{11,14}

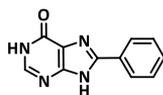
(a) Compuestos análogos de purinas



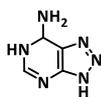
benzoil-9-deazaguaninas



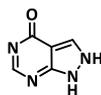
9-fenil-8-azaguaninas



8-aril-hipoxantinas

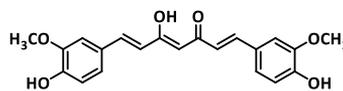


8-aza adenina

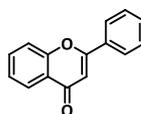


**Alopurinol
comercial**

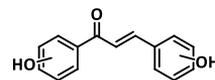
(b) Compuestos no análogos de purinas



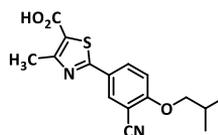
curcumina



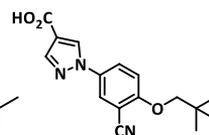
flavonoides



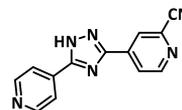
hidroxichalconas



**Febuxostat
comercial**



**Piraxostat
comercial**



**Topiroxostat
comercial**

Figura 7.6. Compuestos (a) análogos y (b) no análogos de purinas descritos como inhibidores de xantina oxidasa.

También se han descrito compuestos que inhiben la XO cuya estructura no está relacionada con las bases púricas, tales como derivados de flavonoides,¹⁵ curcumina,¹⁶ hidroxichalconas,¹⁷ etc. Algunas de las estructuras de dichos compuestos se encuentran en la Figura 7.6.

Considerando la gran cantidad de compuestos análogos de purinas con actividad como inhibidores de xantina oxidasa, en este capítulo se describe el estudio de pirazolo[1,2,3]triazinonas **9** y **20** sintetizadas previamente (Capítulo 5) como potenciales inhibidores de XO.

7.2. Objetivos específicos

Considerando los inhibidores de referencias de la XO y las similitudes estructurales con las familias de pirazolo[1,2,3]triazin-4-onas previamente sintetizadas, se llevó a cabo un estudio de inhibición enzimática de dichos compuestos. Además, se realizó un estudio de *docking* para evaluar el modo de unión de las pirazolotriazinonas con la XO.

Los objetivos específicos de esta sección se detallan a continuación:

- Evaluar las pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **9b-h** y pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos de etilo **20a-c,e-g** como potenciales inhibidores de XO.
- Estudiar el modo de unión de las pirazolotriazinonas **9** y **20** con la enzima XO, empleando modelado molecular.
- Realizar un análisis comparativo de los resultados experimentales de actividad inhibitoria con las simulaciones computacionales.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Actividad inhibitoria *in vitro* de xantina oxidasa

En primer lugar se realizó la evaluación *in vitro* de los compuestos **9b-h** y **20a-c,e-g** como potenciales inhibidores de la XO. Para ello, se utilizó la técnica descrita en bibliografía,¹⁸ y se evaluaron los compuestos a una concentración inicial de 10 μM .

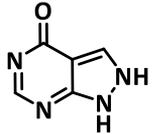
Aquellos compuestos que presentaron una actividad inhibitoria de XO a 10 μM , fueron evaluados a menores concentraciones para determinar sus IC_{50} . Estas medidas fueron realizadas en colaboración con las Dras. María Daniela Santi y María Gabriela Ortega del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Como resultado de los ensayos, se obtuvieron valores de IC_{50} del rango micromolar y submicromolar que se detallan en la Tabla 7.1. Entre los compuestos más activos, los derivados **9b**, **d**, **f** y **h** presentaron valores de IC_{50} del orden del Alopurinol. Sin embargo, en ninguno de los casos se logró mejorar la actividad con respecto al inhibidor de referencia.

Las determinaciones de las IC_{50} mostraron que los compuestos **9** resultaron levemente más activos que los derivados **20**. Además, dentro de los núcleos **20**, la presencia de grupos dadores de densidad electrónica en el anillo fenilo aumentó ligeramente la inhibición enzimática (compuestos **20b** y **20c**), mientras que grupos tomadores de electrones, la disminuyeron levemente (compuestos **20e-g**).

A continuación, se llevó cabo un estudio de *docking* para establecer el modo de unión a la XO, tanto de los compuestos **9** como los **20**, y así poder explicar las diferencias entre los valores de IC_{50} obtenidos y las tendencias dentro de cada tipo de heterociclo.

Tabla 7.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de las pirazolotriazinonas **9** y **20** frente a la enzima xantina oxidasa.

Estructura	Compuesto	R	IC ₅₀ (μM) ^b
	Allopurinol ^a	-	0,247±0,004
	9b	Ph	0,969±0,004
	9c	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	1,115±0,001
	9d	<i>p</i> -F-C ₆ H ₄	0,97±0,01
	9e	<i>m</i> -F-C ₆ H ₄	2,929±0,001
	9f	<i>o</i> -F-C ₆ H ₄	0,907±0,004
	9g	piridin-2-il	0,980±0,001
	9h	bencil	1,546±0,005
	20a	Ph	5,715±0,001
	20b	<i>p</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄	3,96±0,02
	20c	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	1,620±0,001
	20e	<i>p</i> -Cl-C ₆ H ₄	7,09±0,04
	20f	<i>p</i> -Br-C ₆ H ₄	7,83±0,05
	20g	<i>p</i> -I-C ₆ H ₄	8,56±0,02

(a) Control positivo. (b) Los valores de IC₅₀ son el promedio ± desviación estándar de al menos tres mediciones independientes.

7.3.2. Estudios de *docking* de pirazolo[1,2,3]triazinonas en xantina oxidasa

Para evaluar el modo de unión entre las pirazolotriazinonas y el sitio activo de la XO, se llevó a cabo un estudio computacional, tomando como base la estructura cristalográfica de XO 1N5X y utilizando el programa AutoDock.¹⁹ Estos cálculos fueron realizados en el marco de un proyecto en colaboración con las Dras. Ana Martínez, Nuria E. Campillo y el Farm. Carlos Roca, procedentes del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España.

En primer lugar, se realizó un estudio de la estructura cristalográfica de la XO co-cristalizada con Febuxostat como inhibidor de referencia. Este compuesto presenta un modo de unión a la XO análogo al alopurinol y al oxipurinol. En la Figura 7.7 se muestra la pose cristalográfica de dicho inhibidor en la enzima. Se pueden observar interacciones con los residuos E802 y R880, los cuales son de suma importancia para la inhibición, ya que estos aminoácidos son esenciales para la reacción catalítica (conjuntamente con E1261).²⁰

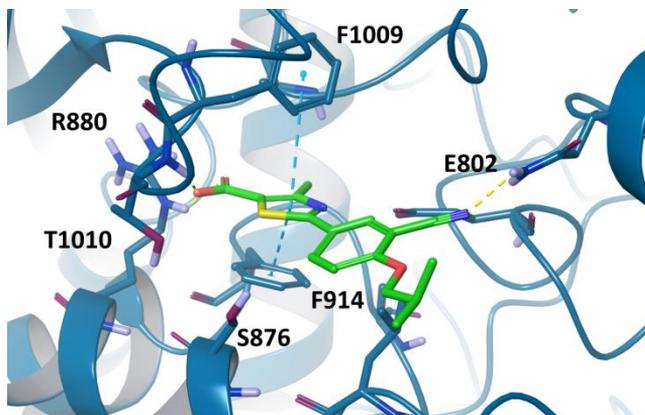


Figura 7.7. Estructura cristalográfica de xantina oxidasa co-cristalizada con el inhibidor Febuxostat (PDB 1N5X).

A continuación, se optimizaron las estructuras de las pirazolotriazinonas **9** y **20** utilizando el *software* LigPrep. Todos los compuestos fueron ionizados a pH fisiológico para evaluar los posibles estados de protonación de cada uno. De esta forma, todos resultaron estar desprotonados en el N-3 a dicho pH.

Luego, se realizó el estudio de *docking* de los compuestos **9** y **20**, y se evaluó su modo de unión en la XO, basado en la energía de unión y en la población de los *clusters* obtenidos. Además, se analizaron las interacciones más importantes ligando-proteína, entre ellas las hidrofóbicas, aromáticas y puentes de hidrógeno.

Como resultados, se observó que todos los compuestos **9** mostraron un modo de unión similar en la región catalítica de la proteína. A modo de ejemplo, en la Figura 7.8 se muestra la pose de *docking* obtenida para **9b**. Entre las interacciones principales ligando-proteína se observó la formación de un puente de hidrógeno entre el N-2 de **9b** y el *backbone* de T1010, interacciones electrostáticas con R880 y aromáticas del tipo π - π *stacking* con F914 y π - π T-shaped con F1009. Además, el grupo fenilo en el N-7 se orienta en una región hidrofóbica de la cavidad formada por los residuos L648, F649, L873, V1011, F1013 y L1014.

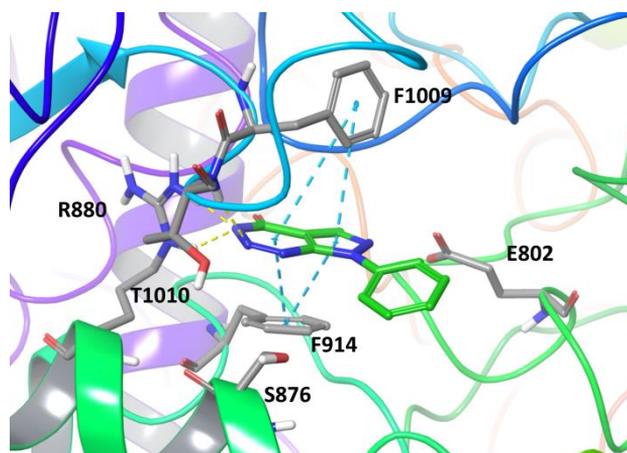


Figura 7.8. Modo de unión del compuesto **9b** en la enzima XO.

El modo de unión encontrado para los compuestos **9** solo se diferencia en las interacciones que presenta el sustituyente del anillo fenilo del N-7, que depende de la naturaleza y la posición en la que se encuentre. Por ejemplo, en el caso de **9f** (R = *o*-F-C₆H₄) el átomo de fluor se orienta hacia S876, mediante una interacción de halógeno con la cadena lateral de dicho residuo (Figura 7.9a). En cambio, el flúor en la posición *para* del anillo fenilo (**9d**, R = *p*-F-C₆H₄) se orienta hacia la región externa de la cavidad, sin la posibilidad de interactuar con alguno de los residuos de la XO. Este hecho podría explicar por qué la actividad de los compuestos **9b** (R = Ph) y **9d** son casi idénticas (IC₅₀ = 0,969 y 0,97 μM, respectivamente). Lo mismo ocurre para **9g** (R = piridin-2-il), que presenta un modo de unión similar a **9b**, y un IC₅₀ = 0,980 μM.

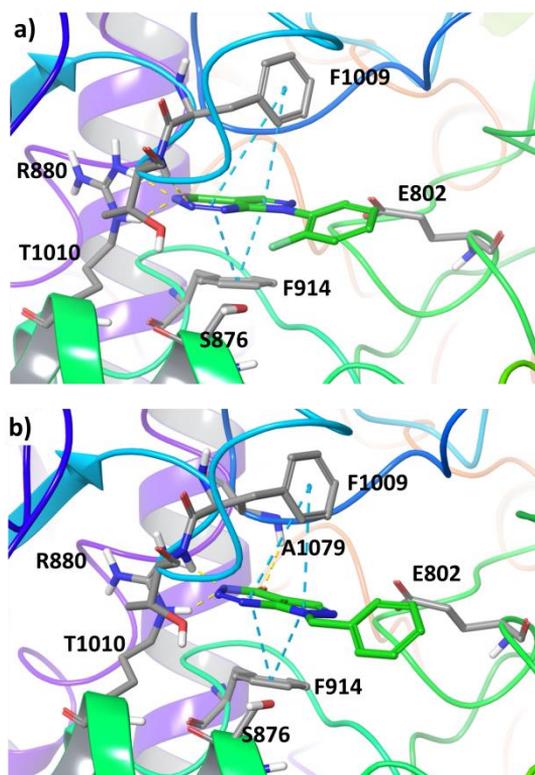


Figura 7.9. Modo de unión de los compuestos (a) **9f** y (b) **9h** en la enzima XO.

Entre las pirazolotriazinonas **9**, el derivado **9h** (R = bencil) presenta mayores diferencias en el modo de unión con la XO, debido a la flexibilidad del sustituyente en el N-7 (Figura 7.9b). El compuesto **9h** se acomoda en el bolsillo de forma tal de orientar el anillo aromático hacia la región hidrofóbica, mencionada anteriormente. En la Figura 7.9 se puede observar la diferencia en la orientación del núcleo de pirazolotriazinona para los compuestos (a) **9f** y (b) **9h** (IC_{50} = 0,907 y 1,546 μ M, respectivamente).

Por otro lado, en el estudio de *docking* de los compuestos **20** se obtuvo un modo de unión diferente al encontrado para los derivados **9**, ya que el núcleo de pirazolotriazinona adquiere una orientación diferente. Este cambio se debe, principalmente, al impedimento estérico generado, tanto por la presencia del sustituyente en el N-6, como por el grupo carboetoxi del C-7. Ambos impiden que el núcleo de pirazolotriazinona mantenga la misma orientación que para la familia **9**. Para ejemplificar, en la Figura 7.10 se muestra el modo de unión del compuesto **20a** con XO. Se observan interacciones del tipo electrostáticas con la cadena lateral de R880, el enlace puente de hidrógeno entre el NH del *backbone* de V1011 y T1010 con el grupo carbonilo del anillo de triazinona e interacciones aromáticas π - π *stacking* con F914 y π - π T-shaped con F1009.

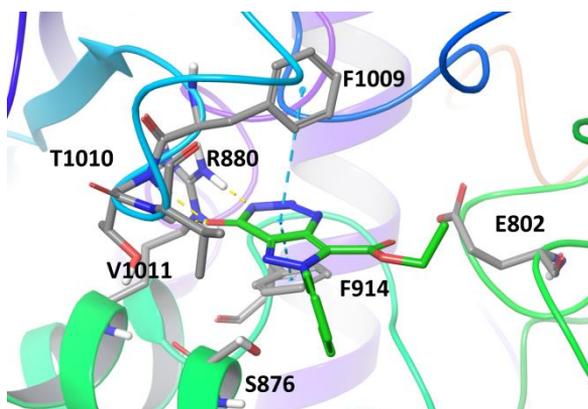


Figura 7.10. Modo de unión del compuesto **20a** en la enzima XO.

Cuando se analizan los resultados obtenidos ente los distintos derivados **20**, se encuentran diferencias en el modo de unión a XO, según sean los distintos sustituyentes del anillo fenilo en el N-6. Los compuestos **20c** y **20e-g**, interaccionan con la XO mediante la formación de un enlace puente de hidrógeno (**20c**, Figura 7.11a) o un enlace halógeno (**20e-g**) con R880. Además, para los compuestos **20b**, **20c** y **20e**, se observan interacciones aromáticas del anillo fenilo con F914 del tipo π - π *stacking*, y con F1009 mediante π - π *T-shaped*. En cambio, el anillo arilo de los compuestos **20f** y **20g** (R = *p*-Br-C₆H₄ y R = *p*-I-C₆H₄, respectivamente), solo presenta interacciones aromáticas π - π *T-shaped* con F1009, debido al impedimento estérico que se genera por la presencia de los sustituyentes halógenos voluminosos (**20g**, Figura 7.11b).

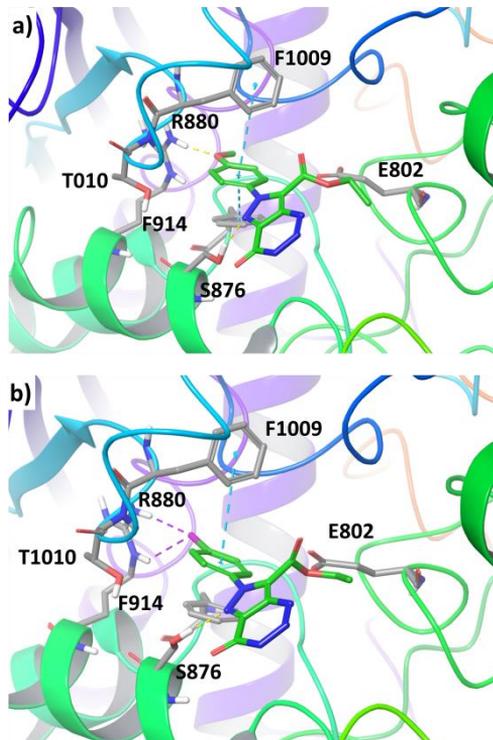


Figura 7.11. Modo de unión de los compuestos (a) **20c** y (b) **20g** en XO.

Las interacciones del grupo fenilo unido al N-7 con las fenilalaninas F914 y F1009 se incrementan cuando la densidad electrónica del anillo aumenta. Así, para los compuestos **20b** y **20c**, con sustituyentes con grupos dadores de electrones en el fenilo ($R = p\text{-CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$ y $R = p\text{-OCH}_3\text{-C}_6\text{H}_4$, respectivamente), se genera una interacción favorable y más fuerte con F1009. Ésta se traduce en mejores valores de actividad ($IC_{50} = 3,96 \mu\text{M}$ para **20b** e $IC_{50} = 1,62 \mu\text{M}$ para **20c**), comparado con los compuestos **20e-g** (IC_{50} entre 7,1-8,6 μM), que contienen un halógeno como sustituyente, que se comporta como grupo tomador de densidad electrónica.

7.4. Metodología

7.4.1. Ensayos de actividad en xantina oxidasa

Los ensayos de actividad de XO se realizaron de acuerdo al protocolo descrito en bibliografía.¹⁸ Para ello, se utilizó la enzima de leche bovina y xantina como sustrato, ambos obtenidos de Sigma Aldrich.

En primer lugar, se preparó un buffer de K_2HPO_4/KH_2PO_4 0,07 M y pH=7,5. Luego, se prepararon una solución de xantina 150 μ M y una solución de XO de 0,04 U/mL, utilizando dicho buffer. Para cada compuesto a ensayar, se prepararon soluciones madre en DMSO que luego fueron diluidas a la concentración correspondiente con buffer.

Para cada medida se colocaron 21,4 μ L de XO y 0,75 mL de la solución del compuesto a medir (o de buffer en caso del control), que se pre-incubaron a 25 °C por 15 min. Luego, se adicionaron 0,45 mL de solución de xantina 150 μ M y se incubó la mezcla por 30 min a 25 °C. A continuación, se adicionó 1 mL de HCl 1 N para frenar la reacción y se midió la absorbancia a $\lambda = 290$ nm, para detectar la presencia de ácido úrico. Para ello se utilizó un Espectrofotómetro UV-Vis Cary Win, Varian, Inc., Agilent *Technologies*.

Como control positivo se utilizó Alopurinol (obtenido de Sigma Aldrich) y cada medición se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Los porcentajes de inhibición de XO se calcularon empleando la ecuación que se detalla a continuación, y las IC_{50} fueron estimadas utilizando el programa *OriginPro 8*.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \cdot 100$$

7.4.2. Simulaciones de *docking* en xantina oxidasa

Preparación de los ligandos

Los ligandos fueron preparados utilizando el *software* LigPrep,²¹ implementado en la *suite* de Maestro.²² Éstos se ionizaron a $\text{pH} = 7,3 \pm 0,3$ utilizando Epik con campo de fuerza OPLS2005 y se generaron los posibles tautómeros y estereoisómeros.

Preparación de la proteína

Se utilizó la estructura cristalográfica de la proteína XO de leche bovina de código PDB 1N5X obtenida de la base de datos PDB (*Protein Data Bank*). La proteína fue preparada utilizando el programa *Protein Preparation Wizard of Maestro Suite*.^{23,24} Para ello, se eliminaron los ligandos, metales y moléculas de agua. Además, se agregaron los átomos de H y se asignaron los estados de protonación de todos los residuos a $\text{pH} 7,6$. Se realizó una minimización de la energía de la estructura de la proteína, hasta que los átomos pesados convergieron a 3,0 de RMSD.

Docking

Las simulaciones de *docking* fueron realizadas con el programa AutoDock 4.2.¹⁹ Para el estudio de *docking* de los compuestos evaluados se utilizó un tamaño de grilla de 50x50x50 puntos, con un espaciado de 0,375 Å. El protocolo de *docking* consistió en la generación de 200 poses independientes (*number of GA runs*) por ligando utilizando Lamarkian GA como algoritmo de búsqueda.

Los resultados de *docking* para un par dado de ligando-proteína proporcionaron información sobre la energía de interacción intermolecular, incluyendo la constante de inhibición, la energía de interacciones de puente de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, energía electrostáticas y eficiencia del ligando. Finalmente, se

analizaron los *clusters* (en los que se clasifican las poses con un valor predeterminado de RMSD inferior a 2,0 Å) más poblados y con energías de unión más favorable obtenidos por Autodock.

7.5. Conclusiones

Con el propósito de obtener compuestos análogos de purinas de interés biológico, se evaluaron las pirazolo[1,2,3]triazinonas sintetizadas durante la Parte II de esta Tesis Doctoral, como inhibidores de XO.

En primer lugar, se evaluaron las pirazolotriazinonas **9b-h** y **20a-c, e-g** sintetizadas previamente, como posibles inhibidores de XO. Como resultado, todos los compuestos mostraron inhibición.

En segundo lugar, se determinaron las IC_{50} de cada compuesto. De esta forma, se obtuvieron valores del orden micromolar y submicromolar (IC_{50} entre 0,907 y 8,56 μM). Algunos de estos derivados resultaron potentes inhibidores de XO, obteniéndose valores de IC_{50} próximos a Alopurinol ($IC_{50} = 0,247 \mu\text{M}$), el inhibidor de referencia.

Posteriormente, se estudió el modo de unión ligando-proteína de las pirazolo[1,2,3]triazinonas con la XO mediante simulaciones con Autodock. Se identificaron las principales interacciones entre cada compuesto con los residuos de la proteína y se determinaron las diferencias entre el modo de unión de ambos núcleos.

Las pirazolotriazinonas **9** presentaron un modo de unión similar en la región catalítica de la XO. Entre las interacciones principales ligando-proteína se observó la formación de un puente de hidrógeno entre el N-2 del compuesto y el *backbone* de T1010, interacciones electrostáticas con R880 y aromáticas del tipo π - π *stacking* con F914 y π - π *T-shaped* con F1009. Además, para el caso de **9f** ($R = o\text{-F-C}_6\text{H}_4$, $IC_{50} = 0,907 \mu\text{M}$) se encontró una interacción de halógeno entre el átomo de fluor y la cadena lateral de S876, lo que explicaría por que este compuesto presentó la mejor actividad inhibitoria de XO entre las pirazolotriazinonas **9**.

Por otro lado, en el estudio de *docking* de los compuestos **20** se obtuvo un modo de unión diferente al encontrado para los derivados **9**, ya que el núcleo de pirazolotriazinona adquirió una orientación distinta. Esto se debe al impedimento estérico generado por la presencia del sustituyente en el N-6 y al grupo carboetoxi del C-7, que impidieron que el núcleo de pirazolotriazinona mantuviese la misma posición que para la familia **9**.

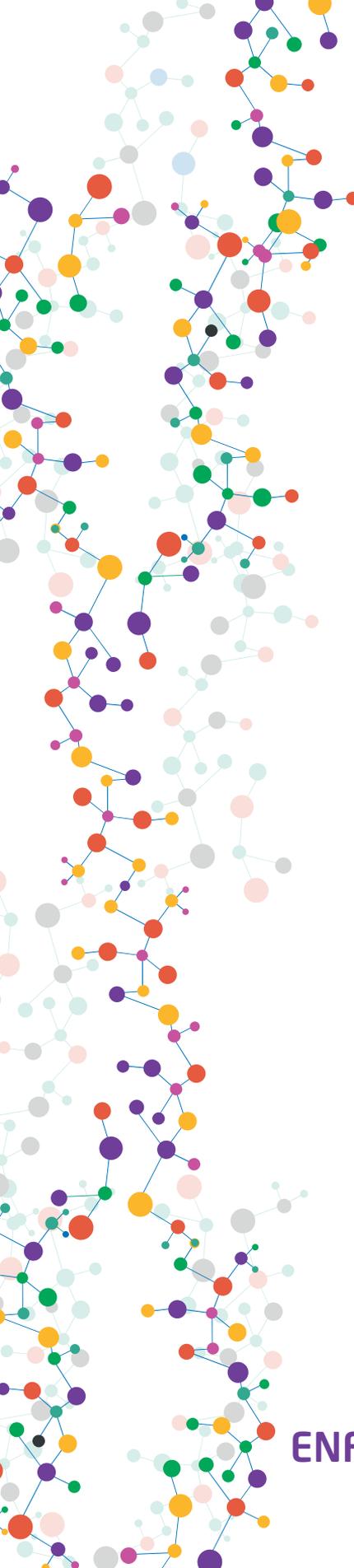
Entre las interacciones principales ligando-proteína para las pirazolotriazinonas **20**, se observaron interacciones del tipo electrostáticas con la cadena lateral de R880, enlace puente de hidrógeno entre el NH del *backbone* de V1011 y T1010 con el grupo carbonilo del anillo de triazinona, y aromáticas π - π *stacking* con F914 y π - π T-*shaped* con F1009.

Dentro de los compuestos **20**, el derivado **20c** (R = *p*-OCH₃-C₆H₄) presentó el mejor valor de actividad inhibitoria (IC₅₀ = 1,62 μ M), ya que las interacciones del grupo fenilo, unido al N-7, con las fenilalaninas F914 y F1009 se incrementaron con el aumento de la densidad electrónica del anillo. Además, para **20c** se describió la formación de un enlace puente de hidrógeno con R880, que también podría estar involucrado en la mejora de la actividad.

7.6. Referencias bibliográficas

1. Rashidi, M.-R., Pashaei-Asl, R. *Readings in Advanced Pharmacokinetic-Theory, Methods and Applications*. InTech, Rijeka, (2012).
2. Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F., Nishino, T. Mammalian xanthine oxidoreductase- mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Fed. Eur. Biochem. Soc. J.* **275**, 3278–3289 (2008).
3. Brondino, C. D., Joa Romao, M., Moura, I., Moura, J. J. G. Molybdenum and tungsten enzymes: the xanthine oxidase family. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 109–114 (2006).
4. Harrison, R. Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase: Where are we now? *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 774–797 (2002).
5. Harrison, R. Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. *Drug Metab. Rev.* **36**, 363–375 (2004).
6. Agarwal, A., Banerjee, A., Banerjee, U. C. Xanthine oxidoreductase: A journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling. *Crit. Rev. Biotechnol.* **31**, 264–280 (2011).
7. Blanco, A. *Química Biológica*. Editorial El Ateneo, Buenos Aires, (2006).
8. Ichida, K., Amaya, Y., Okamoto, K., Nishino, T. Mutations Associated with Functional Disorder of Xanthine Oxidoreductase and Hereditary Xanthinuria in Humans. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 15475–15495 (2012).
9. Pacher, P., Nivorozhkin, A., Szabó, C. Therapeutic Effects of Xantine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev.* **58**, 87–114 (2006).
10. Zhang, T., Li, S., Yuan, W., Wu, Q., Wang, L., Yang, S., Sun, Q., Meng, F. Discovery and biological evaluation of some (1*H*-1,2,3-triazol-4-yl) methoxybenzaldehyde derivatives containing an anthraquinone moiety as potent xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 729–732 (2017).
11. Borges, F., Fernandes, E., Roleira, F. Progress Towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **9**, 195–217 (2002).
12. Matsumoto, K., Okamoto, K., Ashizawa, N., Nishino, T. FYX-051: A Novel and Potent Hybrid-Type Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **336**, 95–103 (2011).
13. Evenäs, J., Edfeldt, F., Lepistö, M., Svitacheva, N., Synnergren, A., Lundquist, B., Gränse, M., Rönnholm, A., Varga, M., Wright, J., Wei, M., Yue, S., Wang, J., Li, C., Li, X., Chen, G., Liao, Y., Lv, G., Tjörnebo, A., Narjes, F. HTS followed by NMR based counterscreening. Discovery

- and optimization of pyrimidones as reversible and competitive inhibitors of xanthine oxidase. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 1315–1321 (2014).
14. Rodrigues, M. V. N., Barbosa, A. F., Júlia, F., Deborah, A., Vanzolini, K. L., de Moraes, M. C., Corrêa, A. G., Cass, Q. B. 9-Benzoyl 9-deazaguanines as potent xanthine oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 226–231 (2016).
 15. Shi, D., Huang, W., Li, C., Liu, Y., Wang, S. Design, synthesis and molecular modeling of aloe-emodin derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **75**, 289–296 (2014).
 16. Shen, L., Ji, H. Insights into the inhibition of xanthine oxidase by curcumin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 5990–5993 (2009).
 17. Xie, Z., Luo, X., Zou, Z., Zhang, X., Huang, F., Li, R., Liao, S., Liu, Y. Synthesis and evaluation of hydroxychalcones as multifunctional non-purine xanthine oxidase inhibitors for the treatment of hyperuricemia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 3602–3606 (2017).
 18. Schmeda-Hirschmann, G., Loyola, J. I., Sierra, J., Retamal, R., Rodriguez, J. Hypotensive Effect and Enzyme Inhibition Activity of Mapuche Medicinal Plant Extracts. *Phyther. Res.* **6**, 184–188 (1992).
 19. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Pique, M. E., Lindstrom, W., Huey, R., Forli, S., Hart, W. E., Scott, H., Rik, B., Olson, A. J. AutoDock Version 4.2. (2012).
 20. Okamoto, K., Eger, B. T., Nishino, T., Pai, E. F., Nishino, T. Mechanism of Inhibition of Xanthine Oxidoreductase by Allopurinol: Crystal Structure of Reduced Bovine Milk Xanthine Oxidoreductase Bound with Oxipurinol. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **27**, 888–893 (2008).
 21. Schrödinger Release 2016-1. LigPrep, Schrödinger. (2016).
 22. Schrödinger Release 2016-1. Maestro, Schrödinger. (2016).
 23. Schrödinger Release 2016-1. Schrödinger Suite 2016-1 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger. (2016).
 24. Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Sherman, W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).



PARTE III

**ESTUDIO *IN VITRO* E
IN SÍLICO DE POTENCIALES
INHIBIDORES ENZIMÁTICOS**

Capítulo 8

**ESTUDIOS DE INHIBICIÓN
EN ENZIMAS ASOCIADAS A
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

8.1. Introducción

8.1.1. Las enfermedades neurodegenerativas

Actualmente, se conocen numerosas enfermedades neurodegenerativas. Entre ellas, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), son de gran importancia debido a su incidencia y gravedad. Se caracterizan por un deterioro crónico y progresivo del sistema nervioso central. La actividad neuronal se ve afectada en distintos niveles, tal como se observa en la Figura 8.1.^{1,2}

Los desórdenes neurodegenerativos pueden interrumpir vías moleculares, la sinapsis, circuitos neuronales en regiones específicas del cerebro y redes neuronales de mayor jerarquía (Figura 8.1). Esto provoca diversas sintomatologías tales como la disminución de la función cognitiva, trastornos en el movimiento y espasticidad muscular, entre otras.^{1,2}

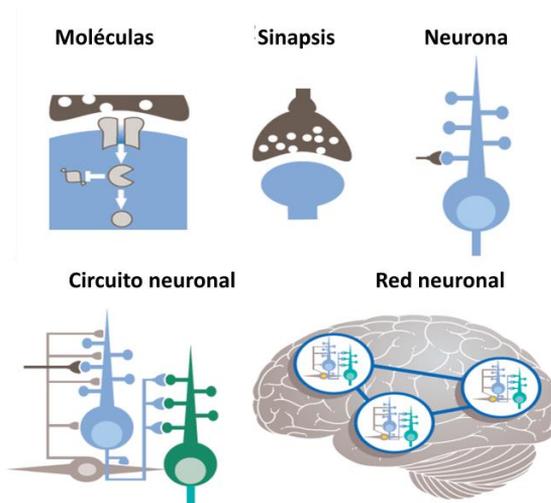


Figura 8.1. Diferentes niveles de actividad neuronal afectados por desórdenes neurodegenerativos. Figura adaptada de la referencia 1.

Los trastornos neurodegenerativos se caracterizan por una pérdida neuronal progresiva, procesos de neuroinflamación, déficit en el funcionamiento de sistemas de neurotransmisores y estrés oxidativo. También, se producen modificaciones postraslacionales en diferentes proteínas que conllevan a un plegamiento anómalo y agregaciones.^{3,4}

Los distintos mecanismos mencionados anteriormente que provocan la neurodegeneración se resumen en la Figura 8.2. Se indican tres caminos, cada uno de un color distinto. La vía de color verde se basa en la pérdida de la actividad normal de la proteína nativa, mientras que el camino rojo está asociado a la neurotoxicidad de los agregados proteicos. En cambio, la vía azul muestra la hipótesis inflamatoria, donde la muerte neuronal esta mediada por la activación de las células astrogliales.⁵

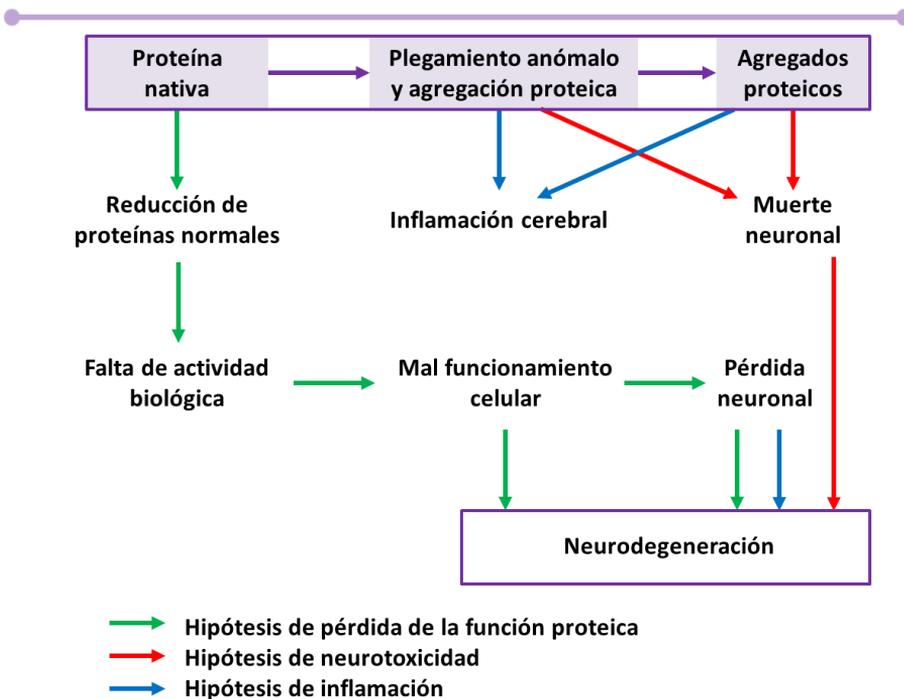


Figura 8.2. Modelos de mecanismos por los cuales se produce la neurodegeneración, asociados al plegamiento anómalo y/o agregación proteica. Figura extraída de la referencia 5.

Hasta el momento, las causas de las enfermedades neurodegenerativas permanecen desconocidas, por lo que solo existen fármacos sintomáticos, paliativos. Solo alivian los síntomas y mejoran la calidad de vida, pero no frenan o curan la enfermedad, ya que la pérdida neuronal continúa. El principal factor de riesgo para padecer alguno de estos desórdenes neurodegenerativos es la edad. Debido al aumento en la esperanza de vida (Figura 8.3) según la organización mundial de la salud (OMS),⁶ se prevé que el número de enfermos se incremente de manera exponencial en un futuro próximo.

Considerando el aumento de la esperanza de vida, es de suma importancia la búsqueda de fármacos eficaces, capaces de retrasar, frenar o revertir el daño neuronal. Para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades se estudian mecanismos moleculares implicados en cada una de ellas. A raíz de estos estudios, existen diferentes hipótesis y distintas dianas implicadas en cada uno de estos desórdenes. A continuación, se describen las bases moleculares implicadas en la enfermedad de Alzheimer y las estrategias terapéuticas para el tratamiento de dicha patología.

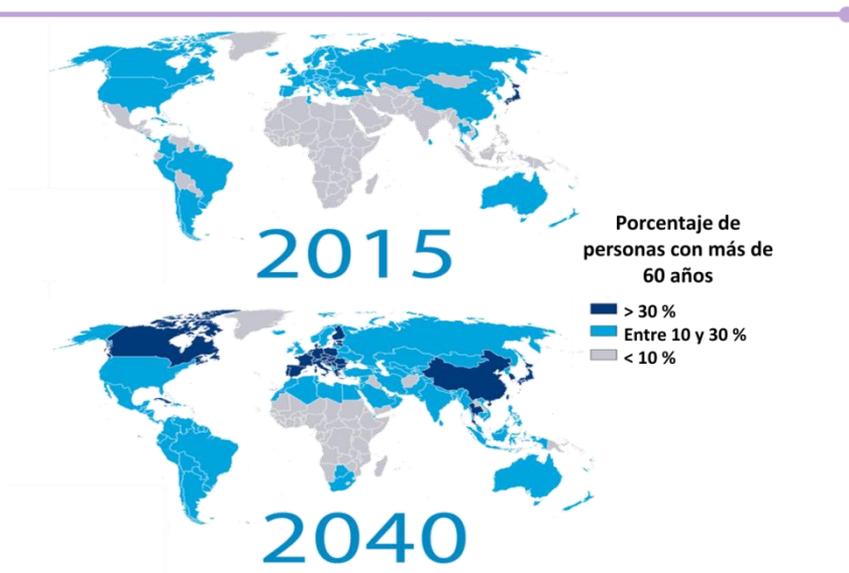


Figura 8.3. Aumento de la esperanza de vida según la OMS en 25 años.

8.1.2. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo irreversible que se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria y de las funciones cognitivas. La EA fue nombrada en honor al Dr. Alois Alzheimer, un científico alemán que fue el primero en describir dicha neuropatología en tejidos cerebrales de mujeres que habían muerto de una enfermedad mental inusual.⁷

La EA se caracteriza por tres cambios estructurales principales en el cerebro: pérdida neuronal, formación de placas β -amiloide extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares. Dichos cambios e implicancias en el sistema nervioso se resumen en la Figura 8.4.⁷

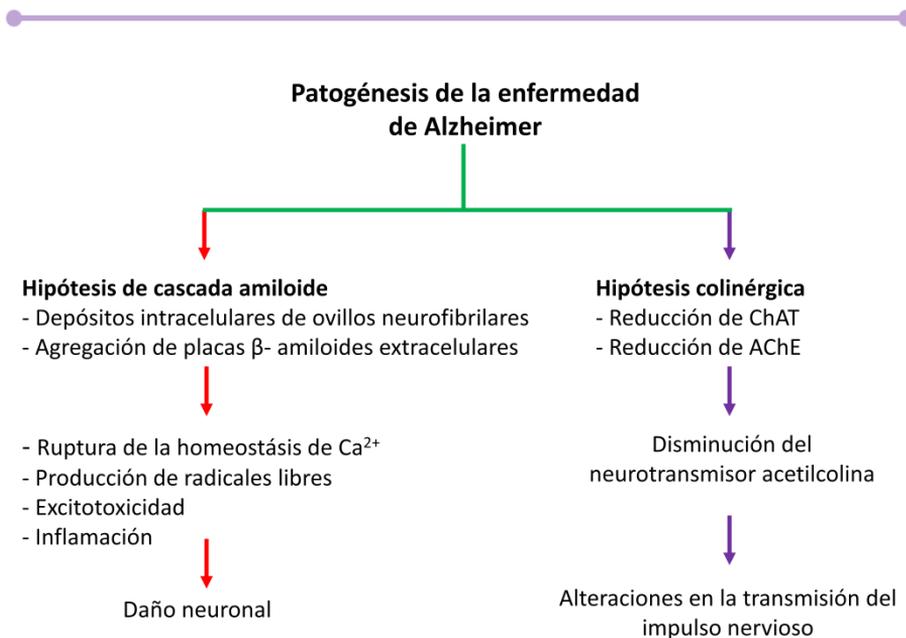


Figura 8.4. Hipótesis principales de la enfermedad de Alzheimer. Figura extraída de la referencia 7.

La pérdida de la función neuronal también se conoce como hipótesis colinérgica y está asociada con la transmisión del impulso nervioso. La EA se caracteriza por una disminución de los niveles del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en regiones del cerebro que regulan el aprendizaje y la memoria. Además, se han observado alteraciones en otros sistemas de neurotransmisores como el dopaminérgico y el serotoninérgico, que también pueden ser responsables de alteraciones en el comportamiento de personas con EA.⁸

Las enzimas del sistema colinérgico tales como acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), al igual que otras enzimas asociadas a otros sistemas de neurotransmisores, son estudiadas como blanco para la EA. De esta forma, se busca prolongar la acción del neurotransmisor en cuestión, inhibiendo la enzima encargada de su degradación.⁸

Por otro lado, la EA se caracteriza por la formación de dos tipos de placas en el sistema nervioso central que intervienen en la neurodegeneración: los ovillos neurofibrilares (NFTs, por sus siglas en inglés) y las placas seniles β -amiloide.⁹

Los ovillos neurofibrilares son agregados intraneuronales de proteína tau hiperfosforilada. La proteína tau es la encargada de estabilizar los microtúbulos del esqueleto de las neuronas. Tau interacciona con α y β tubulina, y su fosforilación juega un papel fundamental en la estabilización de los polímeros de tubulina. Estos polímeros forman los microtúbulos, que son esenciales para el mantenimiento de la estructura neuronal, el transporte axonal y la plasticidad neuronal.^{10,11}

La fosforilación de tau está regulada por un balance entre las enzimas quinasas y fosfatasa. El desajuste de la fosforilación de tau afecta la habilidad de su unión con la tubulina, perturbando la estabilidad de los microtúbulos. Esto provoca una disminución en la viabilidad celular y un colapso del citoesqueleto que se traduce en

muerte neuronal.^{10,11} En la Figura 8.5 se observa la hiperfosforilación de tau, que hace que se desprenda de los microtúbulos y precipite en forma de agregados, dando lugar a la formación de los ovillos neurofibrilares que se depositan en el medio intracelular.¹⁰

Las placas seniles, por su parte, son agregaciones del péptido β -amiloide que se depositan en el medio extracelular. Estas placas son neurotóxicas y dañan a las neuronas en el lóbulo medio temporal y en la corteza frontal, especialmente en el hipocampo. Dichas zonas están asociadas a la cognición y a la memoria, respectivamente.¹²

La proteína precursora amiloide (APP) es una proteína transmembrana que contiene sitios de cortes para diferentes secretasas. En condiciones normales, la α y la β -secretasa (BACE) cortan a la APP formando fragmentos solubles (Figura 8.6, vía A->B).

En cambio, en la EA se produce una ruptura anómala de la APP, ya que actúan la β y la γ -secretasa, dando lugar a la formación del péptido β -amiloide. Las quinasas GSK-3 y CK-1, entre otras, promueven la formación del péptido mediante la fosforilación y sobreactivación de las β y γ -secretasa. Este péptido es insoluble, por lo que precipita formando fibras amiloides y placas seniles que se depositan en el medio extracelular (Figura 8.6, vía A->C).^{13,14}

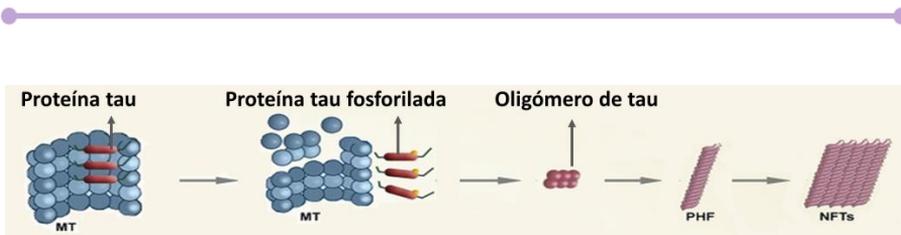


Figura 8.5. Hiperfosforilación de tau y formación de ovillos neurofibrilares (NFTs). Figura adaptada de la referencia 10.

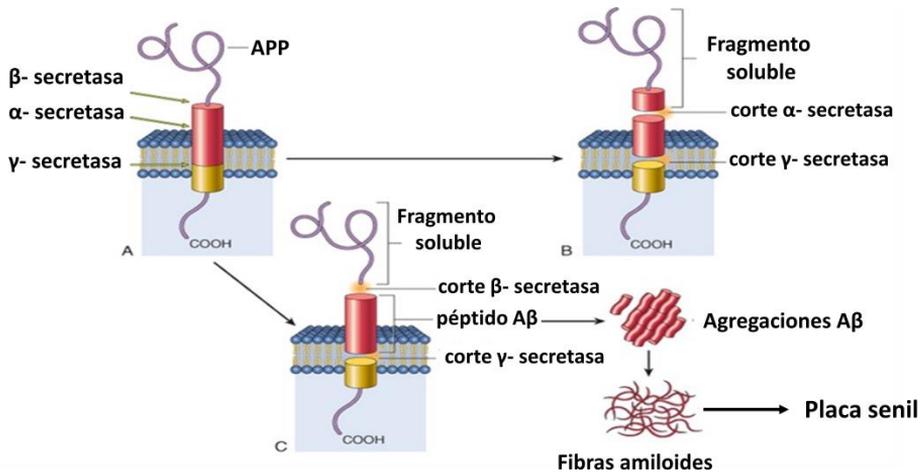


Figura 8.6. Ruptura normal (vía A->B) y anómala (vía A->C) de APP, que da lugar a la formación de las placas β-amiloides.

De acuerdo a los cambios estructurales mencionados anteriormente, los cuales se producen en el cerebro en la EA, existen distintas dianas farmacológicas que se estudian para el tratamiento de esta enfermedad. A continuación, se describen algunos de estos *targets*, que serán objeto de estudio a lo largo de este capítulo.

8.1.3 Acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa como dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Las enzimas colinesterasas, acetilcolinesterasa (AChE, EC: 3.1.1.7) y butirilcolinesterasa (BuChE, EC: 3.1.1.8), forman parte del sistema colinérgico, implicado en la transmisión del impulso nervioso en las neuronas motoras de la médula espinal, las preganglionares del sistema nervioso autónomo y las posganglionares del sistema parasimpático.¹⁵

El impulso nervioso se transmite a través de la sinapsis por intermediarios químicos conocidos como neurotransmisores, que son

liberados en el terminal axónico de la neurona presináptica. Desde el espacio sináptico, el neurotransmisor se dirige a su receptor en la neurona postsináptica, provocando una respuesta específica. Luego, se degrada rápidamente mediante algún mecanismo particular como hidrólisis o modificación química en el mismo espacio sináptico. En algunos casos, el neurotransmisor también puede ser captado a través de la membrana presináptica.¹⁵

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que actúa en el sistema colinérgico estableciendo conexiones en el sistema nervioso central. Una vez que la ACh transmite el impulso nervioso, las colinesterasas la degradan mediante hidrólisis. La AChE es específica para la hidrólisis de ACh, mientras que BuChE también puede hidrolizar otras moléculas tales como succinilcolina, benzoilcolina, y otros péptidos neurotóxicos.¹⁶

En la EA los niveles de ACh están por debajo de lo normal, lo que genera una disminución de las funciones cognitivas y pérdida de la memoria. La administración de inhibidores de colinesterasa (ChE) constituye una estrategia para aumentar su concentración en el cerebro, y así prolongar la transmisión del impulso nervioso.¹⁶

Actualmente, los tratamientos paliativos que se aplican para la EA nacen de la hipótesis colinérgica, por lo que se enfocan en aumentar la ACh durante la transmisión del impulso nervioso, inhibiendo su catabolismo. Sin embargo, solo se consigue aliviar los síntomas pero no se frena o cura la enfermedad, ya que la pérdida neuronal continúa.

Existen diversos fármacos disponibles comercialmente para la EA que son inhibidores de AChE. Estos son: Donepezilo, Rivastigmina, Galantamina y Tacrina. Además, se suele administrar Memantina, que trabaja regulando la actividad del glutamato, un neurotransmisor diferente, que también juega un papel fundamental en el aprendizaje y la memoria.¹⁷ La estructura de éstos se muestra en la Figura 8.7.¹⁸

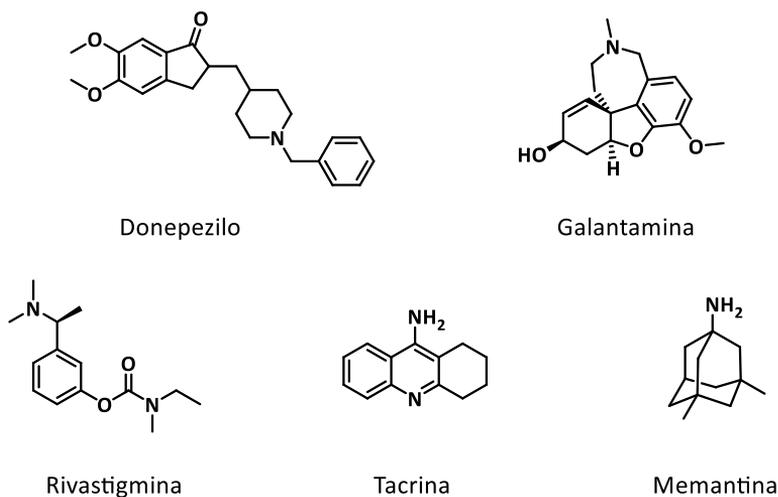


Figura 8.7. Estructura química de fármacos comerciales empleados para el tratamiento de la EA.

Por otro lado, se han descrito numerosos inhibidores de AChE y BuChE, de estructuras químicas sumamente diferentes. Asimismo, se han estudiado análogos de los fármacos disponibles comercialmente, con mejor potencia y mayor selectividad en algunos casos. Entre los compuestos descritos como inhibidores de colinesterasas se encuentran híbridos de tacrina-tiadiazolidinonas,¹⁸ análogos de donepezilo,¹⁹ pirazolo[4,3-*d*]piridinas y pirazolo[3,4-*b*][1,8]naftiridinas,²⁰ indoles sustituidos con hidrazidas e hidrazinas,⁸ y pirazolobenzotiazinas sustituidas con benzoimidazoles,²¹ que se pueden observar en la Figura 8.8.

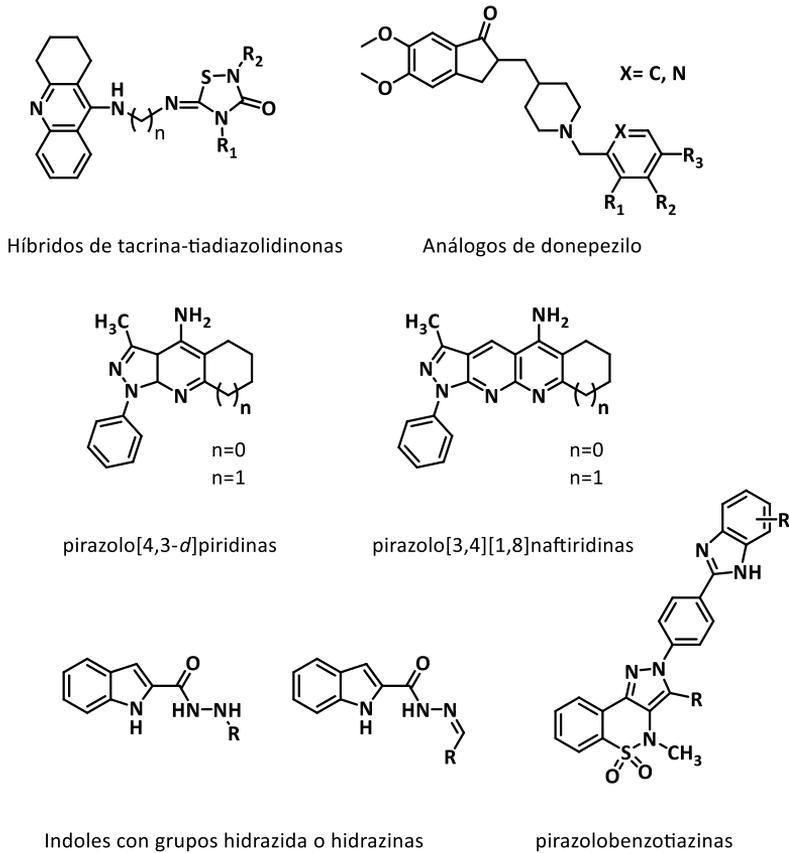


Figura 8.8. Compuestos descritos como inhibidores de ChE.

8.1.4 CK-1 y GSK-3 como dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Las proteínas quinasas son enzimas de suma importancia para la regulación de numerosas funciones celulares tales como su muerte y división, transporte y excreción de moléculas, función cerebral, regulación de presión sanguínea, metabolismo y síntesis de proteínas. La disregulación de la actividad de las quinasas es la responsable de diversas enfermedades como el cáncer, la inflamación, desórdenes neuronales, entre otros. Debido a esto, son consideradas como dianas terapéuticas de gran interés biológico.²²

Las quinasas son específicas de Ser, Thr o Tyr, lo que indica que fosforilan a estos aminoácidos en las proteínas sustrato. Usualmente, suelen conservar su dominio catalítico (sitio de fosforilación del sustrato) en secuencia y estructura, pero difieren en cómo se regula su función catalítica.²³

Específicamente, la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3, EC: 2.7.11.26) y la casein quinasa 1 (CK-1, EC: 2.7.11.1), tienen un papel fundamental en la modulación de diversos procesos celulares. El funcionamiento anómalo de dichas quinasas está asociado a las alteraciones que se producen en el cerebro en la EA.

A continuación, se detallan las implicancias de cada una de estas quinasas en la EA y se describirán algunos de los inhibidores más comunes. Además, se hace hincapié en las funciones de regulación y estructura de la GSK-3, de suma importancia para la interpretación de los resultados obtenidos a lo largo de este capítulo.

8.1.4.1. Función, regulación e inhibidores de CK-1

La proteína quinasa CK-1 es una quinasa serina/treonina (S/T) que se encuentra ampliamente distribuida en diferentes compartimientos celulares, tales como la membrana plasmática, el citosol y el núcleo. La CK-1 tiene un papel fundamental en procesos regulatorios, ya que está involucrada en diversas funciones biológicas como la reparación de ADN, morfología celular, modulación de la ruta metabólica de Wnt/ β -catenina, vía Hedgehog y los ritmos circadianos.^{24,25}

Recientemente, se ha descubierto que la proteína quinasa CK-1 se encuentra relacionada con algunas enfermedades neurodegenerativas, trastornos del sueño, cáncer y patologías inflamatorias. Específicamente, la CK-1 está involucrada en las modificaciones postraslacionales de la proteína tau, implicada en la EA.²⁶ Durante el desarrollo de este desorden neurodegenerativo, la

proteína CK-1 fosforila a la proteína tau de manera específica en los residuos S202/T205 y S396/S404, que están implicados en la unión con la tubulina. Esto hace que tau se desprenda de los microtúbulos y precipite formando ovillos neurofibrilares que se depositan en el medio intracelular.²⁷

La EA también está asociada a la acumulación del péptido β -amiloide que se forma a partir de la APP, por acción de la β y γ -secretasas. Éstas contienen numerosos sitios de fosforilación de CK-1, por lo que una sobreexpresión de dicha quinasa da lugar a un incremento en la producción del péptido β -amiloide.^{14,28}

Las implicancias de la CK-1 en la acumulación del péptido β -amiloide y la formación de ovillos neurofibrilares, hacen que sea una diana terapéutica de suma importancia para el tratamiento de la EA. Diversos inhibidores de CK-1 han sido estudiados y se encuentran descritos en bibliografía.²⁶ La mayoría de ellos son heterociclos de bajo peso molecular. Algunos ejemplos se pueden observar en la Figura 8.9, donde se muestran inhibidores de estructura del tipo isoquinolin-8-sulfonamidas, 4-amino-antraquinonas, oxoindoles, benzimidazoles polihalogenados y pirazolo pirimidinas.²⁶

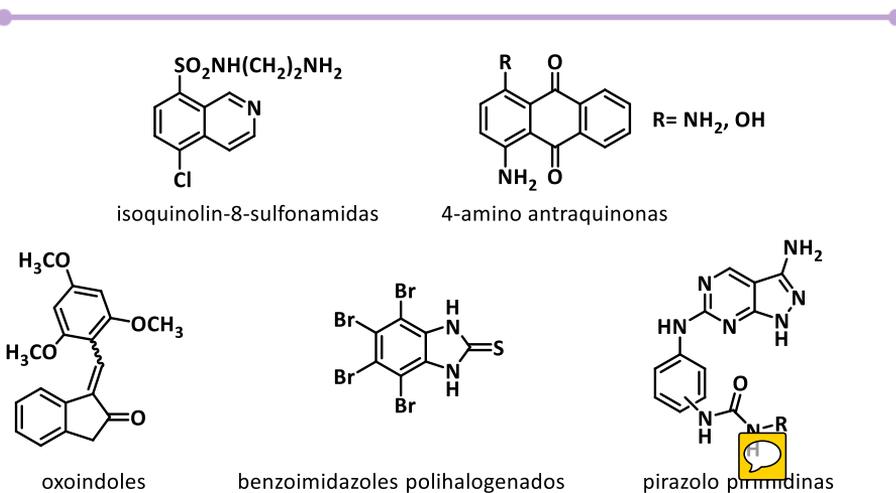


Figura 8.9. Ejemplos de compuestos descritos como inhibidores de CK-1.

8.1.4.2. Función, regulación e inhibidores de GSK-3

La GSK-3 es una quinasa serina/treonina (al igual que la CK-1) involucrada en la regulación de la síntesis del glucógeno y otros procesos intracelulares, como modulación de la vía de señalización de Wnt, transcripción de genes, funciones neuronales, entre otros.²⁹

En las células mamíferas se encuentran dos isoformas de GSK-3, GSK-3 α y GSK-3 β , que son 90 % idénticas y contienen la misma secuencia en su dominio quinasa. Solo difieren en algunos residuos C-terminal y N-terminal.²⁹

La primera estructura cristalina de GSK-3 β fue publicada en el año 2001. A partir de allí, se pudo determinar que esta proteína es una S/T quinasa con un dominio N-terminal pequeño (residuos 25 a 134) y un gran dominio C-terminal (residuos 135 a 380). El sitio de unión con el ATP se encuentra en la interfaz entre los dominios N- y C-terminal y está rodeado por un *loop* rico en glicinas (residuos 60 a 70). La estructura de la GSK-3 β con sus dominios más importantes se puede observar en la Figura 8.10.²⁹

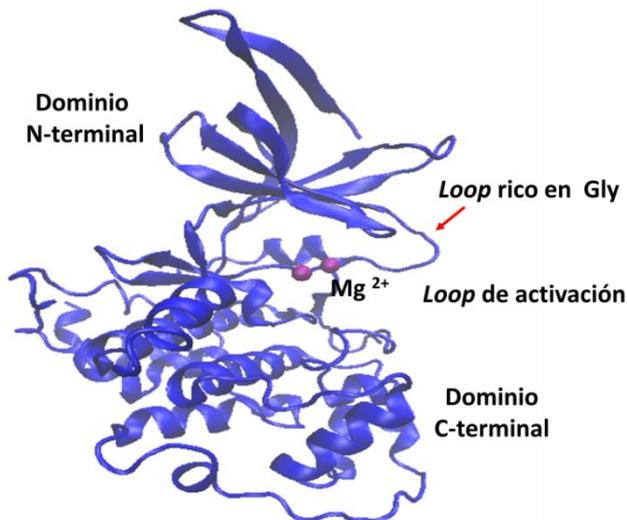


Figura 8.10. Estructura cristalina de la GSK-3 β y principales dominios de la enzima (PDB: 1i09), junto con la molécula de ADP en su sitio de unión.³⁰

La actividad catalítica de la GSK-3 depende de la alineación correcta de los dominios N- y C-terminal, que está modulada por dos residuos fosforilados en el *loop* de activación. GSK-3 β contiene dos sitios de fosforilación que regulan su actividad catalítica, S9 y Y216. El sitio de unión del ATP consiste en un bolsillo bien definido y conservado a lo largo de proteínas quinasas. Entre los residuos más importantes de este sector se encuentran la K85, D200, N186, D181, K183, E97, R96 y R180, que coordinan la transferencia de los grupos fosfatos.²⁹

Existe una región "bisagra" (residuos 133 a 139) que consiste en un *linker* entre el dominio N- y C-terminal y permite que roten uno con respecto a otro. Los residuos de esta región generan enlaces puente de hidrógeno con la porción adenina del ATP. Al comienzo de la región "bisagra" el grupo carbonilo del D133 actúa como un aceptor de puente de hidrógeno con el N-6 del ATP. También se encuentra la V135 que forma un puente de hidrógeno con la adenina, actuando como dador. Por último, el grupo carbonilo del G185 está unido al OH de la ribosa del ATP. Los residuos catalíticos K85 y D200 interactúan con los grupos fosfatos del ATP y son los responsables de la fosforilación. En la Figura 8.11 se puede ver el modo de unión del ATP con la GSK-3 β , donde se indican los principales puentes de hidrógeno que se forman.²⁹

Como se mencionó anteriormente, la GSK-3 cumple diversas funciones en el organismo. Además, se encuentra relacionada a la patogénesis de desórdenes altamente prevalentes tales como la EA, trastornos del estado de ánimo, diabetes, cáncer, entre otros. Por lo tanto, esta enzima constituye una diana terapéutica de suma importancia para el tratamiento de dichas patologías mediante el desarrollo de nuevos inhibidores selectivos de GSK-3.^{31,32}

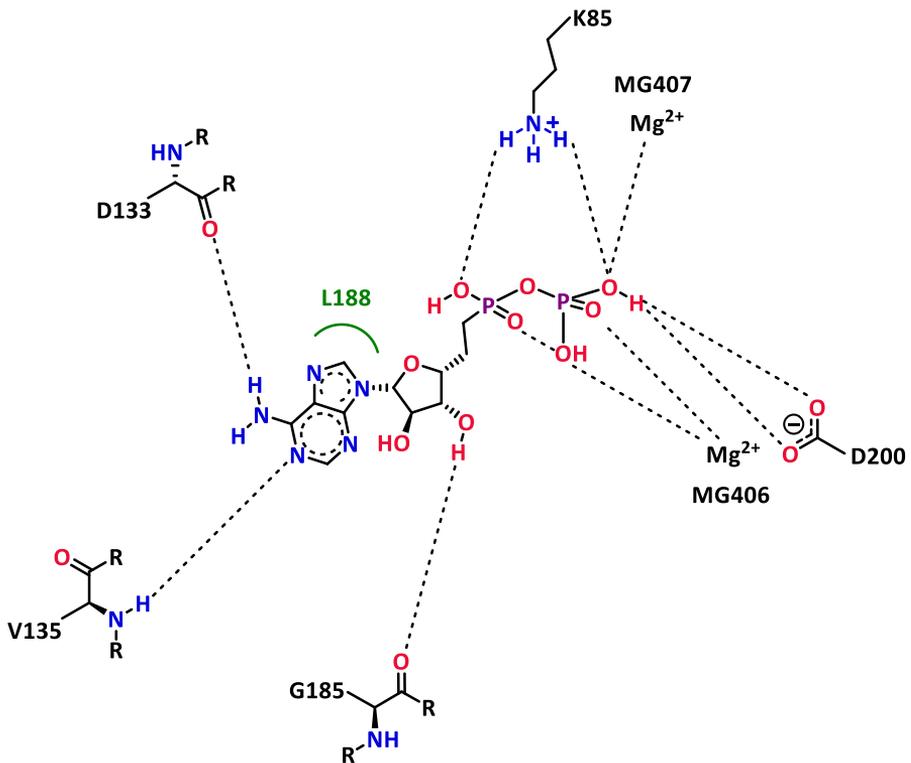


Figura 8.11. Modo de unión del ATP con la GSK-3 (se muestran solo los residuos más relevantes, PDB: 4NM5).

Específicamente, la desregulación de GSK-3 está implicada en diversos procesos de la EA, tales como la hiperfosforilación de tau, el aumento de la producción de las placas β -amiloide, formación de ovillos neurofibrilares, neuroinflamación (mediada por la microglia), estrés y apoptosis celular. Además, esta enzima está asociada a un círculo vicioso que se establece en la EA, ya que inicialmente la formación de placas β -amiloideas y NTFs induce una inflamación local que se incrementa por el estrés y activación de GSK-3, lo que hace que la formación de placas y NTFs sea aún mayor. La relación entre dichos procesos y la GSK-3 se observan en la Figura 8.12.³³⁻³⁶

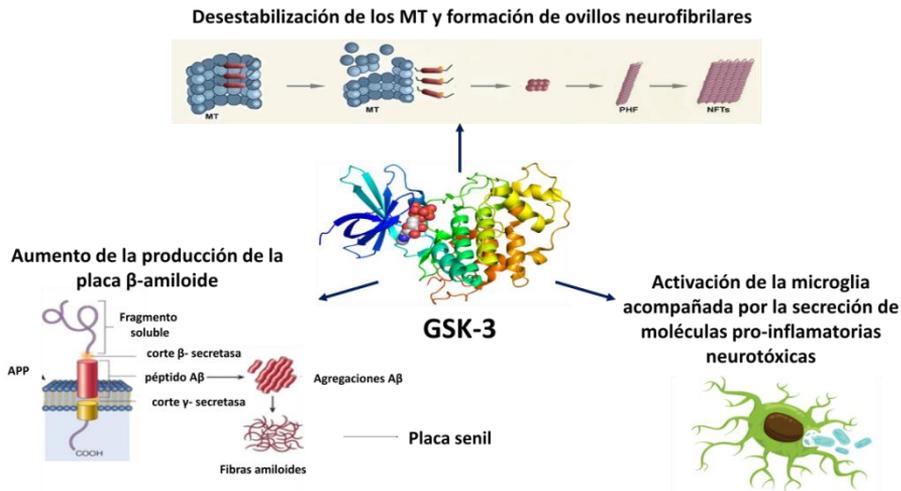


Figura 8.12. Neuroinflamación, aumento de la formación de placas β -amiloides y ovillos neurofibrilares por activación de GSK-3.

La enzima GSK-3 es la encargada de la regulación, degradación y agregación de tau, una proteína neuronal asociada a los microtúbulos. Tau está encargada de la estabilización de los microtúbulos y el transporte axonal. Contiene 85 aminoácidos fosforilables, incluyendo 45 serinas, 35 treoninas y 5 tirosinas, mediante los cuales se regula su función.³⁷

En los cerebros analizados de pacientes con EA se ha encontrado que tau está hiperfosforilada en aproximadamente 40 sitios, entre ellos 28 serinas, 10 treoninas y 2 tirosinas. La mayoría de estos residuos pueden ser fosforilados por GSK-3. La hiperfosforilación de tau afecta a la interacción de esta proteína con los microtúbulos, a su estabilización y dinámica. Además, de esta manera tau se torna más resistente a su degradación por proteólisis. Por lo tanto, se agrega y precipita formando ovillos neurofibrilares, tal como se explicó en el apartado anterior.³⁷

Por otro lado, la enzima GSK-3 se encuentra estrechamente relacionada con la formación de las placas β -amiloides, como se

mencionó en la sección 8.1.2. de este capítulo. Esta quinasa fosforila las β y γ -secretasas, que producen una ruptura anómala de la APP, dando lugar a la formación del péptido β -amiloide. La acumulación de este péptido forma las placas seniles en el medio extracelular.³⁸

Considerando las implicancias de GSK-3 en determinados procesos característicos de la EA, esta enzima constituye una de las dianas terapéuticas más estudiada para el tratamiento de dicha enfermedad. Durante los últimos años, números heterociclos han sido descritos como inhibidores de GSK-3, tales como 3-aryl-pirazol-5-onas,³⁹ alcaloides de la familia de la manzamina,⁴⁰ tiadiazolidinonas (TDZD),^{41,42} pirazolopirimidinas,⁴³ pirazolopiridazinas,^{44,45} pirazolopiridinas,^{44,46,47} pirazinas⁴⁸, triazinonas,⁴⁹ y pirroli-2,5-diol,⁴⁹ entre otros. Las estructuras de éstos se encuentran en la Figura 8.13.

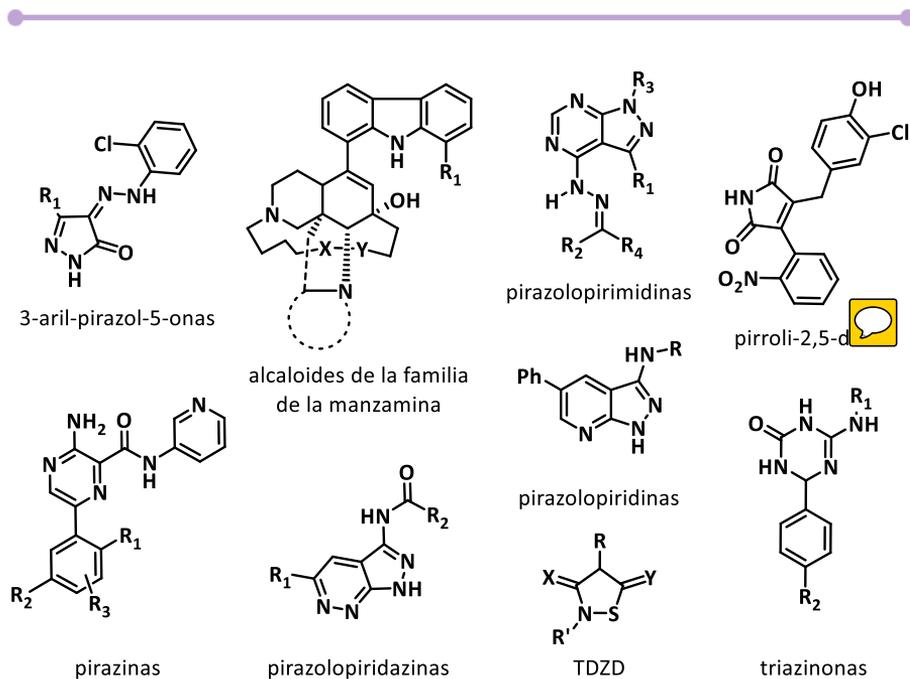


Figura 8.13. Compuestos descritos como inhibidores de GSK-3.

Algunos de los inhibidores de GSK-3 están relacionados estructuralmente con las bases púricas, ya que contienen heterociclos de nitrógeno fusionados, de 5 y 6 miembros. Teniendo esto en cuenta, los compuestos obtenidos durante la Parte II de esta Tesis Doctoral, fueron estudiados como potenciales inhibidores de GSK-3 y las enzimas CK-1, AChE y BuChE, previamente descritas, para el posible tratamiento de la EA. Estos estudios se realizaron en el marco de una estancia en el grupo de Química Médica y Biológica traslacional, bajo la dirección de las Dras. Ana Martínez y Carmen Gil del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid, España.

8.2. Objetivos específicos

Con el propósito de obtener nuevos compuestos bioactivos como potenciales candidatos para el tratamiento de la EA, en este capítulo se estudiaron los compuestos sintetizados durante la Parte II de este trabajo, como inhibidores de distintas enzimas asociadas a dicha enfermedad. Para ello, se utilizaron distintas técnicas, como evaluación de inhibición *in vitro* y modelado molecular.

Los objetivos específicos que se plantearon se detallan a continuación:

- Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de los anillos de pirazoles y pirazolotriazinonas sintetizados, frente a las enzimas AChE, BuChE, CK-1 y GSK-3, asociadas a la EA.
- Obtener las IC_{50} de aquellos compuestos que resulten activos.
- Estudiar el tipo de inhibición enzimática de los compuestos que sean activos.
- Evaluar la capacidad de los compuestos activos para atravesar la barrera hematoencefálica.
- Estudiar el modo de unión de los compuestos que resulten activos mediante simulaciones de *docking*.
- Estudiar la cavidad de la enzima GSK-3 mediante simulaciones de *Hot Spot*.
- En base a los estudios previos, diseñar nuevos inhibidores de GSK-3 potencialmente bioactivos.

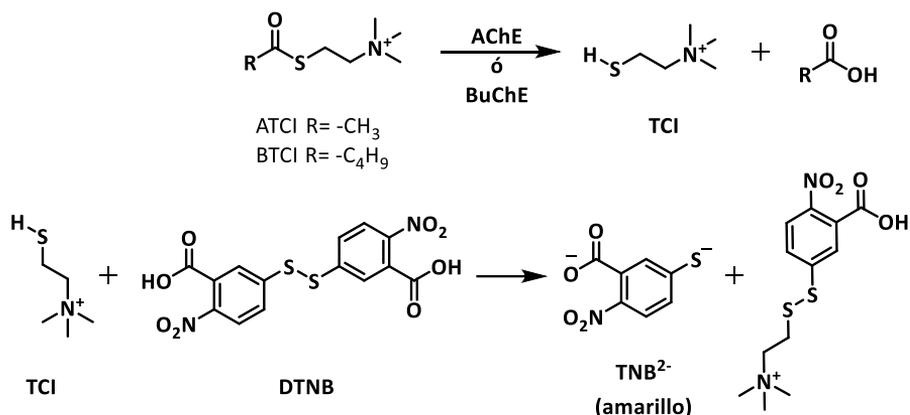
8.3. Resultados y discusión

8.3.1. Actividad inhibitoria *in vitro* de enzimas asociadas a la enfermedad de Alzheimer

8.3.1.1. Ensayos de actividad inhibitoria de AChE y BuChE

Los pirazoles **3a-h** y **7a-h** y las pirazolotriazinonas **9b-h** y **20a-c, e-g** sintetizadas previamente, fueron evaluados como posibles inhibidores de las enzimas AChE y BuChE. Para ello, se empleó el método de Ellman, un ensayo *in vitro* muy similar para ambas enzimas. En él, se utiliza una placa de 96 pocillos con enzima AChE o BuChE, según corresponda. Para el caso de la primera se utiliza como sustrato acetiltiocolina iodada (ATCI), mientras que para BuChE se emplea butiriltiocolina iodada (BTCl). Además, se agrega 3-carboxi-4-nitrofenildisulfito (DTNB), compuesto que tiene la característica de reaccionar con grupos tioles.^{18,50,51}

La reacción enzimática que ocurre es la hidrólisis de ATCI o BTCl por acción de la AChE o BuChE, respectivamente. Esta hidrólisis produce tiocolina iodada (TCI) más acetato o butilacetato. Luego, el DTNB reacciona con la TCI presente en la muestra, dando como resultado el 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB²⁻). Este compuesto es de color amarillo y se puede cuantificar espectrofotométricamente mediante la absorción UV a 450 nm (Esquema 8.1). De esta forma, mientras mayor sea la inhibición de la enzima, menor concentración de TCI habrá, ya que no se producirá la hidrólisis de ATCI o BTCl. Consecuentemente, menor será la formación de TNB²⁻, observándose una disminución de la absorbancia correspondiente a la muestra.



Esquema 8.1. Evaluación de inhibición de las colinesterasas mediante el método de Ellman.

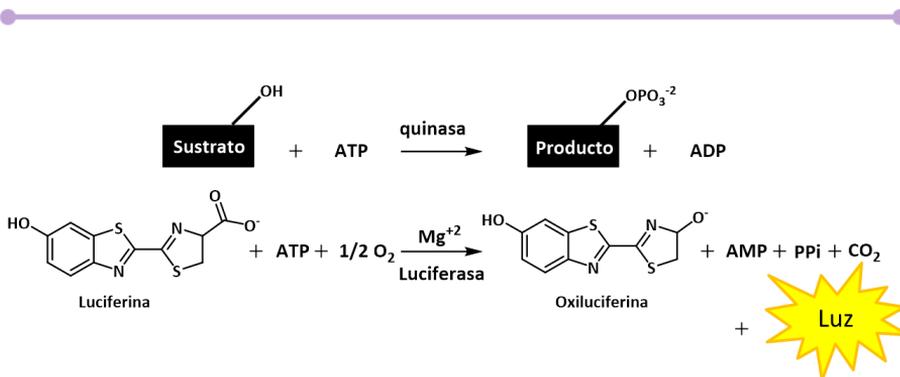
Todos los compuestos sintetizados (**3a-h**, **7a-h**, **9b-h** y **20a-c**, **e-g**) fueron evaluados como posibles inhibidores de AChE y BuChE utilizando la metodología descrita previamente, a una concentración de 10 µM. Como resultado, ninguno de ellos mostró inhibición de las enzimas AChE y BuChE a dicha concentración.

8.3.1.2. Ensayos de actividad inhibitoria de CK-1 y GSK-3

Los pirazoles **3a-h** y **7a-h** y las pirazolotriazinonas **9b-h** y **20a-c**, **e-g** sintetizados previamente, fueron evaluados como posibles inhibidores de las enzimas CK-1 y GSK-3. Para ello, se utilizó un ensayo *in vitro* similar para ambas enzimas.⁵² En éste, se utiliza una placa de 96 pocillos con enzima recombinante humana GSK-3 o CK-1. Para el caso de la enzima GSK-3 se utiliza como sustrato el péptido GS2, mientras que para CK-1 se emplea caseína. Además, se agrega una determinada cantidad de ATP, ya que las quinasas necesitan ATP para cumplir su función y fosforilar al sustrato correspondiente. Los ensayos se realizan en presencia y en ausencia de los compuestos a evaluar.

Para cuantificar la inhibición de los compuestos se utilizó un kit que se comercializa como Kinase-Glo®. ⁵³ Éste contiene D-Luciferina, que reacciona con el ATP del medio y por acción de la luciferasa, genera oxiluciferina más una señal luminiscente, proporcional a la concentración de ATP (Esquema 8.2). Ésta depende de cuánto haya sido inhibida la quinasa, ya que a mayor inhibición, menor cantidad de ATP consumido y, por lo tanto, mayor disponibilidad de ATP para reaccionar con la luciferina, obteniéndose una señal luminimétrica más alta. Dicho de otro modo, mientras mayor sea la luminiscencia, mayor será la actividad del compuesto evaluado, ya que estaría indicando una mayor concentración de ATP en el medio.

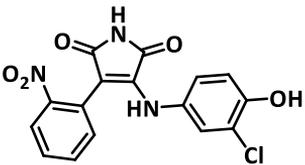
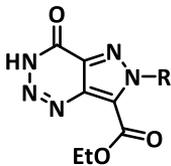
Los compuestos **3a-h**, **7a-h**, **9b-h** y **20a-c**, **e-g** fueron evaluados a una concentración de 10 μM como posibles inhibidores de CK-1 y GSK-3 utilizando la metodología descrita previamente. Como resultado, ninguno de ellos mostró inhibición de la primera quinasa. Además, los pirazoles **3a-h** y **7a-h** y las pirazolotriazinonas **9b-h** tampoco mostraron actividad inhibitoria de GSK-3 a 10 μM . En cambio, las pirazolotriazinonas **20a-c**, **e-g** presentaron una inhibición de dicha quinasa a 10 μM , por lo que se procedió a obtener sus valores de IC_{50} .



Esquema 8.2. Método de evaluación de inhibición de quinasa mediante luminiscencia con el kit Kinase-Glo®.

Las pirazolotriazinonas **20a-c**, **e-g** mostraron valores de inhibición del rango micromolar y submicromolar, que se observan en la Tabla 8.1. Sin embargo, en ninguno de los casos se alcanzó un valor de IC₅₀ próximo a uno de los inhibidores de referencia, la pirrol-2,5-diona SB415286 (IC₅₀ = 0,05 μM).⁴⁹

Tabla 8.1. Evaluación de la actividad inhibitoria frente a GSK-3 de pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos de etilo **20**.

Estructura	Compuesto	R	IC ₅₀ (μM) ^a
	SB415286	-	0,05±0,01
	20a	Ph	4,0±0,2
	20b	<i>p</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄	0,9±0,1
	20c	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	1,7±0,3
	20e	<i>p</i> -Cl-C ₆ H ₄	3,3±0,3
	20f	<i>p</i> -Br-C ₆ H ₄	1,4±0,4
	20g	<i>p</i> -I-C ₆ H ₄	0,8±0,2

(a) Los valores de IC₅₀ son el promedio ± desviación estándar de tres mediciones independientes.

Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos cinéticos para estudiar el tipo de inhibición de **20**. Para ello, se evaluaron los compuestos a concentraciones de 1 μM y 0,5 μM, variando la concentración de ATP, y manteniendo constante la cantidad de GS2. Se obtuvieron resultados similares para todos los compuestos. A modo de ejemplo, en la Figura 8.14 se observan los resultados encontrados para **20b**, representados en una gráfica de Lineweaver-Burk o de doble recíproco. El punto de corte con el eje de las ordenadas (1/v) no se modificó al aumentar la concentración de **20b**, lo que indicaría que estos derivados muestran una cinética ATP-competitiva. Por lo tanto, compiten con el ATP en el modo de unión con la enzima.

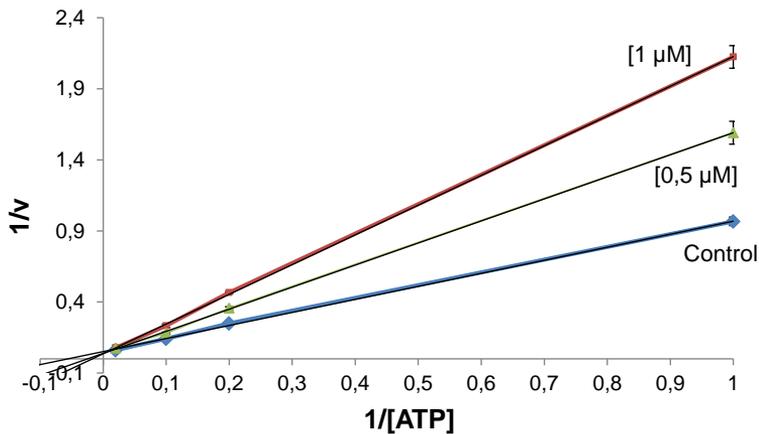


Figura 8.14. Gráfico que representa los datos cinéticos determinados para **20b**.

8.3.2. Ensayo de permeabilidad en membrana artificial paralela

Para que un compuesto pueda ser considerado como futuro candidato para el tratamiento de alguna enfermedad neurodegenerativa, es necesario que tenga la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). De esta forma, podría ingresar al cerebro, donde ejerce su acción. Teniendo esto en cuenta, para evaluar la capacidad de los derivados pirazolotriazinonas **20** para atravesar la BHE, se seleccionó un ensayo de permeabilidad que utiliza una membrana artificial, conocido como PAMPA por sus siglas en inglés (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*).⁵⁴ Esta metodología permite evaluar la permeabilidad (P_e) por difusión pasiva de compuestos orgánicos empleando un lípido obtenido de cerebro porcino que simula la barrera hematoencefálica.

En primer lugar, el método fue validado utilizando diez sustancias comerciales, cuya capacidad para atravesar la BHE es conocida. Se emplearon: atenolol, cafeína, desipramina, enoxacina, hidrocortisona, ofloxacina, piroxicam, promazina, testosterona y

verapamilo. En la Figura 8.15 se observa el gráfico que muestra la correlación obtenida entre los valores de permeabilidad efectiva experimental [Pe(exp)] y los descriptos en literatura. Esta correlación lineal se utilizó para determinar si los compuestos a evaluar atravesarían la BHE, tal como se describe en bibliografía.^{42,54} Con este fin, para cada uno de ellos, primero se obtuvo su Pe(exp).

Teniendo en cuenta la correlación lineal obtenida (Figura 8.15), se considera que un compuesto atravesaría la BHE (SNC+) si tiene un valor $Pe(\text{exp}) > 3,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s, mientras que si el $Pe(\text{exp}) < 1,5 \cdot 10^{-6}$ cm/s, no tendría buena permeabilidad (SNC-) mediante difusión pasiva. Si el Pe(exp) se encuentra entre estos valores, ($1,5 \cdot 10^{-6} < Pe < 3,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s) el compuesto atravesaría parcialmente la BHE y se clasifica como SNC-/+.

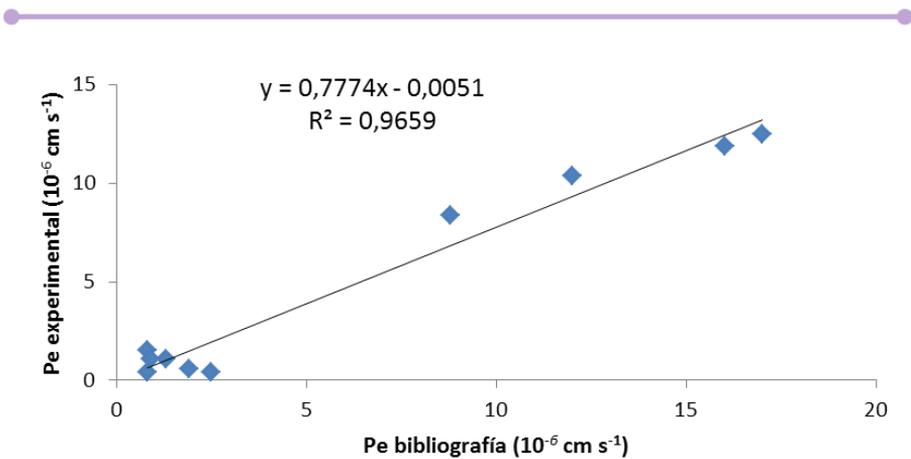
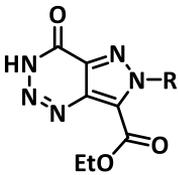


Figura 8.15. Gráfico que representa la correlación lineal entre los valores de permeabilidad obtenidos experimentalmente (Pe experimental) y los descriptos en bibliografía (Pe bibliografía) para los diez fármacos comerciales evaluados.

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 8.2, indicando para cada compuesto su $P_e(\text{exp})$ y la predicción que indica si atravesaría o no la BHE (SNC+, SNC-/+ y SNC-). De acuerdo a los valores obtenidos, solo el compuesto **20a** no sería capaz de difundir por la BHE. Las pirazolotriazinas **20b,c** y **e**, atravesarían parcialmente la BHE. En cuanto a **20f** y **20g**, serían capaces de atravesar la BHE por difusión pasiva. Cabe destacar que dichos compuestos son los que presentaron una mayor actividad inhibitoria de GSK-3 (del rango micromolar bajo- submicromolar).

Tabla 8.2. Valores de $P_e(\text{exp})$ obtenida para los compuestos **20** y la predicción de su capacidad para atravesar la BHE.

Estructura	Compuesto	R	$P_e(\text{exp})$ ($\cdot 10^{-6}$ cm/s)	Predicción ^a
	20a	Ph	1,1±0,6	SNC-
	20b	<i>p</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄	2,3±0,6	SNC-/+
	20c	<i>p</i> -OCH ₃ -C ₆ H ₄	1,6±0,5	SNC-/+
	20e	<i>p</i> -Cl-C ₆ H ₄	3,0±0,7	SNC-/+
	20f	<i>p</i> -Br-C ₆ H ₄	3,20±0,09	SNC+
	20g	<i>p</i> -I-C ₆ H ₄	5±1	SNC+

(a) SNC+: atraviesa la BHE. SNC -/+ atraviesa parcialmente la BHE. SNC-: no atraviesa la BHE.

Estos resultados permitieron seleccionar a los derivados **20f** y **20g** como líderes para el desarrollo de nuevos agentes, para futuros estudios para el tratamiento de la EA.

8.3.3. Estudios computacionales de pirazolo[1,2,3]triazinonas frente a GSK-3

8.3.3.1. Estudios de *docking* de pirazolo[1,2,3]triazinonas sobre GSK-3

De acuerdo a los resultados reportados en el apartado anterior, las pirazolo[1,2,3]triazinonas **9** resultaron inactivas sobre GSK-3, mientras que los derivados **20** presentaron una buena IC_{50} , en el rango micromolar-submicromolar. Estos resultados sugieren que la inhibición de la enzima dependería tanto del tipo de fusión entre el anillo de pirazol y de la triazina, como de los sustituyentes presentes en el primero. Para confirmar esta hipótesis y tratar de establecer alguna relación estructura-actividad, se efectuó un estudio computacional para evaluar el modo de unión de **9** y **20** con la enzima. Para llevar a cabo dicho análisis, se realizó un *docking* partiendo de la estructura cristalográfica de la GSK-3 (4NM5⁵⁵) y con el programa AutoDock.⁵⁶

En primer lugar, se validó el protocolo de *docking* utilizando como inhibidor de referencia Alsterpaulona,⁵⁷ que se encuentra cocrystalizada con la proteína GSK-3 en el archivo PDB 1Q3W. Se realizó un *docking* del ligando en el sitio de unión del ATP y se seleccionó la mejor pose encontrada por el programa. Comparando la posición del inhibidor en el sitio activo de la proteína con la estructura cristalográfica ya reportada (Figura 8.16), se pudo observar que ambas conformaciones son muy similares, y se encontraron las mismas interacciones ligando-proteína. De esta manera, se validó el protocolo de *docking* empleado para predecir el modo de unión de la serie **20**.

En el estudio de *docking* de los compuestos **20** sobre GSK-3, se evaluó su modo de unión, basado en la energía de unión y en la población de los *clusters* obtenidos. También, se analizaron las interacciones más importantes ligando-proteína, entre ellas las hidrofóbicas, las aromáticas y los posibles puentes de hidrógeno.

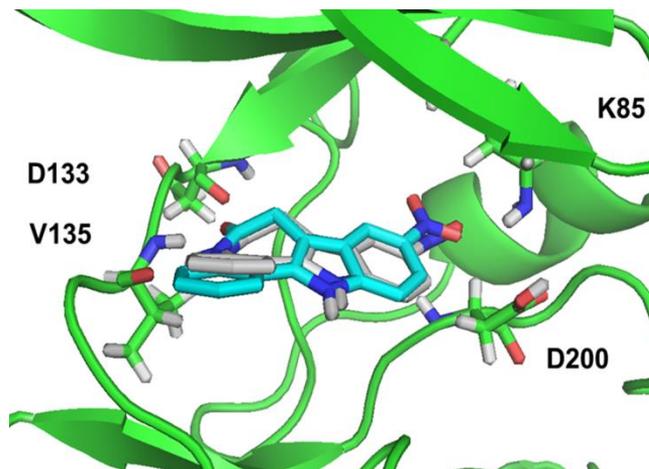


Figura 8.16. Superposición del ligando Alsterpaulona en el sitio de unión con la enzima en la estructura cristalizada (azul) y según el *docking* (gris).

Los resultados de los cálculos mostraron que todos los compuestos poseen un modo de unión similar en el bolsillo de ATP de la proteína. Por lo tanto, estos datos concuerdan con los obtenidos experimentalmente, ya que son inhibidores del tipo ATP competitivos. Entre las interacciones principales ligando-proteína, se destacan la formación de tres puentes de hidrógeno. Dos de ellos se establecen entre el anillo de triazina y los residuos D133 y V135. El restante se forma entre el sustituyente carboetoxi del C-7 y la R141 (Figura 8.17, derivado **20b**). Estas interacciones permitieron que las pirazolotriazinonas **20** se orienten favorablemente en el sitio de unión y que se anclen al sitio activo.

Considerando el modo de unión de los compuestos **20**, se puede concluir que, tanto el anillo de triazina como el grupo carboetoxi, parecen críticos en la interacción con la enzima, favoreciendo su inhibición. Por otro lado, la longitud de los sustituyentes presentes en el anillo fenilo del N-6 no es suficiente para que interactúen con la región catalítica de la proteína, específicamente con los residuos D200 y K85.

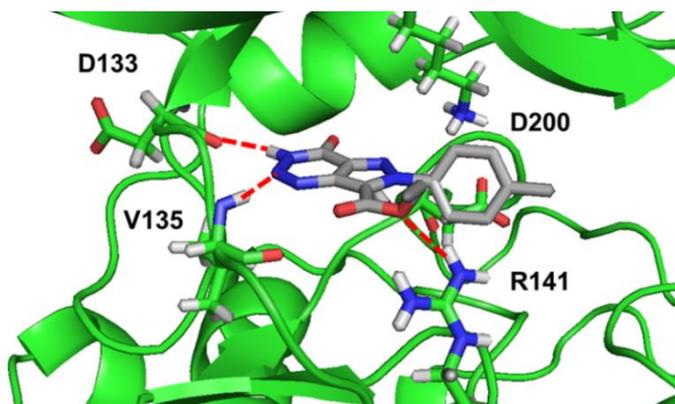


Figura 8.17. Modo de unión del compuesto **20b** en la enzima GSK-3, donde se observan las interacciones principales formando tres puentes de hidrógenos con los residuos cercanos D133, V135 y R141.

A continuación, se realizó un estudio de *docking* de los compuestos **9b-h** para intentar explicar por qué resultaron inactivos frente a GSK-3. Para ello, se utilizó el protocolo empleado anteriormente, analizando las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Como resultado, en la Figura 8.18 se muestra la mejor pose de *docking* obtenida para la pirazolotriazinona **9b**.

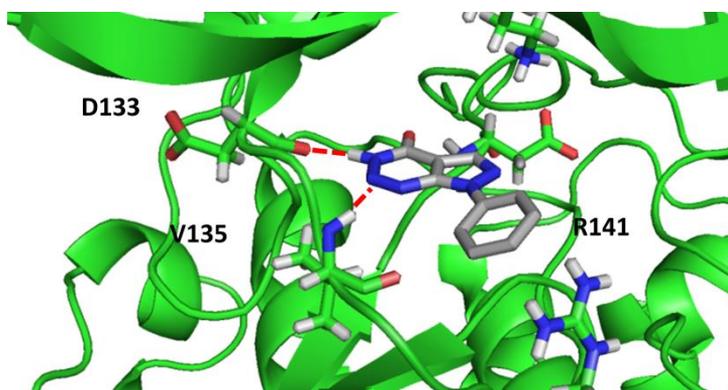


Figura 8.18. Modo de unión del compuesto **9b** en GSK-3, donde se observan los dos puentes de hidrógeno con los residuos D133 y V135, y la interacción negativa por impedimento estérico con R141.

Al comparar los compuestos **9b** (Figura 8.18) y **20b** (Figura 8.17), se pudo determinar la similitud de la posición que adopta el anillo de pirazolotriazina en ambos casos. Para **20b** se establece una interacción favorable entre el grupo carboetoxi del C-7 y el residuo R141, formando un puente de hidrógeno. En cambio, para **9b**, no solo que este enlace de puente de H está ausente, sino que además, la orientación del anillo fenilo hacia R141 genera impedimento estérico. Esta interacción negativa se ve incrementada en aquellos compuestos que poseen un sustituyente en posición *para* del anillo fenilo, tal como se muestra para **9e** en la Figura 8.19.

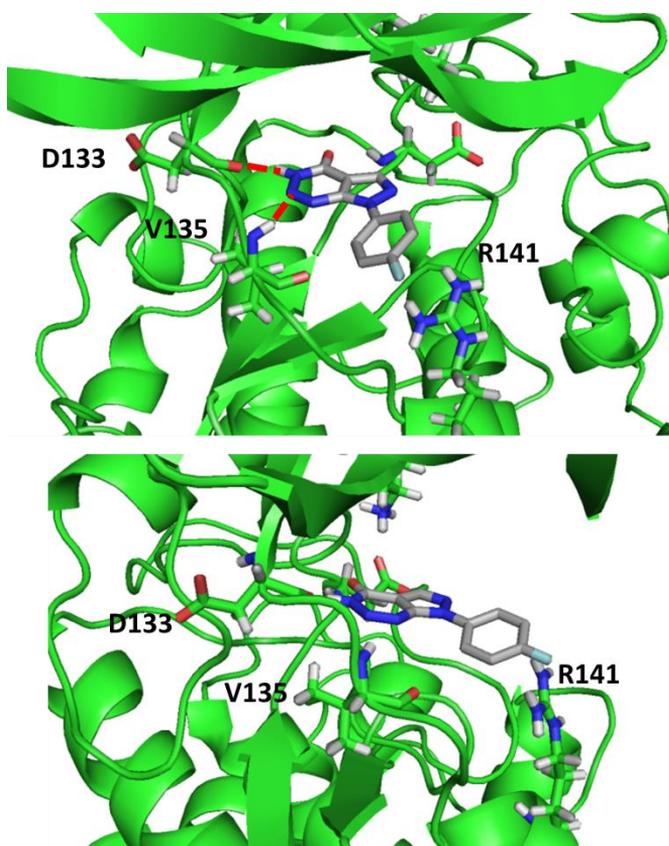


Figura 8.19. Modo de unión del compuesto **9e** en GSK-3, donde se observan los dos puentes de H con los residuos D133 y V135, y la interacción negativa por impedimento estérico entre el átomo de flúor del anillo fenilo y R141.

Asimismo, la conformación que adoptan los compuestos **9b-h** impide la posibilidad de ocupar todo el bolsillo catalítico, posicionándose lejos de los residuos catalíticos K85 y D200. Teniendo esto en cuenta, y considerando el impedimento estérico generado con el residuo R141, se podría explicar por qué la serie **9** resultó inactiva frente a GSK-3.

8.3.3.2. Estudios de *Hot Spot* sobre GSK-3

Con el fin de obtener análogos más activos sobre GSK-3 dentro de la serie de pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazina-7-carboxilatos **20**, se realizaron otros estudios computacionales. En primer lugar se propuso un estudio de *Hot Spot*,⁵⁸ en el que se realiza un análisis de la cavidad del sitio de unión de la proteína, en función de las posibles interacciones que se pueden establecer entre los residuos existentes y un ligando. A partir de este estudio se obtiene un mapa de diferentes colores, que describe las posibles interacciones que se podrían generar entre el inhibidor y los residuos de cada porción de la enzima.

El análisis de *Hot Spot* utiliza tres moléculas prueba como sondas moleculares para estudiar la cavidad de la enzima. Mediante la interacción entre el sitio de unión y dichas moléculas, se generan fragmentos de mapas de interacciones favorables de diferentes colores. Éstos proporcionan una guía visual intuitiva para realizar modificaciones en un determinado ligando, y así optimizar su potencia. De esta forma, una región de color roja obtenida en el análisis de *Hot Spot* indica que un grupo dador de puente de hidrógeno contenido en el inhibidor estaría favorecido en esa zona, mientras que el color azul indica que las interacciones serían favorables con un grupo aceptor de puente de hidrógeno. El color amarillo revela las regiones hidrofóbicas, por lo que grupos con estas características interaccionarían favorablemente en dichas regiones de la cavidad.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de *Hot Spot* para la enzima GSK-3 mostraron regiones de diferentes colores en el sitio activo de la proteína (Figura 8.20). En la Figura 8.20a se observa una gran zona amarilla, que indicaría una región hidrofóbica. En la Figura 8.20b se muestran las regiones polares en azul y rojo, por lo que compuestos con grupos polares en estas posiciones favorecerían la interacción ligando-receptor.

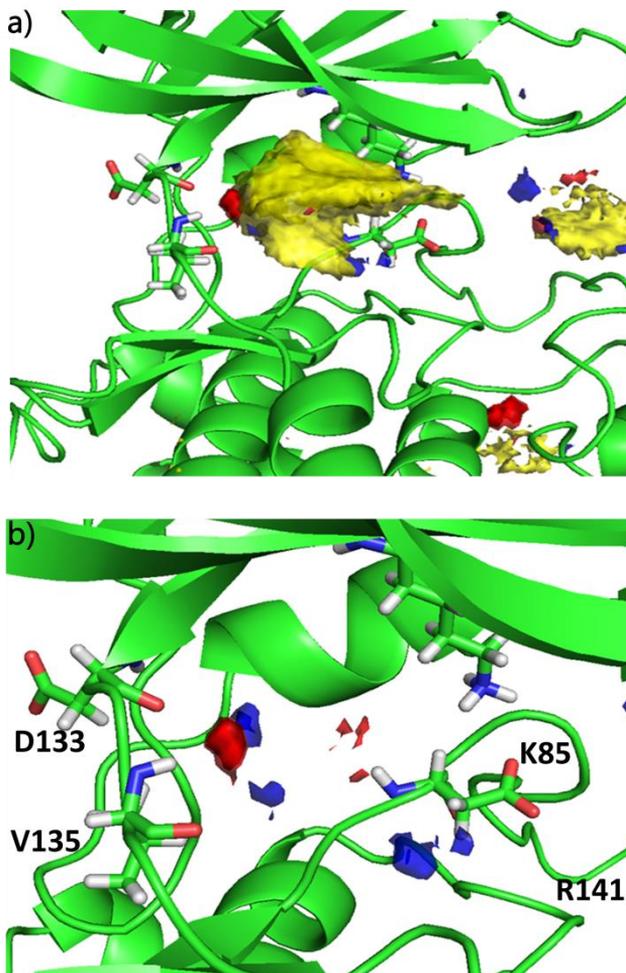


Figura 8.20. (a) Resultado del análisis de *Hot Spot* para el sitio de unión de la enzima GSK-3. (b) Regiones polares de la cavidad de la proteína que podrían actuar como dadores (azul) o aceptores (rojo) de puentes de H.

A continuación, se realizó la superposición de las regiones polares de la cavidad de la enzima (rojo y azul), obtenidas mediante el análisis de *Hot Spot*, con la mejor pose de *docking* del compuesto **20b**. En la Figura 8.21 se puede observar que las regiones predichas por el estudio de *Hot Spot*, coinciden con las interacciones de puentes de hidrógeno que se generan entre la enzima y **20b**.

Los resultados descriptos permiten concluir que, tanto el anillo de triazina como el grupo carboetoxi del C-7 de **20**, se encuentran en regiones de la cavidad del sitio activo que facilitan las interacciones cruciales, que conducirían a una buena actividad inhibitoria. La modificación del sustituyente del anillo fenilo del N-6 parece la vía más prometedora para aumentar la potencia de los compuestos de la serie **20**, ya que los grupos polares capaces de formar puente de hidrógeno podrían llegar a interactuar con residuos catalíticos D200 y K85.

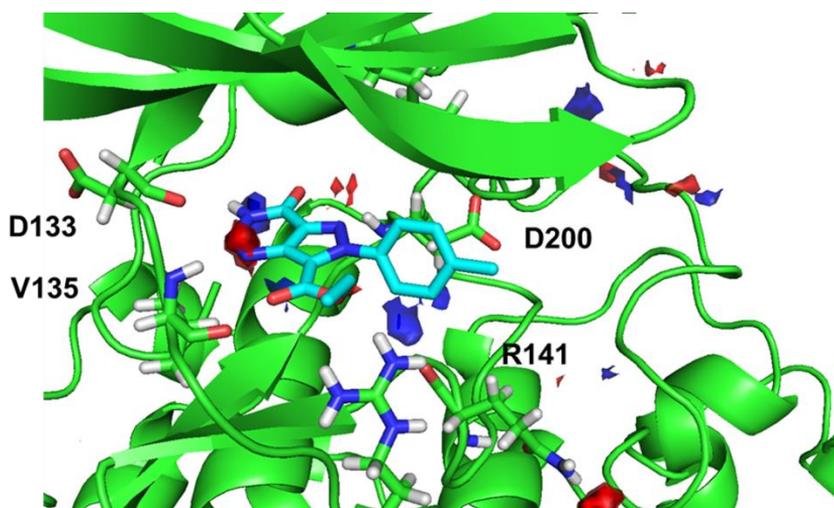


Figura 8.21. Superposición de las regiones polares predichas por el análisis de *Hot Spot* con los resultados de *docking* para el compuesto **20b** en GSK-3.

8.3.3.3. Diseño de nuevos compuestos como potenciales inhibidores de GSK-3

Considerando los resultados del estudio de *docking* y el análisis de *Hot Spot* para la cavidad de la enzima GSK-3, se diseñaron nuevos análogos de pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazina-7-carboxilato, potencialmente más activos. Los compuestos propuestos se muestran en la Figura 8.22.

A continuación, se realizó un estudio de *docking* de los derivados propuestos, siguiendo la metodología descrita anteriormente, para evaluar su modo de unión con la proteína. Para cada uno de ellos se obtuvieron dos *clusters* más poblados, con una buena energía de unión. Estos resultados están representados en la Figura 8.23 para el caso del compuesto **20l**, donde se observa el modo de unión para cada *cluster*. En ambos, se establecen tres enlaces puente de hidrógeno principales con los residuos D133, V135 y R141. La diferencia entre éstos radica en la orientación del anillo fenilo. En el primer *cluster*, el grupo amida del anillo fenilo del N-6 está formando un puente de hidrógeno con R141 (Figura 8.23a).

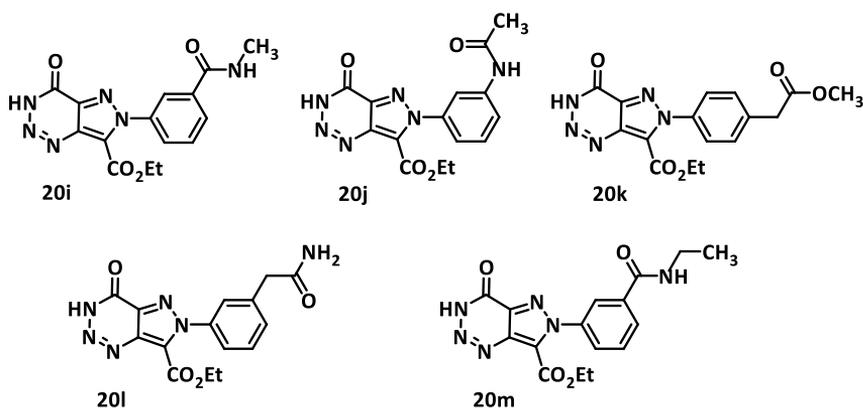


Figura 8.22. Compuestos diseñados como potenciales inhibidores de GSK-3.

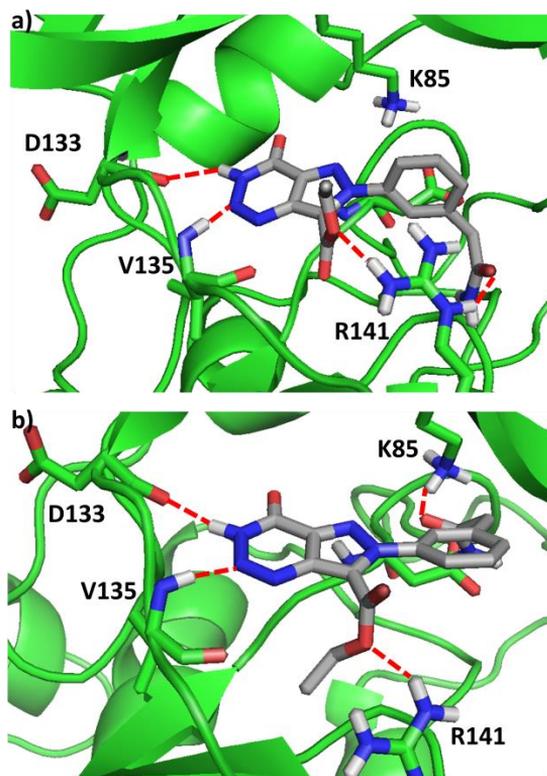


Figura 8.23. Posición de *docking* de los dos *clusters* más poblados y con buena energía de unión encontrada para el compuesto 20i.

En cambio, en el segundo *cluster*, la interacción de puente de hidrógeno entre la R141 y el grupo carboxilato de la cadena del C-7 se mantiene, mientras que el grupo amida del anillo fenilo del N-6 forma un nuevo puente de hidrógeno con el residuo catalítico K85 (Figura 8.23b). Esta nueva interacción podría contribuir a un aumento de la actividad inhibitoria de estos derivados.

Los compuestos **20i-m** se diseñaron teniendo en cuenta las vías sintéticas utilizadas previamente para la obtención de los derivados **20a-c, e-g**, y los reactivos disponibles comercialmente. Por lo tanto, su síntesis y posterior evaluación como inhibidores de GSK-3, sería factible en un futuro, y así verificar el posible aumento de la actividad inhibitoria predicho por los estudios de *docking*.

8.4. Metodología

8.4.1. Ensayos de actividad en AChE y BuChE

La enzima AChE proveniente de anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*, tipo V-S) y la BuChE extraída de suero equino (polvo liofilizado) fueron obtenidos de Sigma Aldrich, al igual que los reactivos restantes utilizados en los ensayos.

Las mediciones de actividad se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Ellman y col., levemente modificado.^{18,50,51} El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos. Para las medidas espectrofotométricas se utilizó un lector de microplacas BIO RAD iMark (para AChE) o un lector de placas FluoStar OPTIMA, BMG Labtech (para BuChE). Los compuestos evaluados fueron ensayados a una concentración de 10 μM , para lo cual se prepararon soluciones en etanol (grado para análisis), que luego fueron diluidas con el correspondiente buffer.

Inhibición de AChE

En primer lugar se preparó un buffer fosfato 50 mM de pH igual a 8,1. Se disolvió la enzima AChE en buffer fosfato para obtener una concentración final de 0,25 U/mL. Como sustrato se utilizó acetiltiocolina iodada (ATCI) 15 mM, y se empleó una solución de 3-carboxi-4-nitrofenildisulfito (DTNB) 3 mM, ambos preparados en buffer fosfato.

Para llevar a cabo la reacción enzimática, a cada uno de los 96 pocillos se agregó, en el siguiente orden: 50 μL de buffer fosfato, 25 μL del compuesto a ensayar, 125 μL de DTNB 3 mM y 25 μL de ATCI 15 mM. Para la preparación del control negativo se utilizaron las mismas proporciones de los reactivos anteriormente mencionados, empleando 25 μL de etanol en lugar del compuesto a ensayar. Se midió la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 450 nm a los 3 min

y 6 min luego de agregar ATCl. Posteriormente, se adicionaron 25 μ L de AChE y se monitoreó la reacción colorimétrica midiendo la absorbancia, a la misma λ , a los 3 min y 6 min de colocar la enzima. Todas las medidas se hicieron por duplicado.

Inhibición de BuChE

En primer lugar se preparó un buffer fosfato 0,1 M de pH igual a 8 en el cual se disolvió la enzima BuChE, para obtener una concentración final de 0,05 U/mL por pocillo.

Para llevar a cabo la reacción enzimática se utilizó un volumen final por pocillo de 300 μ L de buffer fosfato conteniendo 0,05 U/mL de BuChE, 0,35 mM de DTNB y el compuesto a ensayar. La mezcla fue pre-incubada durante 20 min, y luego se adicionó BTCl 0,5 mM. Al cabo de 5 min, se midió la absorbancia a $\lambda = 405$ nm. La actividad en ausencia de los compuestos también fue monitoreada para determinar el 100 % de actividad enzimática. Todas las medidas se hicieron por duplicado.

8.4.2. Ensayos de actividad en CK1-1 y GSK-3. Ensayos de cinética enzimática en GSK-3

Las enzimas CK-1 y GSK-3 recombinante humana y el polipéptido fosforilado GS-2 (*Phospho-Glycogen Synthase Peptide-2*) de 3030 Da fueron adquiridos de Millipore. El kit *Kinase-Glo*[®] para ensayos de luminiscencia fue obtenido de Promega. La solución de caseína de leche bovina al 5 %, ATP y los reactivos restantes utilizados para los ensayos fueron obtenidos de Sigma Aldrich.

Inhibición de GSK-3

Para las mediciones de inhibición de GSK-3 se empleó el protocolo descrito en bibliografía.⁵² El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos. En primer lugar, se preparó un buffer conteniendo HEPES 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y acetato de magnesio 15 mM. Para cada compuesto a ensayar se preparó una solución de 10 μ M (disuelto en DMSO a 1 mM y luego diluido con el buffer para obtener la concentración de 10 μ M).

Para llevar a cabo la determinación de inhibición de GSK-3, se utilizó una placa de 96 pocillos y se agregó en cada uno de ellos en el siguiente orden: 10 μ L del compuesto a ensayar a 10 μ M, 10 μ L de la enzima, 20 μ L del buffer conteniendo sustrato (GS-2) 25 μ M y ATP 1 μ M. En todos los casos, la concentración final de DMSO en la mezcla no superó el 1 % v/v. Luego de incubar la mezcla durante 30 min a 30 °C, se interrumpió la reacción enzimática con el agregado de 40 μ L del reactivo Kinase-Glo. Después de 10 min, se midió la luminiscencia utilizando el lector FLUOstar Optima *multimode reader* (BMG Labtechnologies GmbH). Para cada compuesto los ensayos fueron realizados por triplicado. La actividad enzimática resultante es proporcional a la diferencia entre el ATP total y el ATP consumido durante la reacción. Las actividades inhibitorias fueron calculadas en base a las actividades máximas medidas en ausencia del inhibidor.

Estudios cinéticos en la inhibición de GSK-3

Para estudiar el mecanismo de inhibición de los compuestos frente a GSK-3, se llevaron a cabo distintos experimentos cinéticos utilizando el kit ADP-Glo *kinase*.⁵³ Para ello se realizaron mediciones de la reacción enzimática siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, variando la concentración de ATP (de 1 a 50 μ M) a 0,5 μ M y 1 μ M de inhibidor, manteniendo constante la concentración

de GS-2 a 12,5 μM . Los resultados obtenidos fueron representados en una gráfica de Lineweaver-Burk para determinar el modo de inhibición.

Inhibición de CK-1

Para las mediciones de inhibición de CK-1 se utilizaron placas de 96 pocillos. En primer lugar, se preparó un buffer conteniendo HEPES 500 mM (pH 7,5), Brij-35 1 %, MgCl_2 1 M, EGTA 50 mM y NaN_3 1 % p/v. Para cada compuesto a ensayar se preparó una solución 10 μM (disuelto en DMSO a 1 mM y luego diluido con el buffer para obtener la concentración de 10 μM).

Para llevar a cabo la reacción enzimática se utilizó una placa de 96 pocillos y se agregó en cada uno de ellos en el siguiente orden: 10 μL del compuesto a ensayar a 10 μM , 10 μL de la enzima, 20 μL del buffer conteniendo sustrato (caseína) 25 μM y ATP 1 μM . En todos los casos, la concentración final de DMSO en la mezcla no superó el 1 % v/v. Luego de incubar la mezcla durante 1 h a 30 °C, se interrumpió la reacción enzimática con el agregado de 40 μL del reactivo Kinase-Glo. Después de 10 min se midió la luminiscencia utilizando el lector FLUOstar Optima *multimode reader* (BMG Labtechnologies GmbH). Para cada compuesto los ensayos fueron realizados por triplicado. La actividad enzimática resultante es proporcional a la diferencia entre el ATP total y el ATP consumido durante la reacción. Las actividades inhibitorias fueron calculadas en base a las actividades máximas medidas en ausencia del inhibidor.

8.4.3. Ensayo de permeabilidad en membrana artificial paralela

La capacidad de los compuestos para atravesar la BHE por difusión pasiva se evaluó mediante un ensayo de permeabilidad conocido como PAMPA, que utiliza una membrana artificial.⁴²

Los diez fármacos comerciales (cafeína, enoxacina, hidrocortisona, desipramina, ofloxacina, piroxicam, testosterona, promazina, verapamilo y atenolol), buffer fosfato salino a pH 7,4, etanol grado HPLC y dodecano fueron adquiridos a Sigma Aldrich, Acros Organics y Fluka, respectivamente. El lípido proveniente de cerebro porcino fue obtenido de Avanti Polar Lipids. Se emplearon placas de 96 pocillos de Millipore. La placa dadora contiene un filtro de PVDF con un tamaño de poro de 0,45 μM y 25 mm de diámetro (Multiscreen IP Sterile Plate PDVF membrane) mientras que la aceptora tiene forma de lágrima (Multiscreen). Para filtrar las muestras se utilizaron unidades de filtros con membrana PDVF, con un tamaño de poro de 0,45 μm y 30 mm de diámetro, adquiridos a Synta. Para las mediciones espectrofotométricas se empleó un espectrofotómetro UV con lector de placas de 96 pocillos (Thermoscientific, Multiskan spectrum).

Se prepararon soluciones de 1 mL en etanol de cada uno de los diez fármacos comerciales utilizados para la validación del método (3–5 mg de: cafeína, enoxacina, hidrocortisona, desipramina, ofloxacina, piroxicam, y testosterona, 12 mg de promazina, y 25 mg de verapamilo y atenolol). Luego, 100 μL de cada solución *stock* fue diluida con 1400 μL de etanol y 3500 μL de buffer de pH igual a 7,4, para alcanzar una concentración del 30 % v/v de etanol durante el experimento. Para cada compuesto a evaluar se pesaron 1-2 mg y se disolvieron en 1500 μL de etanol y 3500 μL del buffer. En todos los casos estas soluciones fueron filtradas antes del ensayo.

Para llevar a cabo el experimento, en la placa receptora se colocaron 180 μL por pocillo de una mezcla de buffer y etanol en relación 70:30. En la placa dadora se colocaron 4 μL de una solución del extracto lipídico de cerebro porcino, disuelto en dodecano (20 mg/mL). Luego de 5 min, se añadieron 180 μL de la solución de los compuestos a evaluar y se colocó cuidadosamente la placa dadora

sobre la placa receptora, formando un “sándwich”, que fue incubado a 25 °C por 2 horas sin perturbaciones. Durante este tiempo, los compuestos difundieron desde la placa dadora, a través del lípido, hacia la placa aceptora. Luego de la incubación, se retiró la placa dadora cuidadosamente y se determinó la concentración de cada compuesto y de los fármacos comerciales utilizados en la placa aceptora, mediante espectroscopía UV. Cada muestra fue analizada a tres longitudes de onda diferentes seleccionadas previamente, en tres pocillos distintos. Los resultados obtenidos se expresan como el valor medio \pm desviación estándar de tres ensayos independientes. En cada experimento se incluyeron los 10 compuestos estándar de control, de permeabilidad conocida para validar el análisis. ⁴²

8.4.4. Simulaciones de *docking* sobre GSK-3

Preparación de la proteína

Se utilizó la estructura cristalográfica de la proteína GSK-3 de código PDB 4NM5 ⁵⁵ obtenida de la base de datos de proteínas PDB (*Protein Data Bank*). La proteína fue preparada utilizando el programa *Protein Preparation Wizard of Schrodinger Suite*. ⁵⁹ La proteína fue controlada para asignarle los órdenes de enlace correctos, y se agregaron los átomos de H. Además, se optimizaron y asignaron los estados de protonación de todos los residuos a pH fisiológico (pH = 7,3). Las moléculas de agua fueron eliminadas y se realizó una minimización de la energía utilizando por defecto una restricción de 0,3 Å y campo de fuerza OPLS 2005. ⁵⁹

Docking

Las simulaciones de docking fueron realizadas con el programa AutoDock 4.2 ⁵⁶ utilizando Lamarkian GA como algoritmo de búsqueda. Para la preparación del ligando se emplearon cargas

Gasteiger y se determinaron los enlaces rotables mediante la interfaz gráfica AutoDock tools (ADT), permitiendo la rotación de todos los enlaces posibles. Los compuestos evaluados fueron tratados como moléculas flexibles, mientras que la proteína fue tratada como rígida. En el caso de la enzima, se agregaron átomos de hidrógenos polares y se asignaron las cargas de Gasteiger utilizando ADT, así como los átomos de tipo AD4. Las estructuras modificadas obtenidas fueron convertidas en archivos del tipo PDBQT en ADT para los cálculos de AutoDock.⁵⁶

Validación

Para la validación del protocolo de *docking* se utilizó la estructura cristalizada de la proteína GSK-3 de código PDB 1Q3W de la base de datos de proteínas (*Protein Data Bank*: PDB). En este archivo pdb la proteína está cristalizada con Alsterpaulona, uno de los inhibidores más potentes reportados para GSK-3.⁵⁷ Tanto esta molécula como la estructura pdb de la proteína, fueron preparados como se describió en el apartado anterior para el estudio de *docking*. La grilla generada se centró en la Val135, definido tanto en base a la posición del ligando cristalizado, como teniendo en cuenta la bibliografía, debido a que la Val135 es uno de los residuos críticos en la unión con la proteína. El tamaño de grilla fue de 50x50x50 puntos, con un espaciado de 0.375 Å por punto, lo que permite englobar al sitio de unión del ATP. El mapa de la grilla fue generado por el programa Autogrid.⁵⁶

Evaluación

Para el estudio de *docking* de los compuestos evaluados, también se centró la grilla en la Val135. En todos los casos se utilizó un tamaño de grilla de 50x50x50 puntos con un espaciado de 0.375 Å. El protocolo de *docking* consistió en la generación de 200 poses

independientes por ligando, con una población de 150, un máximo de 2500000 evaluaciones y de 27000 generaciones, teniendo en cuenta una proporción de mutación de 0,02 y un *crossover* de 0,8.

Los resultados de *docking* para un par dado de ligando-proteína proporcionaron información sobre la energía de interacción intermolecular, incluyendo la constante de inhibición, la energía de las interacciones de puente de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, energía electrostática y eficiencia del ligando. Finalmente, se analizaron los *clusters* (en los que se clasifican las poses con un valor predeterminado de RMSD inferior a 2.0 Å) más poblados y con energías de unión más favorable obtenidos por Autodock.⁵⁶

El análisis de los modelos de los complejos ligando-receptor fue basado en la energía de *score*, la población de las distintas conformaciones de los *clusters* y las interacciones presentes. Entre ellas, se consideraron las interacciones de puente de hidrógeno, las aromáticas y las hidrofóbicas, todas ellas predichas por el programa LPC.

8.4.5. Simulaciones de *Hot Spot* sobre GSK-3

Para el estudio de *Hot Spot* se utilizó un método que permite analizar la cavidad del sitio de unión de la proteína, en función de las posibles interacciones que se pueden dar entre los residuos existentes y el ligando.⁵⁸ Para ello, en primer lugar se preparó la proteína en un archivo de formato *pdb*, teniendo en cuenta los estados de protonación de los aminoácidos y eliminando las moléculas de agua, los ligandos y las cadenas laterales innecesarias, tal como se describió previamente para los estudios de *docking* (Sección 8.4.4).

A continuación, se utilizó un *script* predeterminado en lenguaje Phyton para analizar la estructura de la proteína en busca de

fragmentos de *Hot Spot*. Este protocolo fue desarrollado por el grupo del Prof. Blundell de la Universidad de Cambridge del Reino Unido.⁵⁸

Para generar los fragmentos de *Hot Spot*, primero se calcularon los *atomic Hot Spots* utilizando el programa *SuperStar*. Para ello, se generaron tres mapas diferentes con el fin de explorar las siguientes tipos de interacciones: C-H aromático-hidrofóbico, NH donador-sin carga y O carbonilo-aceptor. El programa emplea el algoritmo LIGSITE32 para detectar cavidades. En el caso de no encontrar un residuo a partir del cual comenzar a inspeccionar, se utiliza LIGSITE en toda la proteína. A cada punto de la grilla se le asigna un *score* entre cero (expuesto totalmente al solvente) y siete (en el seno de la cavidad).

Posteriormente, *SuperStar* selecciona aquellas cavidades que contienen puntos de la grilla con un *score* de cinco o más. Luego, para distinguir los bolsillos donde se pueda generar una mayor interacción, los mapas de *SuperStar* son ponderados utilizando el *score* de LIGSITE para cada punto de la grilla. Dichos mapas, muestran los *atomic Hot Spot* de mayor relevancia. A continuación, se utilizan moléculas pruebas que actúan como sondas para detectar los fragmentos de *Hot Spot* entre todos los *atomic Hot Spot* encontrados. Para ello, el programa busca interacciones favorables en estas superficies con una molécula de tolueno para las regiones apolares, una de anilina para las zonas dadoras y ciclohexa-2,5-dienona para las regiones aceptoras. Como resultado, se obtienen fragmentos, que son regiones dentro de las cavidades de la proteína cuya contribución al modo de unión del ligando sería mayor. Este estudio permitió identificar cómo se unen los distintos fragmentos dentro de los *Hot Spot*, determinando una interacción óptima ligando-proteína.

Los resultados de *Hot Spot* para la enzima GSK-3 consistieron en un mapa de superficie de diferentes colores en distintas regiones de la proteína, donde se analizaron las interacciones más importantes para la unión de un ligando.

8.5. Conclusiones

Con el fin de obtener compuestos como candidatos para el tratamiento del Alzheimer, se evaluaron todos los núcleos sintetizados y descritos en la Parte II de esta Tesis Doctoral. Para ello, se utilizaron distintas técnicas, como evaluación de inhibición *in vitro* de distintas enzimas asociadas a la EA y modelado molecular.

En primer lugar, se estudiaron los pirazoles **3a-h** y **7a-h** y las pirazolotriazinonas **9b-h** y **20a-c, e-g** como potenciales inhibidores de las enzimas AChE y BuChE *in vitro*. Ninguno de los compuestos evaluados presentó actividad inhibitoria frente a estas colinesterasas.

Posteriormente, se evaluó la actividad inhibitoria de los anillos de pirazoles y pirazolotriazinonas *in vitro* frente a las quinasas CK1 y GSK-3. En este estudio, solo los pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazina-7-carboxilatos **20** resultaron activos frente a la enzima GSK-3. Se determinaron las IC₅₀ para cada derivado, obteniéndose valores del rango micromolar y submicromolar (IC₅₀ = 0,8-4 μM). Además, a través de experimentos de cinética enzimática, se determinó que estos compuestos actúan como inhibidores ATP competitivos.

Asimismo, se evaluó el paso de los pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazina-7-carboxilatos por la barrera hematoencefálica por difusión pasiva, característica de suma importancia para poder considerarlos como futuros candidatos para el tratamiento de la EA. Para ello, se utilizó la metodología PAMPA, obteniéndose como resultado que los compuestos que presentaron una mayor inhibición de GSK-3 atravesarían la BHE por difusión pasiva. Estos compuestos podrían ser seleccionados para futuros estudios en modelos *in vivo* para el tratamiento de la EA.

Luego, se estudió el modo de unión ligando-proteína de los derivados activos mediante simulaciones con Autodock y se identificaron las principales interacciones con los residuos de la proteína. A partir de estos resultados, se observaron tres puentes de

hidrógeno que se establecen entre los pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazina-7-carboxilatos y los residuos D133, V135 y R141, de suma importancia para que el inhibidor se anclara al sitio activo de la enzima.

Se realizó un estudio de *Hot Spot*, en el que se analizó la cavidad del sitio de unión de la proteína, en función de las posibles interacciones entre los residuos existentes y el ligando. La superposición de los resultados de *Hot Spot* con los de *docking* permitió reconocer los fragmentos de la molécula de mayor importancia para la inhibición de GSK-3.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos mediante diversos métodos computacionales, se diseñaron nuevos derivados pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazina-7-carboxilatos, que podrían ser accesibles mediante las metodologías sintéticas desarrolladas previamente en este trabajo. En el estudio de *docking*, estos compuestos presentaron un modo de unión a la proteína similar al descrito anteriormente, añadiendo un potencial puente de hidrógeno entre el sustituyente del anillo fenilo del N-6 y la K85, con una mejor energía de unión.

Por último, los resultados obtenidos, tanto *in vitro* como *in silico*, permitieron describir un nuevo *scaffold* de inhibidores de GSK-3. Teniendo como base los derivados **20**, se podrían generar novedosas modificaciones y optimizaciones estructurales para el diseño de inhibidores más potentes.

8.6. Referencias bibliográficas

1. Palop, J. J., Chin, J., Mucke, L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 768–773 (2006).
2. Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.* **10**, 1055–1063 (2004).
3. Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., Barbeito, L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch. Med. Res.* **32**, 367–381 (2001).
4. Eftekharzadeh, B., Hyman, B. T., Wegmann, S. Structural studies on the mechanism of protein aggregation in age related neurodegenerative diseases. *Mech. Ageing Dev.* **156**, 1–13 (2016).
5. Kumar, V., Sami, N., Kashav, T., Islam, A., Ahmad, F., Hassan, M. I. Protein aggregation and neurodegenerative diseases: From theory to therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **124**, 1105–1120 (2016).
6. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/en/>.
7. Parihar, M. S., Hemnani, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *J. Clin. Neurosci.* **11**, 456–467 (2004).
8. Esteban, G., Bolea, I., Sun, P., Solé, M., Samadi, A., Marco-Contelles, J., Unzeta, M. A therapeutic approach to cerebrovascular diseases based on indole substituted hydrazides and hydrazines able to interact with human vascular adhesion protein-1, monoamine oxidases (A and B), AChE and BuChE. *J. Neural Transm.* **120**, 911–918 (2013).
9. Götz, J., Schild, A., Hoernkli, F., Pennanen, L. Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: Insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *Int. J. Dev. Neurosci.* **22**, 453–465 (2004).
10. Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., Bažadona, D., Buée, L., de Silva, R., Di Giovanni, G., Wischik, C., Hof, P. R. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* **6**, 6 (2016).
11. Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M. L., Yardin, C., Terro, F. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* **12**, 289–309 (2013).
12. Clippingdale, A. B., Wade, J. D., Barrow, C. J. The amyloid- β peptide and its role in Alzheimer's disease. *J. Pept. Sci.* **7**, 227–249 (2001).
13. Phiel, C. J., Wilson, C. a, Lee, V. M.-Y., Klein, P. S. GSK-3 alpha regulates

- production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* **423**, 435–439 (2003).
14. Flajolet, M., He, G., Heiman, M., Lin, A., Nairn, A. C., Greengard, P. Regulation of Alzheimer's disease amyloid-beta formation by casein kinase I. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 4159–64 (2007).
 15. Blanco, A. *Química Biológica*. Editorial El Ateneo, Buenos Aires (2006).
 16. Dighe, S. N., Deora, G. S., De La Mora, E., Nachon, F., Chan, S., Parat, M. O., Brazzolotto, X., Ross, B. P. Discovery and structure-activity relationships of a highly selective butyrylcholinesterase inhibitor by Structure-based virtual screening. *J. Med. Chem.* **59**, 7683–7689 (2016).
 17. Alzheimer's association. Available at: <http://www.alz.org>.
 18. Dorronsoro, I., Alonso, D., Castro, A., Del Monte, M., García-Palomero, E., Martínez, A. Synthesis and Biological Evaluation of Tacrine-Thiadiazolidinone Hybrids as Dual Acetylcholinesterase Inhibitors. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **338**, 18–23 (2005).
 19. Wang, Z., Cai, P., Liu, Q., Xu, D., Yang, X., Wu, J., Kong, L., Wang, X. Rational modification of donepezil as multifunctional acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **123**, 282–297 (2016).
 20. Barreiro, E. J., Camara, C. A., Verli, H., Brazil-Más, L., Castro, N. G., Cintra, W. M., Aracava, Y., Rodrigues, C. R. F., Fraga, C. A. M. Design, synthesis, and pharmacological profile of novel fused pyrazolo[4,3-*d*]pyridine and pyrazolo[3,4-*b*][1,8]naphthyridine isosteres: A new class of potent and selective acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* **46**, 1144–1152 (2003).
 21. Aslam, S., Zaib, S., Ahmad, M., Gardiner, J. M., Ahmad, A., Hameed, A., Furtmann, N., Gütschow, M., Bajorath, J., Iqbal, J. Novel structural hybrids of pyrazolobenzothiazines with benzimidazoles as cholinesterase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **78**, 106–117 (2014).
 22. Cohen, P., Alessi, D. R. Kinase Drug Discovery – What's Next in the Field? *ACS Chem. Biol.* **8**, 96–104 (2013).
 23. Hanks, S. K., Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576–596 (1995).
 24. Biology, C., Cheong, J. K., Virshup, D. M. Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 465–469 (2011).
 25. Cruciat, C. Casein kinase 1 and Wnt/b-catenin signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **31**, 46–55 (2014).
 26. Perez, D. I., Gil, C., Martinez, A. Protein Kinases CK1 and CK2 as New

- Targets for Neurodegenerative Diseases. *Med. Res. Rev.* **31**, 924–954 (2011).
27. Schwab, C., Demaggio, A. J., Ghoshal, N., Binder, L. I., Kuret, J., Mcgeer, P. L. Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* **21**, 503–510 (2000).
 28. Hanger, D. P., Byers, H. L., Leung, K., Saxton, M. J., Seereeram, A., Reynolds, C. H., Ward, M. A., Anderton, B. H., Hanger, D. P., Byers, H. L., Wray, S., Leung, K., Saxton, M. J., Seereeram, A., Reynolds, C. H., Ward, M. A., Anderton, B. H. Novel Phosphorylation Sites in Tau from Alzheimer Brain Support a Role for Casein Kinase 1 in Disease Pathogenesis. *J. Biol. Chem.* **282**, 23645–23654 (2007).
 29. Martinez, A., Castro, A., Medina, M. *Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) and its inhibitors. Drug Discovery and Development.* Wiley-Interscience, Nueva Jersey, (2006).
 30. Aoki, M., Yokota, T., Sugiura, I., Sasaki, C., Hasegawa, T., Okumura, C., Ishiguro, K., Kohno, T., Sugio, S., Matsuzaki, T. Structural insight into nucleotide recognition in tau-protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β . *Acta Crystallogr.* **D60**, 439–446 (2004).
 31. Bidon-chanal, A., Fuertes, A., Alonso, D., Pérez, D. I., Martínez, A., Luque, F. J., Medina, M. Evidence for a new binding mode to GSK-3: Allosteric regulation by the marine compound palinurin. *Eur. J. Med. Chem.* **60**, 479–489 (2013).
 32. Beurel, E., Grieco, S. F., Jope, R. J. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions and diseases. *Pharmacol Ther.* **0**, 114–131 (2015).
 33. Cutsuridis, V., Moustafa, A. A. Multiscale models of pharmacological, immunological and neurostimulation treatments in Alzheimer's disease. *Drug Discov. Today Dis. Model.* **19**, 85–91 (2017).
 34. Martinez, A., Gil, C., Perez, D. I. Glycogen synthase kinase 3 inhibitors in the next horizon for Alzheimer's disease treatment. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2011**, 1–7 (2011).
 35. Jope, R. S., Cheng, Y., Lowell, J. A., Worthen, R. J., Sitbon, Y. H., Beurel, E. Stressed and Inflamed, Can GSK-3 Be Blamed? *Trends Biochem. Sci.* **42**, 180–192 (2017).
 36. Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **104**, 1433–1439 (2008).
 37. Hernández, F., Gómez, E., Barreda, D., Fuster-matanzo, A., Lucas, J. J., Avila, J. GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp. Neurol.* **223**, 322–325 (2010).

38. Kurz, A., Perneckzy, R. Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **35**, 373–379 (2011).
39. Arnost, M., Pierce, A., Haar, E., Lauffer, D., Madden, J., Tanner, K., Green, J. 3-Aryl-4-(arylhydrazono)-1*H*-pyrazol-5-ones: Highly ligand efficient and potent inhibitors of GSK3 β . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 1661–1664 (2010).
40. Hamann, M., Alonso, D., Martín-Aparicio, E., Fuertes, A., Pérez-Puerto, M. J., Castro, A. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitory activity and structure-activity relationship (SAR) studies of the manzamine alkaloids. Potential for Alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.* **70**, 1397–1405 (2007).
41. Martínez, A., Alonso, M., Castro, A., Pérez, C., Moreno, F. J. First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **45**, 1292–1299 (2002).
42. Pérez, D. I., Pistolozzi, M., Palomo, V., Redondo, M., Fortugno, C., Gil, C. 5-Imino-1,2,4-thiadiazoles and quinazolines derivatives as glycogen synthase kinase β (GSK-3 β) and phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors: Determination of blood-brain barrier penetration and binding to human serum albumin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **45**, 677–684 (2012).
43. Dessalew, N., Patel, D. S., Bharatam, P. V. 3D-QSAR and molecular docking studies on pyrazolopyrimidine derivatives as glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* **25**, 885–895 (2007).
44. Patel, D. S., Bharatam, P. V. Selectivity criterion for pyrazolo[3,4-*b*]pyrid[az]ine derivatives as GSK-3 inhibitors: CoMFA and molecular docking studies. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 949–957 (2008).
45. Witherington, J., Bordas, V., Haigh, D., Hickey, D. M. B., Ife, R. J., Rawlings, A. D., Slingsby, B. P., Smith, D. G., Ward, R. W. 5-Aryl-pyrazolo[3,4-*b*]pyridazines: Potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 1581–1584 (2003).
46. Witherington, J., Bordas, V., Garland, S. L., Hickey, D. M. B., Ife, R. J., Liddle, J., Saunders, M., Smith, D. G., Ward, R. W. 5-Aryl-pyrazolo[3,4-*b*]pyridines: Potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 1577–1580 (2003).
47. Witherington, J., Bordas, V., Gaiba, A., Naylor, A., Rawlings, A. D., Slingsby, B. P., Smith, D. G., Takle, A. K., Ward, R. W. 6-Heteroaryl-pyrazolo[3,4-*b*]pyridines: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3059–3062 (2003).

48. Berg, S., Bergh, M., Hellberg, S., Hogdin, K., Lo-Alfredsson, Y., Soderman, P., von Berg, S., Weigelt, T., Ormo, M., Xue, Y., Tucker, J., Neelissen, J., Jerning, E., Nilsson, Y., Bhat, R. Discovery of novel potent and highly selective glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) inhibitors for Alzheimer's disease: design, synthesis, and characterization of pyrazines. *J. Med. Chem.* **55**, 9107–9119 (2012).
49. Prati, F., De Simone, A., Bisignano, P., Armirotti, A., Summa, M., Pizzirani, D., Scarpelli, R., Perez, D. I., Andrisano, V., Perez-Castillo, A., Monti, B., Massenzio, F., Polito, L., Racchi, M., Favia, A. D., Bottegoni, G., Martinez, A., Bolognesi, M. L., Cavalli, A. Multitarget drug discovery for Alzheimer's disease: Triazinones as BACE-1 and GSK-3 β inhibitors. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **54**, 1578–1582 (2015).
50. Pohanka, M., Hrabínova, M., Kuca, K., Simonato, J. P. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 2631–2640 (2011).
51. Carpinella, M. C., Andrión, D. G., Ruiz, G., Palacios, S. M. Screening for Acetylcholinesterase Inhibitory Activity in Plant Extracts from Argentina. *Phyther. Res.* **24**, 259–263 (2010).
52. Baki, A., Bielik, A., Molnár, L., Szendrei, G., Keserü, G. M. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *Assay Drug Dev. Technol.* **5**, 75–84 (2007).
53. ADP-Glo Kinase Assay Technical Manual; www.promega.com/tbs/.
54. Di, L., Kerns, E. H., Fan, K., McConnell, O. J., Carter, G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **38**, 223–232 (2003).
55. Stamos, J. L., Chu, M. L. H., Enos, M. D., Shah, N., Weis, W. I. Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6. *Elife* **2014**, 1–22 (2014).
56. Morris, G. M., Goodsell, D. S., Pique, M. E., Lindstrom, W., Huey, R., Forli, S., Hart, W. E., Scott, H., Rik, B., Olson, A. J. AutoDock Version 4.2. (2012).
57. Leost, M., Schultz, C., Link, A., Wu, Y. Z., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Bibb, J. A., Snyder, G. L., Greengard, P., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Kunick, C., Meijer, L. Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5983–5994 (2000).
58. Radoux, C. J., Olsson, T. S. G., Pitt, W. R., Groom, C. R., Blundell, T. L. Identifying Interactions that Determine Fragment Binding at Protein Hotspots. *J. Med. Chem.* **59**, 4314–4325 (2016).

- 224 Parte III: Estudio *in vitro* e *in silico* de potenciales inhibidores enzimáticos
59. Schrödinger Release 2016-1. Schrödinger Suite 2016-1 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger. (2016).



PARTE IV

**CONCLUSIONES
GENERALES Y PROYECCIONES**

Capítulo 9

**CONCLUSIONES
GENERALES Y PROYECCIONES**

9.1. Conclusiones generales

A partir de esta Tesis Doctoral, se lograron obtener derivados de azapurinas con actividad inhibitoria de enzimas de gran interés, para el tratamiento de patologías como la hiperuricemia y la enfermedad de Alzheimer. A través de estudios teóricos y experimentales de estos núcleos, se alcanzaron, de forma progresiva, las metas específicas planteadas en cada parte de este trabajo.

Considerando los resultados presentados previamente de manera integral, se puede concluir que se obtuvieron dos tipos de derivados de azapurinas bioactivas: las pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **9b-h** y los pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos de etilo **20a-c, e-g**. Dichas síntesis se realizaron mediante la diazotación directa de precursores amino-pirazol-carbonitrilos **3** y **7**, respectivamente. Cabe destacar que, la metodología empleada para la obtención de azolotriazinas **9** y **20**, solo había sido descripta para la formación de núcleos del tipo pirazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-onas **9**. Por lo tanto, en esta Tesis, se logró expandir la aplicación de la técnica de diazotación utilizando la serie de amino-pirazol-carbonitrilos **7**. Esto indicaría que la variación de las posiciones de los grupos ciano y amino en el anillo de pirazol no afecta a la formación de la triazinona, siempre y cuando estos dos grupos se encuentren en posiciones adyacentes entre sí.

Asimismo, se investigó la reacción de pérdida de nitrógeno, bajo condiciones de termólisis, de las azolotriazinas **9** con fines sintéticos. Esta técnica versátil y sencilla permitió preparar amidas derivadas de las pirazolotriazinas **9** conteniendo, además, un núcleo de pirazol. El estudio teórico detallado del mecanismo de reacción, permitió explicar la formación de las amidas heterocíclicas, y constituye una herramienta predictiva para nuevos derivados.

La Parte III de este trabajo de Tesis se enfocó en la evaluación biológica de los compuestos sintetizados en la Parte II, mediante el

estudio de los mismos como inhibidores de diversas enzimas, utilizando metodologías tanto *in vitro* como *in silico*.

Los pirazoles del tipo **3** resultaron ser inhibidores moderados de tirosinasa. Entre ellos, los derivados **3a** y **3b** presentaron valores de inhibición de tirosinasa próximos al ácido kójico, el inhibidor de referencia.

Entre los resultados más relevantes, se puede destacar la actividad inhibitoria que presentaron las pirazolotriazinas **9** y **20** frente a xantina oxidasa. Entre estos compuestos, **9f**, **9b** y **9d** ($IC_{50} = 0,907$; $0,969$; $0,97 \mu\text{M}$, respectivamente) resultaron potentes inhibidores, obteniéndose valores de IC_{50} próximos al inhibidor de referencia Alopurinol ($IC_{50} = 0,247 \mu\text{M}$). Mediante estudios de *docking*, se identificaron las principales interacciones entre los ligandos y los residuos de la proteína, y se establecieron las principales diferencias entre el modo de unión de la serie de compuestos **9** y **20**. Los resultados computacionales obtenidos sirven de plataforma para el diseño de nuevos inhibidores de XO, en la búsqueda de tratamientos alternativos para la hiperuricemia y la enfermedad de la gota.

Además, se estudiaron los compuestos sintetizados como inhibidores de enzimas asociadas a la enfermedad de Alzheimer. En este estudio, los pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos de etilo **20** resultaron activos frente a la enzima GSK-3, obteniéndose valores de IC_{50} del rango micromolar y submicromolar. Por medio de experimentos de cinética enzimática, se determinó que estos compuestos actúan como inhibidores ATP competitivos. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de estos núcleos para atravesar la BHE por difusión pasiva. Como resultado, se obtuvo que los compuestos **20f** y **20g**, que presentaron una mayor inhibición de GSK-3, atravesarían la BHE.

Teniendo en cuenta los resultados de la inhibición *in vitro*, se estudió el modo de unión ligando-proteína de los núcleos **20** (con

actividad inhibitoria) y **9** (sin actividad inhibitoria), aplicando simulaciones de *docking*. Se pudo comprobar que los compuestos de la serie **9** resultaron inactivos frente a la enzima GSK-3 debido, probablemente, a una interacción negativa que se produce entre el sustituyente del N-1 del anillo de pirazol y el residuo R141, producto del impedimento estérico. En cambio, para los compuestos **20**, se observaron tres puentes de hidrógeno principales que se establecen los residuos D133, V135 y R141, de suma importancia para que el inhibidor se ancle al sitio activo de la enzima. De forma complementaria, se realizó un estudio de *Hot Spot*, en el que se analizó la cavidad de la proteína. La superposición de los resultados de *Hot Spot* con los de *docking* permitió reconocer los fragmentos de la molécula de mayor importancia para la inhibición de GSK-3.

Conforme a los resultados obtenidos por los métodos computacionales, en la última etapa de este trabajo, se diseñaron nuevos derivados de pirazolo[4,3-*d*][1,2,3]triazin-7-carboxilatos. En estudio de *docking*, estos compuestos presentaron un modo de unión a la proteína similar al descrito anteriormente, añadiendo un potencial puente de hidrógeno entre el sustituyente del anillo fenilo del N-6 y la K85, con una mejor energía de unión. Las modificaciones estructurales propuestas en los núcleos de pirazolotriazinas permitirían la obtención de potenciales inhibidores más potentes. Cabe señalar que las investigaciones desarrolladas en esta temática son novedosas, ya que no se han registrado antecedentes de la actividad de núcleos del tipo **20** como inhibidores de GSK-3.

9.2. Proyecciones

Considerando el análisis de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, surgen proyecciones tanto desde el punto de vista sintético, en la preparación de nuevos anillos heterocíclicos, como desde el punto de vista biológico, con la posibilidad de obtener azapurinas con potencial actividad inhibitoria.

Por un lado, considerando que la metodología utilizada para la obtención de pirazolotriazin-4-onas a partir de amino-pirazol-carbonitrilos se logró extrapolar utilizando 4-amino-pirazol-3-carbonitrilos **7**, se podría proyectar la síntesis de nuevos derivados de pirazoles conteniendo los grupos amino y ciano adyacentes en posiciones diferentes a las ya estudiadas, para luego sintetizar otros núcleos de pirazolotriazinonas. Además, teniendo en cuenta la metodología sencilla empleada para la preparación de los compuestos **34**, se esperaría la formación de amidas heterocíclicas a partir de la termólisis de pirazolotriazinonas **9** y **20** con diferentes nucleófilos.

Por otro lado, surge como proyección el desafío de encontrar y sintetizar nuevos compuestos conteniendo el núcleo de azapurinas como potenciales inhibidores de las enzimas XO y GSK-3.

Considerando los resultados de *docking* obtenidos en XO para las pirazolotriazinonas **9** y **20**, se podrían determinar los fragmentos más relevantes para la inhibición de esta enzima, y así diseñar nuevos derivados potencialmente bioactivos. Además, los compuestos **9** y **20** se podrían evaluar en modelos *in vivo* para el futuro tratamiento de la hiperuricemia.

Asimismo, se plantearía la síntesis de los nuevos compuestos diseñados (**20i-m**), descritos en el Capítulo 8, como potenciales inhibidores de GSK-3, utilizando la metodología sintética desarrollada previamente. Mediante la evaluación *in vitro* de estos derivados como inhibidores de GSK-3, se podrían confirmar los estudios de *docking*,

que establecen un posible aumento de la actividad inhibitoria debido a una interacción puente de hidrógeno adicional.

Por último, aquellos compuestos **20** que fueron indicados como capaces de atravesar la BHE por difusión pasiva, podrían ser considerados como candidatos para futuros estudios en modelos *in vivo* para el tratamiento de la EA.



ANEXO

CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS