

RESEÑA

Obtención de nuevos derivados de naftaleno como potenciales fármacos para la enfermedad de Alzheimer

MSc. Marquiza Sablón Carrazana

Máster en Química Orgánica mención síntesis química

Departamento de Neurodiagnóstico, Centro de Neurociencias de Cuba, Playa, La Habana, Cuba

18 de noviembre de 2014

Tesis en opción al título de doctor en ciencias farmacéuticas

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo incurable que conduce, de manera irreversible, a la pérdida de las capacidades cognitivas y de la memoria, desorientación, trastornos del lenguaje y cambios de conducta. Se calcula que, a escala mundial, 36 000 000 de personas sufren de EA o alguna demencia relacionada, cifra que deberá alcanzar los 66 000 000 en 2030 y los 115 000 000 en 2050.

Cuba tiene indicadores de salud similares a los de países desarrollados, además de un rápido envejecimiento de su población total, con un 18,3 % de sus habitantes que supera los 60 años y una esperanza de vida al nacer de 77,97 años. De acuerdo con las investigaciones realizadas sobre la prevalencia de la enfermedad, 150 000 personas padecen EA u otro tipo de demencia, y esta cifra alcanzará en 2040 el 2,7 % de la población cubana adulta mayor.

La EA se caracteriza por la presencia de depósitos neuropatológicos en el cerebro, tales como las placas seniles, formadas por depósitos de proteína β -amiloide ($A\beta$) y los enrejados neurofibrilares (EN) como resultado de la hiperfosforilación de la proteína *tau*. Ambas bioestructuras están involucradas en el proceso que conduce a la degeneración neuronal progresiva y a la muerte neuronal y su aparición ocurre muchos años antes de que aparezcan los primeros síntomas de la enfermedad. Por esto, resulta de gran valor disponer de un medio de diagnóstico precoz e *in vivo* que permita visualizarlas y que además, facilite monitorear la efectividad terapéutica. Esta necesidad también se sustenta en que la implementación de una terapia temprana puede retardar el inicio de la manifestación de la EA en cinco años y disminuir su prevalencia en un 50 %. Aún no existe una terapia efectiva para ella a pesar de haberse realizado ingentes esfuerzos con ese objetivo. Entre los agentes prometedores para el tratamiento de la EA se encuentran los moduladores del plegamiento β -amiloide, cuyas funciones consisten en unirse a las cadenas nacientes de polipéptidos a fin de lograr el retardo transitorio en su plegamiento hasta que la síntesis del péptido se complete, establecer su conformación adecuada para su translocación a través de las membranas de las organelas, impedir la agregación intermolecular o intramolecular y transportar los metabolitos tóxicos para su degradación por el sistema proteosómico.

Todo ello indica que la inhibición de la formación de $A\beta$ fibrilos se considera una estrategia terapéutica razonable. Así, han surgido diferentes investigaciones encaminadas hacia la búsqueda de moléculas con estructuras similares a los fármacos antiinflamatorios no-esteroidales, ya que a raíz de estudios epidemiológicos, se sabe que reducen el riesgo relativo de padecer la EA. Ellos tienen en común la presencia de anillos aromáticos en sus estructuras químicas y, en particular, el naproxeno un radical naftilo.

En el Centro de Neurociencias de Cuba (CNEURO) se sintetizan nuevos derivados del naftaleno con el objetivo de ser empleados en el diagnóstico *in vivo* de la EA. Estos compuestos pueden ser marcados versátilmente con diferentes radionucleidos y ser utilizados entonces como sondas de visualización mediante diferentes técnicas de imágenes. Por otra parte, estudios *in silico* han demostrado que interactúan con los aminoácidos responsables de la agregación proteica por lo que podrían modular el proceso de plegamiento anómalo de proteínas. Además, estos derivados de naftaleno son hidrofóbicos, lo que les permite atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) indemne y así podrían adherirse a las bioestructuras patológicas características de la EA.

Por esta razón, el presente trabajo tuvo como propósito la síntesis de nuevos derivados de naftaleno que modulen la agregación proteica y que puedan ser posibles agentes farmacológicos para el tratamiento de la EA. Estos compuestos portan cadenas amidoalquílicas de diferentes longitudes y distintos grupos terminales y poseen propiedades

inhibidoras del proceso de fibrillogénesis proteico. Así, se sintetizaron diez derivados de naftaleno mediante procedimientos convencionales de síntesis a partir de la 1-naftilamina, que fueron caracterizados mediante las técnicas espectroscópicas de IR, RMN (^1H y ^{13}C) y espectrometría de Masas (EM). Se evaluó *in vitro* la actividad moduladora de los derivados naftalénicos en el proceso de fibrillogénesis proteica, mediante técnicas espectrofotométricas (espectroscopía de fluorescencia y UV-Vis) y microscópicas (microscopía electrónica de transmisión (MET) y de fuerza atómica (MFA). Además, se evaluó *in vitro* la acción de los compuestos sobre la viabilidad y la apoptosis celular en cultivos granulares del cerebelo. Con este trabajo se logró adaptar los métodos de síntesis de acilación y alquilación de aminas para obtener los compuestos deseados a partir de la 1-naftilamina, con buenos rendimientos, lo que puede servir para obtener otros derivados con cadenas amidoalquílicas diferentes. Se dispone de los datos experimentales de la caracterización espectroscópica de estos derivados, que facilitará la caracterización de nuevos derivados naftalénicos 1-monosustituídos. Se demostró que seis de los nuevos derivados sintetizados modulan el proceso de fibrillogénesis proteica y que dos de ellos tienen actividad citoprotectora, lo que sustenta su evaluación posterior como potencial agente terapéutico de enfermedades asociadas al mal plegamiento proteico, como la EA.

Los resultados iniciales se relacionaron con el desarrollo de la síntesis química de derivados de naftaleno a partir de la 1-naftilamina, a través de un esquema de reacción diseñado para este fin. En la primera etapa, se sintetizaron el ácido 4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoico (1) y la 1-(1-naftil)-2,5-pirrolidindiona (2), que se utilizaron como precursores de los nuevos derivados naftalénicos obtenidos. En este sentido, se desarrolló un nuevo procedimiento de obtención de 2, en un solo paso de reacción, que resultó menos engorroso que el método descrito, a partir de la acilación de la 1-naftilamina con anhídrido succínico, en presencia de una amina terciaria. El producto deseado se obtuvo con un rendimiento de un 72 % y una pureza adecuada para posteriores reacciones.

La caracterización estructural de los compuestos 1 y 2, que no se describe en su totalidad en la literatura, fue llevada a cabo con las técnicas IR, RMN- ^1H y ^{13}C , y EM. Las asignaciones inequívocas de las señales protónicas y de carbono se realizaron con el auxilio de los espectros obtenidos con las técnicas TOCSY, HSQC y HMBC. Posteriormente, se obtuvo el derivado éster *N*-hidroxisuccinimido de 1 (3), que no ha sido reportado en la literatura. Tanto 2 como 3, se utilizaron como intermedios para elongar la cadena amidoalquílica mediante reacciones de acilación con diaminas (etilendiamina y butilendiamina) o con carboxilaminas (β -alanina y ácido 1-aminohexanoico) para dar lugar a seis nuevos compuestos. De forma adicional, se obtuvieron dos nuevos compuestos, la *N*-[2-(metilamino)etil]-*N'*-1-naftilsuccinamida (8) y el metil(2-[[4-(1-naftilamino)-4-oxobutanoil]amino]etil)ditiocarbamato (9), no descritos en la literatura, mediante un procedimiento de *N*-monoalquilación de una amina primaria, en presencia de una base inorgánica de cesio. Así, se obtuvo 8 a partir de la alquilación de 4 con yoduro de metilo, en presencia de hidróxido de cesio y dimetilformamida (DMF) como disolvente, con un rendimiento de un 61-70 %.

El compuesto 9, se obtuvo a partir de la reacción de 4 con disulfuro de carbono y sulfato de dimetilo, en presencia de carbonato de cesio y una sal cuaternaria de amonio, en DMF, a temperatura ambiente, con un rendimiento de un 31 %.

Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados estructuralmente, lo que constituye un aporte a la data espectroscópica de los derivados naftalénicos y que puede servir en un futuro al resto de los investigadores en esta rama de la ciencia.

Del total de compuestos sintetizados, seis fueron evaluados biológicamente *in vitro* como moduladores en el proceso de fibrillogénesis proteico mediante técnicas de análisis instrumentales y microscópicos. Se utilizaron las proteínas albúminas de suero bovino (BSA) y de suero humano (HSA) como proteínas modelo, y se pudo comprobar que los compuestos sintetizados modulan el proceso de agregación proteico.

La cinética de formación de fibras fue monitoreada por la variación de la intensidad de fluorescencia de la ThT. Se utilizó como referencia al naproxeno y se evidenció que en presencia de los compuestos evaluados, disminuye la concentración de fibrilos de la BSA, entre un 40 % y un 70 %. Este efecto inhibitor se corroboró con las técnicas microscópicas MET y MFA, con las que se observó que a 70 °C en la BSA se forman haces fibrilares largos y contorneados y que en presencia de los compuestos evaluados predominan las estructuras glomerulares, no fibrilares. Otra técnica que permitió estudiar la variación de la estructura secundaria de la BSA en presencia de los compuestos sintetizados fue el dicroísmo circular (DC). Mediante ella se observó que en la fibrillogénesis de la BSA, en presencia de cualesquiera de los compuestos evaluados, la contribución de la estructura de lámina- β disminuye en el tiempo, con respecto al control (BSA). Esto sugirió que los compuestos modulan el cambio conformacional de esta proteína, inhibiendo la formación de estructuras de lámina- β .

También resultó novedoso estudiar el efecto modulador de los compuestos sintetizados, en el proceso de fibrillogénesis del fragmento 20-29 a.a. de la amilina (IAPP-20-29) involucrado en el proceso de la diabetes mellitus tipo II. Los compuestos evaluados modulaban el proceso de fibrillogénesis de este péptido para una relación molar péptido: compuesto de 1 : 1. De acuerdo con las cinéticas registradas, dos de los compuestos evaluados inhibieron este proceso de igual manera que el naproxeno, compuesto empleado como referencia. Una vez comprobado el efecto modulador de los compuestos evaluados en la formación de las fibras de BSA, de HSA y de IAPP (20-29), se seleccionaron dos de ellos (6 y 9) para realizar los primeros ensayos *in vitro* que permitieron estimar la viabilidad y la

apoptosis celular de cultivos celulares de células granulares del cerebelo (CGC), expuestos al efecto tóxico del IAPP 20-29 a.a., en su forma monomérica o agregada, o expuestos a un ambiente con una baja concentración de potasio.

En los ensayos se utilizó la curcumina como compuesto de referencia, por su actividad citoprotectora reportada.

De los resultados obtenidos, se evidenció que la viabilidad celular resulta dos veces mayor cuando las células se exponen al monómero, en presencia de los dos compuestos evaluados, que con respecto al control curcumina. En cambio, cuando los cultivos de CGC se exponen a la forma agregada de IAPP (20-29), en presencia de 9, la viabilidad celular disminuye con respecto a los controles. En presencia de 6, aunque no existe un incremento del efecto citotóxico a las concentraciones estudiadas tampoco se observa un efecto protector.

De los resultados obtenidos en el ensayo de apoptosis celular, que miden el nivel de caspasa-3 mediante un ensayo de inmunofluorescencia, se evidenció que cuando las células se exponen a la proteína IAPP 20-29 monomérica en presencia de 6 y 9, los niveles menores de caspasa-3 se alcanzan para una relación molar proteína: compuesto de 1 : 1, con una sobrevida mayor de seis a siete veces de células CGC.

Cuando los cultivos de CGC se exponen a la forma agregada del IAPP 20-29, también se observó que la sobrevida celular tiende a aumentar con la concentración de los compuestos evaluados y se alcanzan niveles de caspasa-3 similares al de la curcumina, para una relación molar proteína: compuesto de 1 : 1. En resumen, se demostró que los compuestos 6 y 9 inhiben el proceso apoptótico generado por la proteína IAPP 20-29, monomérica o agregada, en cultivos de CGC, posiblemente a través de un mecanismo mediado por la inhibición de la formación de fibrilos. De manera que, se puede plantear que los compuestos evaluados intervienen en el proceso de agregación, inhibiendo la formación de oligómeros tóxicos y, por ende, aumentando la sobrevida celular. Como otro resultado novedoso se logró establecer que estos compuestos aumentan la sobrevida de los cultivos de CGC, expuestos a una disminución de la concentración de cloruro de potasio, como estímulo pro-apoptótico. Además, los compuestos evaluados fueron capaces de revertir la apoptosis inducida en cultivos de CGC por un ambiente bajo en potasio.

La tesis doctoral está estructurada en cinco capítulos además de la Introducción, que describen los aspectos siguientes: en la Revisión Bibliográfica se presentan los antecedentes de la EA, sus características, tratamiento y diagnóstico, además de los procedimientos de síntesis química relacionados con la obtención de distintos compuestos de interés para el tratamiento de esta enfermedad; en Materiales y Métodos se incluye la descripción detallada de los materiales, los métodos generales para la síntesis, caracterización y evaluación de los derivados de naftaleno obtenidos, así como las herramientas estadísticas usadas; en Resultados y Discusión, se presenta el análisis previo del estudio *in silico* que permitió estimar la actividad de los compuestos, se abordan distintos procedimientos de síntesis para obtener nuevos derivados de naftaleno con distintos sustituyentes, se discute la caracterización estructural realizada a estos compuestos mediante las técnicas espectroscópicas de IR, RMN y Masas, así como los resultados de la evaluación de los compuestos como moduladores del proceso de fibrillogénesis proteico monitoreado por técnicas espectroscópicas y microscópicas; las Conclusiones y Recomendaciones se corresponden con los objetivos planteados y dan continuidad al tema de investigación. Todos estos aspectos se desarrollan en 132 páginas, en las que se incluyen 206 referencias bibliográficas, 16 tablas, 38 figuras y 46 anexos, que muestran los distintos espectros de la caracterización espectroscópica y los detalles del estudio *in silico* previo. El 67 % de las citas están comprendidas en el período de 2000 hasta la fecha y el 21 % corresponde al decenio 1999 - 1990.

En la tesis se presentan siete publicaciones, de las cuales cuatro son patentes, una solicitada y tres concedidas. De estas últimas, dos fueron aprobadas por la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial (OCPI) y la otra por la Oficina de Patentes Europea. Las tres publicaciones restantes se distribuyen en dos revistas nacionales y una internacional que se relaciona con el proceso de fibrillogénesis monitoreado por microscopía.

Los resultados de este trabajo han sido presentados en siete eventos internacionales, entre los que se destacan el congreso interamericano de microscopía electrónica y los congresos iberoamericanos de química y de la enfermedad de Alzheimer.

Por otra parte, también ha contribuido a la formación de nuevos profesionales, lo cual se refleja en la defensa exitosa de cuatro tesis universitarias, que incluyeron resultados parciales de este trabajo.

Todos estos resultados implican un aporte novedoso al conocimiento científico relacionado con la obtención por síntesis química y la caracterización estructural de nuevos compuestos derivados del naftaleno, que pueden representar el punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la EA. Además, la evaluación *in vitro* realizada a estos compuestos, a través de técnicas espectroscópicas y microscópicas, permitirán abordar las investigaciones futuras donde se estudie la proteína A β , específica de la EA. Esto será extensivo a los estudios *in vitro* en líneas celulares neuronales. Estos compuestos podrían ser empleados como radiofármacos versátiles para el diagnóstico temprano de la EA, debido a las posibilidades que presentan sus estructuras para unirse a distintos radionucleídos. Los procedimientos de síntesis involucrados son novedosos y se encuentran patentados, lo que pudiera constituir una fuente de ingresos económicos para el país, pues hasta el momento no existe una terapia efectiva para esta enfermedad.