



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS DE DERIVADOS DE LA 6-FENIL-5-METILPIRIDAZINA
COMO FÁRMACOS POTENCIALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

JOSE EDUARDO SÁNCHEZ LARIOS



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS DE DERIVADOS DE LA 6-FENIL-5-METILPIRIDAZINA
COMO FÁRMACOS POTENCIALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
JOSE EDUARDO SÁNCHEZ LARIOS**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Sánchez Larios José
Eduardo

FECHA: 05- Noviembre -2004

FIRMA: 

MÉXICO, D.F.

2004

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	PROF. OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ.
VOCAL	PROF. ELIA BROSIA NARANJO RODRÍGUEZ.
SECRETARIO	PROF. MARTHA YOLANDA GONZÁLEZ QUEZADA.
1ER SUPLENTE	PROF. LINO JOEL REYES TREJO.
2DO SUPLENTE	PROF. MARIA EVA GONZÁLEZ TRUJANO.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA DE TESIS:
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ORGÁNICA, L 204, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DE TESIS

M. en C. MARTHA YOLANDA GONZÁLEZ QUEZADA

M. Yolanda González Q.

SUPERVISOR TÉCNICO

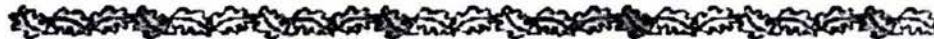
DRA. YOLANDA CABALLERO ARROYO

Y. Caballero

SUSTENTANTE

JOSE EDUARDO SÁNCHEZ LARIOS

J. Sánchez Larios



AGRADECIMIENTOS

A la maestra Yolanda González, por todo su apoyo, amistad y cariño que me brindó en todo momento y sobre todo por apoyarme para la realización de este trabajo.

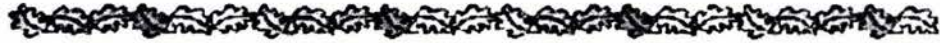
Al Dr. Carlos Rius Alonso, por compartir sus enseñanzas y sus muy valiosos consejos para la elaboración de este trabajo, por que sin usted Dr. Carlos este trabajo no hubiera sido posible culminarlo. ¡MIL GRACIAS!

A todos los integrantes del laboratorio 204, Ivonne, Gabriel y David por los buenos y muy divertidos momentos que pasamos juntos.

A la Q. Marisela Franco por el gran apoyo para la realización de los espectros de IR, a las Químicas Rosa Isela del Villar y Alejandrina Acosta por su valiosa ayuda en la elaboración de los espectros de RMN y a la Q. Georgina Duarte Lisci por su grandiosa contribución en la realización de los espectros de masas.

A la Facultad de Química y mis profesores de la carrera de los cuales aprendí y recibí grandes enseñanzas.

A la Dra. Yolanda Caballero y a todos los que creyeron en mi y que hicieron posible la elaboración de este trabajo.



DEDICATORIA

En memoria a una grandiosa mujer y ejemplo de esfuerzo, mi tía Yolanda.

Con todo el cariño para la personita más grande en mi vida, que noche tras noche me acompañó en este largo y arduo camino dándome su comprensión y atención;
mi mamá.

A mis hermanos Erika y Juan Carlos, que siempre me dieron su confianza y creyeron en mí.

A Juan Sada, que junto con Erika siempre recibí su apoyo incondicional.

Con todo mi cariño y mi amor para Faby, por que desde el principio has sido más que un ejemplo para mi y este logro también te lo debo a ti por tu gran apoyo, ¡gracias corazón!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Historia	5
2.2. Causas de la enfermedad	6
2.2.1. Sospecha de origen biológico	14
2.2.2. Factores ambientales de riesgo	15
2.3. Bases genéticas de la enfermedad de Alzheimer	16
2.4. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	21
2.5. Inhibidores de la colinesterasa	22
2.5.1. Inhibidores pseudo-irreversibles	27
2.5.2. Inhibidores irreversibles	30
2.5.3. Inhibidores tipo-análogos de estado de transición	30
2.5.4. Inhibidores reversibles	31
2.6. Series de derivados de piridazinas como IChE	34
2.6.1. Síntesis de derivados de piridazinas como potenciales IChE	39
3. OBJETIVOS	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1. Síntesis de la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina	46
4.2. Síntesis de la 6-fenil-3-(3'-furanmetoxi)-5-metilpiridazina	48
4.3. Síntesis de la 6-fenil-3-(1'-(2''-hidroxietil)pirrolidin)-5-metilpiridazina	50
4.4. Síntesis de la 6-fenil-3-hidrazino-5-metilpiridazina	53
4.5. Síntesis de la 3-amino-N-(tiazol-2-il)-6-fenil-5-metilpiridazina	55
5. PARTE EXPERIMENTAL	60
5.1. Preparación de piridazinona	60
5.2. Preparación de 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina	61
PREPARACIÓN DE DERIVADOS:	
5.3. 6-fenil-3-(3'-furanmetoxi)-5-metilpiridazina	62
5.4. 6-fenil-3-(1'-(2''-hidroxietil)pirrolidin)-5-metilpiridazina	63
5.5. 6-fenil-3-hidrazino-5-metilpiridazina	64
5.6. 3-amino-N-(tiazol-2-il)-6-fenil-5-metilpiridazina	65
6. CONCLUSIONES	68
7. BIBLIOGRAFÍA	70
8. ESPECTROS	73

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer, es un trastorno neurodegenerativo que afecta principalmente a los habitantes de naciones industrializadas y se caracteriza por tres signos patológicos a nivel cerebral de gran importancia: formación de placas β -amiloides, formación de ovillos de neurofibrillas y pérdida de la sinápsis. La deficiencia de la neurotransmisión colinérgica es considerada como una de las causas principales de la pérdida de la memoria en pacientes con esta enfermedad. Un tratamiento paliativo para la enfermedad de Alzheimer es el uso de agentes que restauran los niveles de acetilcolina.

Algunos inhibidores de la actilcolinesterasa como tacrina, donepezilo, galantamina y rivastigmina (figura 1) son capaces de regenerar la memoria de los pacientes con Alzheimer. Así en estudios recientes⁴² se ha mostrado que los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), los cuales actúan en el sitio periférico y el sitio activo de la enzima, pueden además de inhibir a la AChE, actuar como potenciales inhibidores de la formación de la proteína β A4-amiloide (BAP), causante de la formación de las placas β -amiloides.

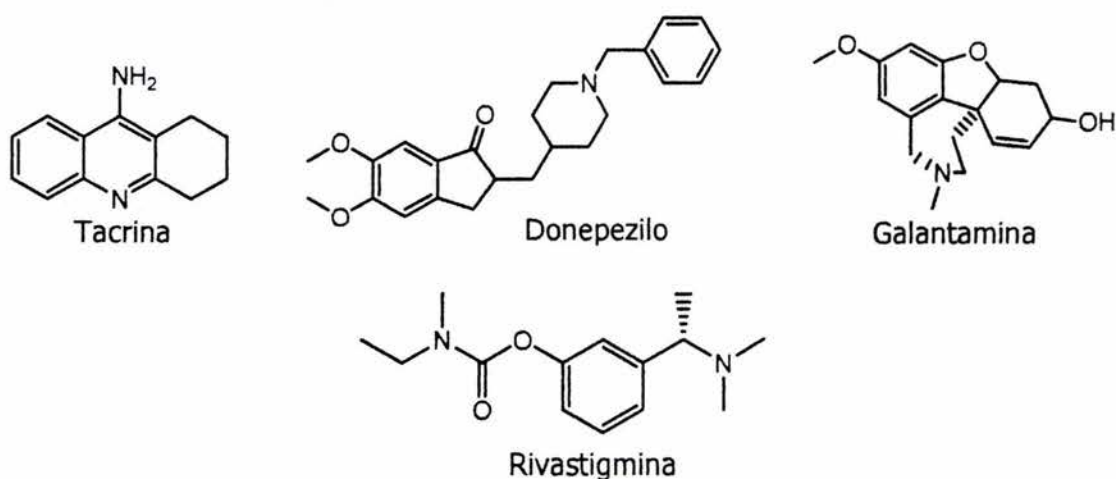


Figura 1

En años recientes ha aumentado el interés por desarrollar un medicamento el cuál pueda atacar la enfermedad de Alzheimer, se han realizado diversas investigaciones considerando los diferentes aspectos por los cuales se puede iniciar la enfermedad, estos son:

- a) Inhibición de la agregación de la proteína β -amiloide.
- b) Fosfatasas que pudieran inhibir la formación de PHF-tau.
- c) Antioxidantes que prevengan el efecto de cascada de los radicales libres por la proteína β -amiloide.
- d) Reducción de la absorción o concentración de aluminio en tejido cerebral.
- e) Reducción de la inflamación del tejido cerebral de pacientes con Alzheimer por medio de fármacos antiinflamatorios, esteroidales o no esteroidales.
- f) Incremento de la concentración de acetilcolina en el cerebro.
- g) Estimulación de los receptores neuronales involucrados en los mecanismos de memoria.

Este trabajo se ha enfocado a la síntesis de fármacos potenciales para la inhibición de la acetilcolinesterasa, los cuales incrementarían los niveles de acetilcolina en el cerebro.

Se propuso como objetivo el realizar el diseño y la síntesis de cuatro derivados de la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina, así como evaluar su potencial actividad inhibitoria mediante modelaje molecular.

Se utilizó como intermediario común para la síntesis de los derivados la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina descrito previamente por Contreras,⁵⁰ debido a que se ha comprobado que la parte de la fenilpiridazina es la región farmacofórica de la molécula.

Asimismo, se ha descrito en la literatura⁵² la síntesis de derivados de la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina los cuales muestran actividad inhibitoria contra la AChE, por lo cual

se decidió modificar mediante una reacción de sustitución nucleofílica el sustituyente de la posición 3 de la piridazina, el producto también podría funcionar como inhibidor de la acetilcolinesterasa.

Los resultados obtenidos en la síntesis son los siguientes: de los cuatro derivados propuestos se obtuvieron tres mediante la estrategia planeada; el cuarto producto, la 3-amino-5, N, N-timetilpiridazina tiene una estructura distinta a la esperada, sin embargo resulta de gran interés para su análisis computacional.

En los resultados del modelaje molecular, se observa que todas las moléculas obtenidas mediante la síntesis presentan interacciones dentro del sitio periférico de la colinesterasa, por lo que éstas moléculas podrían actuar como inhibidores de la enzima, las interacciones inhibidor-enzima varían en cada caso; tres de los derivados con los sustituyentes 3'-furanmetoxi, 3-(1'-(2''-hidroxietil)-pirrolidina y 3-amino-N-(tiazol-2-il) pueden presentar mayor estabilidad en el sitio periférico debido a la probable formación de puentes de hidrógeno entre los residuos de tirosina y los átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre de los distintos sustituyentes, además de observarse interacciones de tipo π - π con las partes aromáticas de los residuos de fenilalanina y las regiones aromáticas de los sustituyentes.

2. ANTECEDENTES

2.1 HISTORIA

Entre 1906 y 1907 el Doctor Alois Alzheimer realizó la descripción anatomoclínica de una paciente de 65 años llamada Auguste D. que falleció tras poco más de cuatro años de presentar cuadro de demencia senil (pérdida de la memoria, desorientación, comportamiento impredecible, paranoia y alucinaciones), lo cual parecía extraño que ocurriera en una edad tan temprana.¹ La autopsia reveló un cerebro atrofiado e histológicamente se observó desorganización de las células nerviosas de la corteza cerebral, además de estructuras anormales, llamadas ovillos de neurofibrillas y placas neuríticas denominadas "degeneración neurofibrilar". Para 1910 esta condición fue nuevamente descrita por Emile Kraepelin en su manual de psiquiatría, donde reconoce el aporte de un antiguo alumno suyo, Alzheimer, dando el nombre de "Enfermedad de Alzheimer" a este padecimiento neurodegenerativo, ésta enfermedad se define como un síndrome clínico determinado por la pérdida progresiva e irreversible de las funciones cognoscitivas del individuo, con modificaciones neurohistológicas caracterizadas por degeneración neurofibrilar y granulovascular de tejido cerebral además de la presencia de placas seniles, necesariamente acompañadas de circulación normal.

La enfermedad de Alzheimer, se considera como un proceso degenerativo incapacitante y progresivo del sistema nervioso central y es la causa más común de demencia en ancianos. La expectativa de vida de estos sujetos se reduce a 50% y la calidad de ésta se deteriora enormemente no sólo para el paciente sino también para su familia, además de que el costo económico para la sociedad es muy elevado. La pérdida de la memoria es un signo importante, pero no es el único dato que orienta el diagnóstico

pues también ocurre la disminución gradual y progresiva de las funciones intelectuales, así como el deterioro de la orientación, el juicio, el lenguaje, la percepción y la capacidad para solucionar problemas. Es evidente que los síntomas antes descritos son compartidos por varias enfermedades degenerativas del sistema nervioso central, por lo que es importante describir algunos elementos característicos de la demencia presenil. La demencia presenil es una afección temprana (aparece antes de los 65 años) en la que se presentan modificaciones neurohistológicas características (no asociadas a procesos vasculares). En esta categoría se encuentra la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick y la demencia asociada al síndrome de Down. El diagnóstico se aplica fundamentalmente a pacientes de 40 a 90 años que presentan deterioro intelectual, y se realiza mediante pruebas neuropsicológicas. Además se presentan manifestaciones de trastornos de memoria; alteraciones de las funciones cerebrales superiores como juicio, lenguaje, percepción, y conocimiento, alucinaciones, explosiones de conducta verbal o física irracional y muy importante, pruebas de laboratorio normales.²

2.2 CAUSAS DE LA ENFERMEDAD

Existen diversas teorías para explicar las causas de la enfermedad de Alzheimer, las cuales son excluyentes entre sí, y que al parecer hay más de un mecanismo involucrado en el proceso de la enfermedad, por lo que se le ha considerado un mal de origen multifactorial.

Dentro de las causas tenemos que existen errores en la síntesis de proteínas, depósitos de proteínas neurotóxicas, inflamación del cerebro, aumento en la fosforilación de las proteínas cerebrales, inhibición del crecimiento de las dendritas, daño neuronal por

radicales libres, mutaciones a nivel genético y procesos de tipo infeccioso, principalmente virales.

La teoría de los errores en la síntesis de proteínas es una de las más recientes. Se observó que la mutación de un gen de las células neuronales de ratas recién nacidas posteriormente era parcialmente restaurada a la normalidad (producción de proteínas normales) conforme las células de rata envejecían.³

La mutación original que consiste en la eliminación de sólo dos bases (G-A), condujo a un corrimiento de la lectura del código genético.⁴ Las ratas viejas que sintetizaban la proteína normal tenían aún la mutación original en el DNA pero la decodificación del RNAm se hacía en forma equivocada, lo que, paradójicamente daba como resultado la producción de proteína normal.

La codificación del RNAm se efectúa por la lectura equivocada de la secuencia –GAGAG– en la que se ignoran dos bases (–GA–) y queda la secuencia –GAG– que se codifica para un aminoácido, dando así una proteína prácticamente normal. La secuencia –GAGAG– se encuentra en diferentes proteínas, incluyendo dos que intervienen en la enfermedad de Alzheimer: la proteína β -amiloide y la ubiquitina.

Posteriormente, una vez encontrado el código para lecturas equivocadas similares, tanto para la precursora de la proteína β -amiloide (BAPP) como para la ubiquitina de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer,⁵ se obtuvieron anticuerpos dirigidos contra esas proteínas esperadas, carentes de las bases –GA–, y se aplicaron a cortes de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer y de Síndrome de Down. Los anticuerpos reaccionaron con casi todas las muestras de tejidos de pacientes de ambas enfermedades, así como con aquellas que presentaban signos tempranos de placas amiloides y de ovillos

de neurofibrillas, pero no reaccionaron con los tejidos control de un joven. El análisis de la proteína reactiva demostró que ésta es del tamaño esperado para la BAPP mutante.^{6,7}

El mecanismo por medio del cual estos errores en las proteínas pueden causar la enfermedad de Alzheimer no está completamente entendido; sin embargo, se piensa que la carencia de ubiquitina, cuya función es de eliminar las proteínas defectuosas, pudiera ser la causa de que se acumulen.

Asimismo, se ha observado la presencia de un tipo alterado de BAPP que puede causar la acumulación tóxica del producto final, la proteína β -amiloide (BAP), presente en las placas de los pacientes con Alzheimer (figura 2).

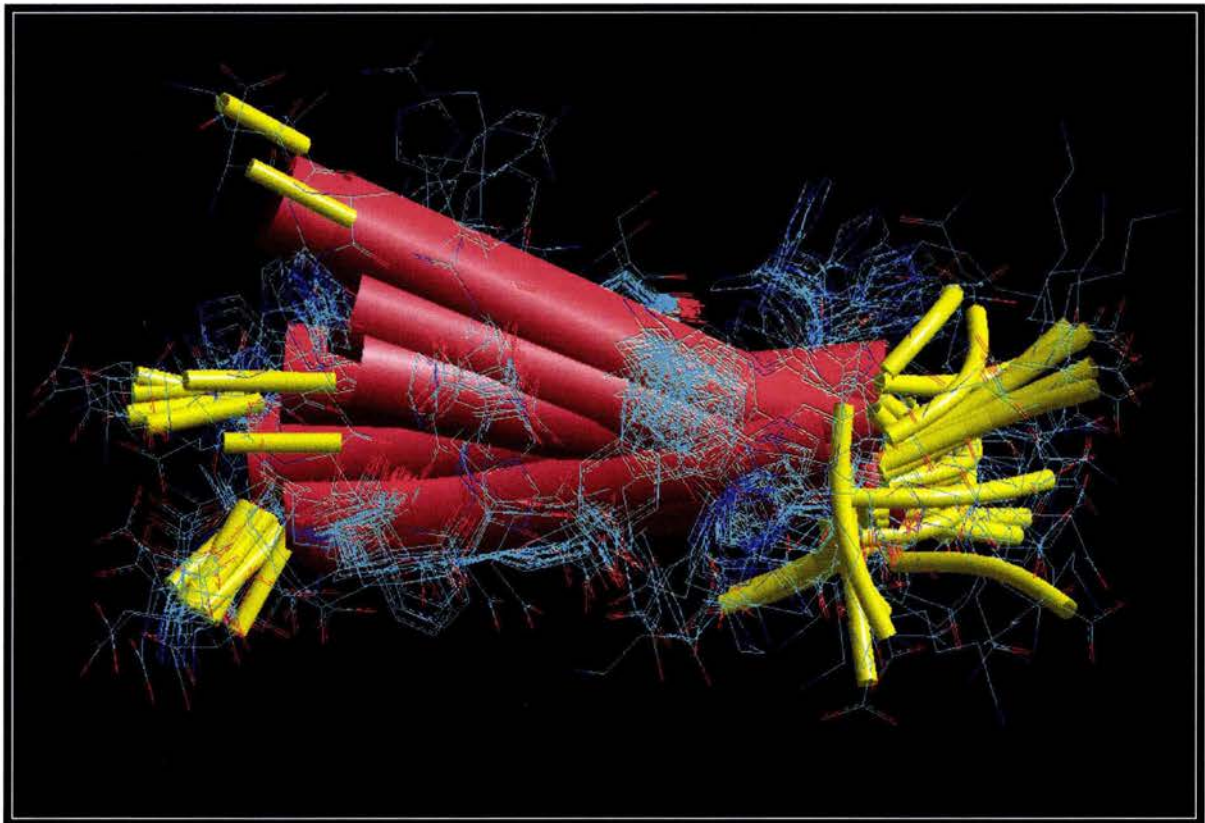


Figura 2. Proteína β -amiloide es un polipéptido que está constituido por 40 a 42 aminoácidos y su PM es de aproximadamente 4200 Da. Al parecer constituye la mayor parte en la formación de las placas seniles.²

Esta proteína es un péptido de 40-42 aminoácidos, con peso molecular aproximado de 4200 Da, secretado normalmente por neuronas y otros tipos celulares del sistema nervioso central. Otros tipos de proteínas (de la matriz extracelular, acetilcolinesterasa, apolipoproteína E, etc.) son constituyentes habituales de los depósitos amiloides. La proteína β -amiloide se agrega con otras proteínas, reacciona con carbohidratos en un proceso de glucosidación y sufre cambios estructurales, volviéndose insoluble y adoptando una conformación de "hoja plegada- β ". Estas estructuras forman el centro de las placas neuríticas y tienen actividad neurotóxica.

La creencia más aceptada sobre la causa de la enfermedad de Alzheimer es el depósito anormal de proteínas neurotóxicas en el cerebro. Estos depósitos dan lugar a lesiones características que se ubican en tres categorías generales (figura 3):

- 1) El cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer contiene un gran número de estructuras llamadas placas seniles, constituidas por un núcleo de proteína β -amiloide, que rodean terminales nerviosas degeneradas.
- 2) La anormalidad se caracteriza por la presencia de los llamados ovillos de neurofibrillas; se cree que estos depósitos son causados por la hiperfosforilación de una proteína llamada tau.
- 3) Esta lesión se conoce como AMY y es similar a las placas amiloides, pero carece del núcleo de la proteína.

Primer categoría: Las lesiones que involucran a la proteína β -amiloide han sido las más estudiadas. La BAP deriva de una proteína mucho mayor llamada proteína precursora de BAP (BAPP), que puede encontrarse en células normales.^{8, 9, 10}

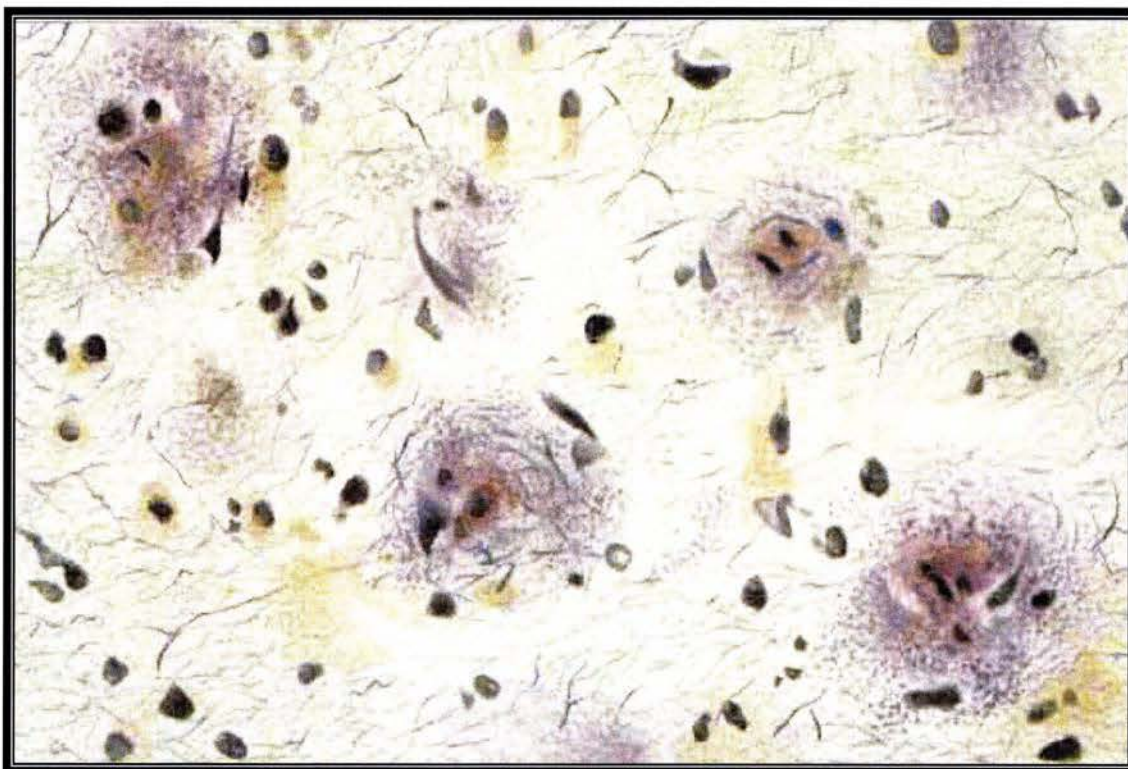


Figura 3. Fotografía de placa senil en la que se observan cuatro estructuras principales teñidas en rojo las cuales están constituidas por la proteína β -amiloide que actúa como centro de degeneración neuronal, puesto que engloba y distorsiona progresivamente todos los elementos nobles, somas y prolongaciones neuronales. Estas placas se encuentran en las estructuras intracerebrales involucradas en la memoria y el control emocional, la amígdala, el hipocampo y los núcleos basales colinérgicos del cerebro anterior.³²

La BAP encontrada en las placas de pacientes con enfermedad de Alzheimer no parece ser el producto del procesamiento normal de la BAPP.^{11, 12, 13} Por tanto, la explicación más simple para la enfermedad de Alzheimer sería la degeneración y muerte de las neuronas causada por la acumulación de esta proteína, la cual es capaz de interactuar directamente con las neuronas a través de una molécula receptora, que se ha

identificado y ha sido denominada RAGE (Receptor for Advanced Glicosilation Ends). La interacción del péptido β -amiloide con este receptor parece inducir una lipoperoxidación, en particular a nivel de la membrana plasmática. La lipoperoxidación es un proceso en cadena que implica la oxidación de ácidos grasos insaturados, proceso que normalmente es prevenido por sustancias con actividad antioxidante. El resultado de la lipoperoxidación puede ser la muerte de la neurona (la lipoperoxidación puede desencadenar directamente la apoptosis) o bien la disfunción neuronal.

Asimismo, se ha observado que la interacción de la β -amiloide con el receptor RAGE presente en el tejido de la microglía estimula la activación o la transformación a célula macrofágica o ambos hechos. Estos macrófagos activados son entonces capaces de liberar tanto exitotoxinas (ácido glutámico, ácido quinolénico) como radicales libres. La gran interrogante es cómo y por qué se produce la BAP, la cual además se deposita en las neuronas de los pacientes con Alzheimer y no en neuronas de los sujetos normales.

La BAPP es una proteína membranal y las porciones de ella que se extienden hacia fuera de la membrana citoplasmática son liberadas por una enzima denominada *secretasa* (figura 4).¹⁴ En este proceso normalmente no se produce BAP asociada a placas seniles; sin embargo, si la *secretasa* corta fuera de la secuencia de la BAP, entonces se generaría un fragmento (BAP4) que normalmente se encuentra en las placas de pacientes con enfermedad de Alzheimer.^{15, 16}

Algunos investigadores han encontrado un camino alternativo para la degradación de la BAPP, el cual se realiza a nivel de pequeñas vesículas lisosomales con un gran número de enzimas que podrían degradar a la BAPP, dando lugar a una variedad de fragmentos amiloidogénicos (BAP 1-40, BAP 1-42 incluyendo el BAP4).¹⁷ Esto podría

explicar por que la BAP puede encontrarse en el líquido cefalorraquídeo tanto de pacientes con Alzheimer como de sujetos normales.

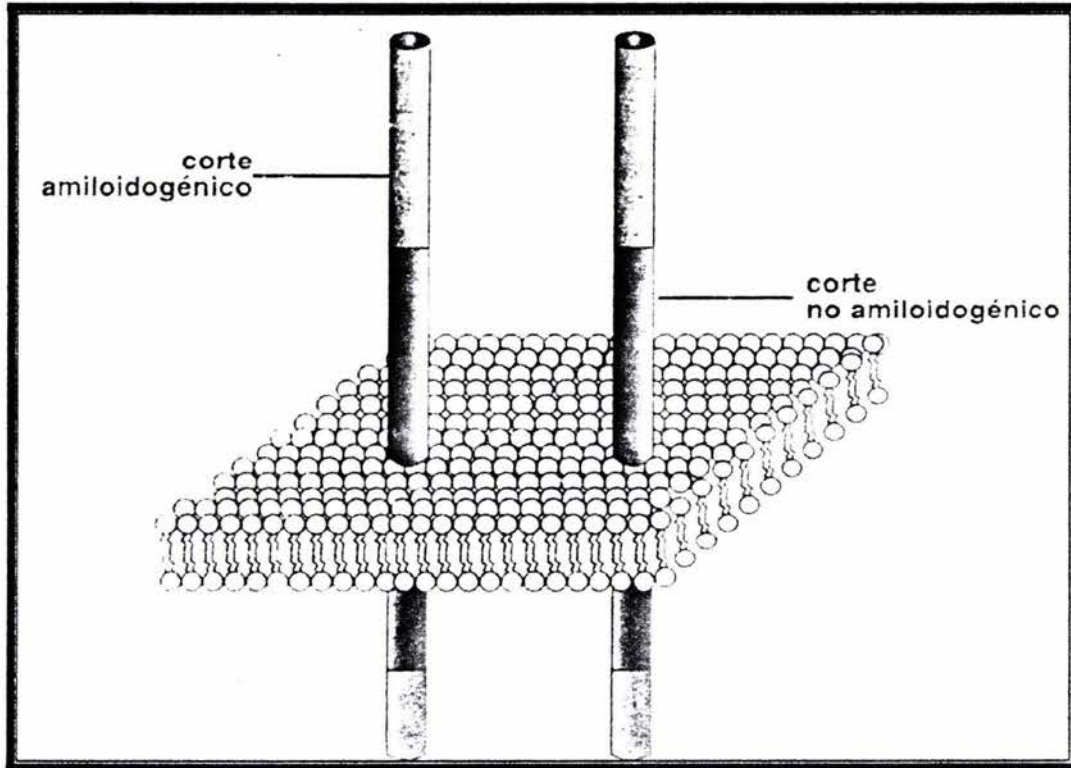


Figura 4. El corte dentro de la región BAP no conduce a la formación de placas seniles.²

La respuesta al por qué de esta enfermedad se podría dar sólo en algunos individuos. En estudios de ingeniería genética, se introdujo un gen mutante de la BAPP, obtenido de una familia con historia de la enfermedad de Alzheimer temprana, a un cultivo de células y se detectó una concentración de BAP 6 a 8 veces mayor que en los testigos.¹⁸

Segunda categoría: Un segundo tipo de lesión encontrado en los pacientes con Alzheimer y que contribuye a la muerte neuronal son los ovillos de neurofibrillas. Estos cúmulos están constituidos por filamentos helicoidales apareados (PHF), cuya subunidad de proteína dominante es la proteína *tau*.

La función de la proteína tau es la de regular y estabilizar la polimerización y el ensamble de la tubulina para dar lugar a la formación de microtúbulos, los cuales son importantes en el transporte de nutrientes a través de las neuronas.

La proteína tau que está asociada a los PHF en los ovillos de neurofibrillas (PHF-tau) tiene una estructura anormal ya que se ha demostrado que se encuentra hiperfosforilada, por lo que no funciona adecuadamente el ensamble de los microtúbulos, lo que conduce a la muerte neuronal (figura 5).^{19, 20}

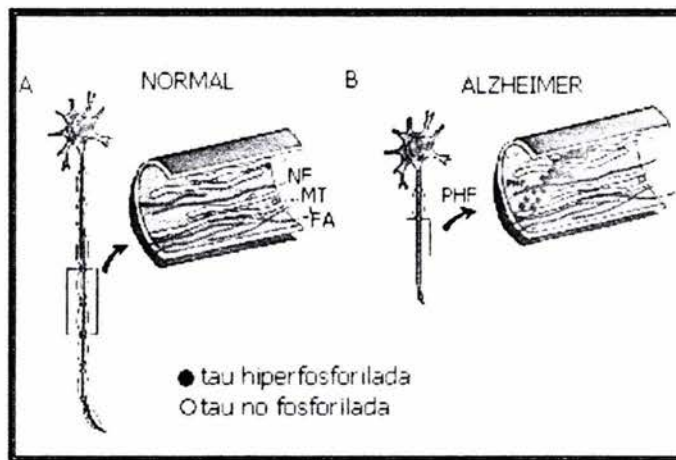


FIGURA 5. Representación esquemática de las alteraciones en la organización funcional de Tau. **(A)** Diagrama simplificado de un corte de un axon neuronal normal indicando la asociación de especies fosforiladas y no-fosforiladas de Tau a los microtúbulos (MT), filamentos de actina (FA) y neurofilamentos (NF). En **(B)** se muestra la situación de una neurona en proceso neurodegenerativo, lo que ocurriría como resultado de una Tau alterada del tipo Alzheimer, en la cual se formarían fibras apareadas helicoidales (PHF) por la autopolimerización de la proteína Tau.²

Existen estudios que muestran que las proteínas tau normal y anormal están fosforiladas prácticamente en los mismos sitios, lo que sugiere que la fosforilación anormal encontrada en la PHF-tau es el resultado de la falla en la fosfatasa encargada de la

eliminación de los grupos fosfato, y que es indispensable para que la proteína funcione adecuadamente. Esta fosfatasa parece no estar presente en las células de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer,³² dando como resultados que se formen los polímeros filamentosos insolubles encontrados en los ovillos de neurofibrillas. A pesar de lo anterior, aún no está claro si la proteína tau juega un papel directo o indirecto, pues se ha sugerido que esta es una reacción propia del estrés cerebral ya que se le encuentra en diversas enfermedades neurológicas, en tanto que no ha podido demostrarse que el gen que codifica para la proteína tau esté vinculada con casos de enfermedad de Alzheimer familiar.²¹

Tercera categoría: El último tipo de lesión encontrado en los pacientes con enfermedad de Alzheimer son las llamadas placas AMY. Estas lesiones se demostraron mediante el uso de anticuerpos producidos contra las proteínas de tejidos cerebrales enfermos, los cuales fueron incapaces de reaccionar con el núcleo β -amiloide de las placas o con la proteína PHF-tau.²² Sin embargo todas las muestras de tejidos provenientes de pacientes con Alzheimer reaccionaron con el anticuerpo dirigido contra la proteína de 100kD, desconocida hasta entonces, ya que no se colorea con las técnicas rutinarias de tinción.²³

2.2.1 SOSPECHA DE ORIGEN BIOLÓGICO

La sospecha de un origen biológico de la enfermedad, particularmente viral, se basa en la analogía que las demencias de tipo Alzheimer tienen con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, que produce un cuadro de demencia de evolución rápida y fatal, ya que con cierta frecuencia se encuentran placas seniles en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

y se observa de manera esporádica una espongiosis neuronal en las demencias de tipo Alzheimer.

Las SAF (scrapie-associated fibrils) encontradas en las neuronas de los enfermos portadores de encefalopatías espongiformes subagudas humanas (como el scrapie, el kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob) se han asociado al posible carácter infeccioso de estos procesos. El agente causal de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob estaría constituido por una proteína infecciosa, asociada a las SAF y denominada "prion", la cual aunque presentaría algunas analogías estructurales con la sustancia amiloide, tendría una secuencia de aminoácidos muy diferente. La supuesta transmisión al chimpancé de la enfermedad de Alzheimer, efectuada por Gibbs y Gajdusek en 1978, se ha puesto en duda ya que nunca se pudo reproducir.²

2.2.2 FACTORES AMBIENTALES DE RIESGO

Se sabe que el hierro (Fe) facilita la acción tóxica de la BAP mediante la conversión de H_2O_2 a radicales hidroxilo, y se ha demostrado que el aluminio (Al) aumenta el daño neuronal producido por los radicales libres, inducidos por el hierro, en especial incrementando las peroxidaciones de los lípidos.^{36, 37} También se ha propuesto que el aluminio se enlaza a grupos de fosfato, protegiendo así a la PHF-tau de la digestión.²⁰ Por el contrario, otros autores han sugerido que altas concentraciones de hierro y aluminio en la neurona pueden llevar a la producción de "placas inmaduras" en el cerebro. La microglía responde a estas placas, destruyéndolas pero produciendo al mismo tiempo H_2O_2 . Estudios epidemiológicos sobre el efecto del aluminio por sí solo en la enfermedad de Alzheimer no han mostrado ninguna relación, sin embargo, el aluminio, el hierro y el zinc juntos parecen desempeñar un papel en la neuropatogénesis de la enfermedad de Alzheimer ya que se unen a la BAP, acelerando su agregación.³⁵ También se ha propuesto que el zinc puede

participar en la apoptosis de las neuronas, dado que este metal interactúa con los factores de transcripción que supuestamente están relacionados con los procesos apoptóticos.³⁹ Sin embargo, algunos autores dudan respecto al papel del zinc.⁴⁰

Asimismo parece que la nicotina y algunos metabolitos (cotinina) poseen potencial carácter terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El hecho de que los fumadores, aún con un historial de demencia familiar, desarrollen menos la enfermedad de Alzheimer que los testigos no fumadores lo demuestra. Se ha encontrado que la nicotina inhibe la agregación de los péptidos BAP 1-42 para dar lugar a las estructuras laminares que se presentan en la formación amiloide de la enfermedad de Alzheimer.

2.3 BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La forma genética autosómica dominante de la llamada "enfermedad de Alzheimer familiar" (FAD) se caracteriza por la aparición de los síntomas en etapas tempranas de la vida, entre los 30 y los 60 años de edad. Se han identificado tres genes que participan en la aparición de la FAD y un cuarto gen considerado factor de riesgo. Se han detectado mutaciones en varios genes, los cuales se localizaron en los cromosomas 1, 14, 19 y 21 (Tabla 1).²⁴

Tabla 1. Genes asociados a la enfermedad de Alzheimer.

Gen	Cromosoma	Producto del gen	Incidencia/edad	Actividad	Referencia
PS-2 (STM2)	1	Siete proteínas transmembranales	70-80% familiar 40-50 años	Producción de BAP1-42	27
PS-1 (S128)	14	Siete proteínas transmembranales	70-80% familiar 40-50 años	Producción de BAP1-42	26
ApoE4	19	Factor de riesgo	40-50% aparición tardía 60 años o más	Densidad de BAP en placas	38
491 ^a BAPP	19 21	Factor de riesgo Precursor de la proteína β-amiloide	Aparición tardía 2-3% familiar 50 años	Producción total de BAP, BAP1-42	48

Los genes presenilina-1 (PS1) y presenilina-2 (PS2), anteriormente conocidos como S182 y STM2, se localizan en los cromosomas 14 y 1 respectivamente y son la causa más importante de la FAD.^{25, 26} Se han identificado mutaciones sin sentido en ambos genes en pacientes con FAD, y se conoce que codifican para proteínas transmembranales que presentan un 67% de similitud en su secuencia de aminoácidos.^{27, 28, 29, 30} Se sabe que el gen PS1 está involucrado en la producción de BAP por un proceso proteolítico sobre su proteína precursora (BAPP).^{28, 31} El gen que gobierna la síntesis del precursor de la proteína β -4-amiloide, componente principal de la sustancia amiloide de las placas seniles, se encuentra en la región proximal del brazo largo del cromosoma 21.

Se han detectado diferentes mutaciones sin sentido en los genes PS1 y PS2, los cuales aumentan selectivamente la producción de tipos específicos de BAP, algunos de estos péptidos (como el BAP1-42) se pueden encontrar depositados en las placas formadas en la enfermedad de Alzheimer y en el síndrome de Down.³²

Recientemente, De Strooper *et. al.*,³³ publicaron que la función del gen PS1 está asociada con uno de los genes de la *secretasa* que interviene en el procesamiento de la BAPP.³³ Estos autores siguieron el catabolismo de la BAPP después de que el gen de BAPP se introdujo en neuronas de ratón carentes del gene PS1, y encontraron que las células carentes del gen PS1 redujeron la producción de BAP en un 80% a partir de la BAPP en comparación con aquellas células que contienen el gen PS1 normal.³⁴ Esto contrasta con los efectos observados en genes mutantes de PS1 presentes en pacientes con Alzheimer que muestran sobreproducción de BAP.

En el procesamiento de la BAPP intervienen tres *secretasas*. La carencia de BAP en las células con el gen mutante PS1-1 se explica por la ausencia de una tercera *secretasa*, la γ -*secretasa*, que de alguna manera es controlada por el gen PS1 y es indispensable para

el rompimiento final de los fragmentos generados por las *secretasas* α y β . Se encontró que los fragmentos generados por las secretasas, y que constituyen el sustrato para la γ -*secretasa*, se acumulan en las células PS1-1 (Figura 6).

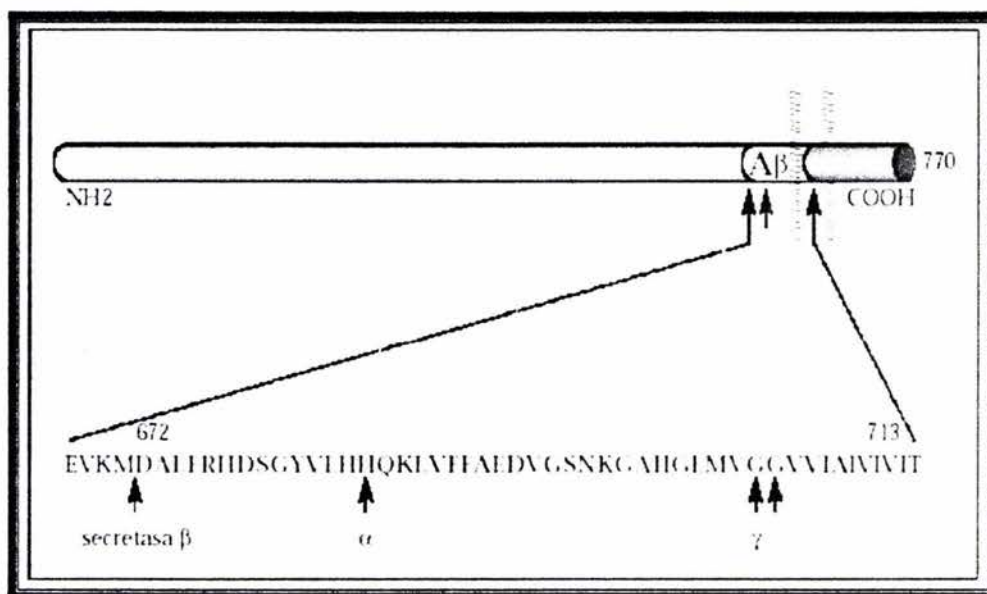


Figura 6. Proteína precursora del amiloide (APP). Se detalla la estructura del A β y se indican los sitios de corte de las secretasas.³²

Se ha hecho una analogía entre el gen PS1 y un modelo del mecanismo de la *proteína enlazadora del elemento regulador de esteroides* (SREBP). En este modelo,³⁴ el primer rompimiento de la proteína membranal está dado por la proteína activadora del rompimiento de SREBP; a continuación un segundo rompimiento (similar al de la γ -*secretasa* sobre la BAPP) libera el factor transcripcional enlazado a membrana.

También se han estudiado la patología y muerte neuronales asociadas a mutaciones en los genes PS1 y PS2. Un grupo de investigadores ha encontrado que la proteína expresada por el gen PS2 mutante e introducido en células nerviosas incrementa la susceptibilidad de dichas células a la apoptosis, contrariamente a la acción de la proteína expresada por él en PS2 normal.³⁵

El descubrimiento del gen Apo E en el cromosoma 19 fue muy alentador, ya que se le asoció a un buen número de casos de enfermedad de Alzheimer de aparición tardía. Actualmente se considera un factor de riesgo (Tabla 1) pues algunos pacientes con Alzheimer no acarrean el gen y otros sí lo tienen no presentan la enfermedad.²⁴ El gen Apo E tiene tres alelos, y las variaciones genéticas de locus del gen de la Apo E determinan el polimorfismo de la proteína dando lugar a 3 isoformas: Apo E-2, E-3 y E-4; éstas difieren básicamente entre sí en los aminoácidos 112 y 158 del polipéptido: así como la presencia del Apo E-2 aumenta el riesgo de hiperlipidemia de tipo III y de arteriosclerosis, el Apo E-4 parece incrementar, de un 20% a un 90%, el riesgo de la enfermedad de Alzheimer a una edad promedio de 68-84 años. Se ha demostrado que el gen Apo E-4 en homocigosis fue suficiente para desencadenar la enfermedad de Alzheimer a la edad de 80 años en 42 familias estudiadas. La proteína producida por el gen Apo E-4 (apolipoproteína E) es una proteína polimórfica e interviene en el transporte y metabolismo del colesterol y de los triglicéridos. Se ha encontrado presente en líquido cefalorraquídeo y se ha observado a nivel experimental, que los anticuerpos generados contra ella reaccionan con las placas seniles y los ovillos de neurofibrillas presentes en el tejido cerebral de pacientes con Alzheimer.

El mecanismo molecular por el cual el gen Apo E-4 desencadena la enfermedad de Alzheimer aún no se ha elucidado; sin embargo se ha demostrado que el gen Apo E-4 no causa un incremento en el procesamiento amiloidogénico de la BAPP como lo hacen los genes ligados a los cromosomas 12 y 21. En estudios *in vitro* se ha demostrado cierta evidencia de que el gen Apo E-4 actúa a nivel de la polimerización de la BAP para dar lugar a la formación de los filamentos amiloides.

Otro estudio ha sugerido que la apolipoproteína E, producto del gen Apo E, tiene un papel estimulante en la polimerización de la BAP y que el producto del gen Apo E-4 presenta la mayor actividad catalítica. Recientemente se ha descrito un nuevo polimorfismo dentro de la región transcripcional del gen Apo E, el gen 491A que parece ser independiente de Apo E-4 y en estado homocigótico incrementa el riesgo de la enfermedad de Alzheimer. Se ha sugerido que este gen actúa alterando el nivel de expresión del gen Apo E.⁴¹

El gen que codifica para el gen BAPP se localiza en el cromosoma 21 y es responsable del 2-3%, de la FAD (Tabla 1) que causan entre 1 y 6 mutaciones diferentes. Estas se localizan cerca del sitio BAP, dentro de la zona de BAPP, y alteran el procesamiento proteolítico, lo que conduce a la acumulación de fragmentos de BAP en particular de BAP 1-42. Es importante recordar que los genes PS1 y PS2 que son responsables del 70-80% de las FAD, alteran las enzimas proteolíticas encargadas del procesamiento de BAPP.

Hay razones para creer que aún faltan por descubrir más genes involucrados en la enfermedad de Alzheimer. Un estudio reciente⁴¹ sugiere que una respuesta inmunoinflamatoria pudiera desempeñar algún papel en la enfermedad de Alzheimer, posiblemente dañando a las células nerviosas. Una variante de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (HLA-A2) se ha encontrado en el 83% de un grupo de pacientes que presentaban pérdida de la memoria a la edad de 50 años. Grandes cantidades de la proteína del gen HLA-A2 se han detectado en cerebros de pacientes con Alzheimer. Estos hechos son congruentes con los reportes sobre el uso de diferentes fármacos antiinflamatorios que pueden retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. En otro estudio se observó que en poblaciones con una fuerte

herencia Cherokee parecen tener poca propensión a padecer la enfermedad de Alzheimer, y se ha establecido que este factor genético podría ser independiente de los alelos de Apo E y también disminuye con la edad.⁴¹

Otro factor que puede iniciar o promover el depósito de los péptidos β -amiloides es el factor de crecimiento transformante, TGF- β 1. Esta sustancia, que desempeña un papel muy importante en la respuesta del cerebro al daño, se incrementa en el sistema nervioso central de pacientes con Alzheimer. Asimismo se ha demostrado, en ratones transgénicos para el gen TGF- β 1, que este factor acelera el depósito de proteína amiloide.⁴²

En el análisis pos-mortem en el tejido cerebral de pacientes con Alzheimer se encontró que el RNAm de TGF- β 1 fue tres veces mayor que en individuos normales, lo que también sugiere que la sobreexpresión del gen de TGF- β 1 puede iniciar o acelerar el depósito de BAP en el cerebro.

2.4 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Actualmente se efectúan los ensayos clínicos de varios fármacos que pudieran prevenir o retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. Aunque es pronto para observar resultados, parece ser que algunos de ellos pueden retrasar en 10 años la aparición de los síntomas, lo que reduciría de manera importante la incidencia de la forma tardía de la enfermedad. Las principales áreas que se están considerando para el mecanismo de acción de los nuevos fármacos son las siete siguientes, dentro de las cuales esta el incremento de la concentración de acetilcolina en el cerebro (tabla 2),

- 1) Inhibición de la agregación de la proteína β -amiloide.
- 2) Fosfatasas que pudieran inhibir la formación de PHF-tau.

- 3) Antioxidantes que prevengan el efecto de cascada de los radicales libres por la proteína β -amiloide.
- 4) Reducción de la absorción o concentración de aluminio en tejido cerebral.
- 5) Reducción de la inflamación del tejido cerebral de pacientes con Alzheimer por medio de fármacos antiinflamatorios, esteroidales o no.
- 6) Incremento de la concentración de acetilcolina en el cerebro.
- 7) Estimulación de los receptores neuronales involucrados en los mecanismos de memoria.

Tabla 2. Lista de los fármacos más usados y sus actividades.⁴³

FÁRMACO	ACTIVIDAD	MECANISMO DE ACCIÓN
Tacrina Donepezil Aricept Rivastigmina Ampakinas	Inhibidor de la acetilcolinesterasa	Compensar la pérdida de las neuronas colinérgicas
Prednisona Ibuprofeno Y otros antiinflamatorios no esteroidales	Aumenta la actividad del receptor de AMPA Antiinflamatorio	Mejora la memoria aumentando la potenciación a largo plazo Previene el daño inflamatorio a las neuronas
Vitamina E	Antioxidante	Protege contra el daño por radicales libres
Premarin Factor de crecimiento neuronal	Hormona femenina Mantiene a las neuronas colinérgicas en el cerebro	Promueve la supervivencia neuronal Promueve la supervivencia neuronal
Bloqueadores de los canales de calcio	Inhibe la entrada de calcio a las neuronas	Reduce la toxicidad del calcio
Fármacos hipocolesterolemiantes	Reduce las concentraciones de Apo E4	Previene la toxicidad de la Apo E4 a las neuronas
Inhibidores de proteasas	Bloquea la producción de la proteína β -amiloide	Previene la pérdida de neuronas por la toxicidad de la proteína β -amiloide

2.5 INHIBIDORES DE LA COLINESTERASA

Para producir un incremento de la concentración de acetilcolina en el cerebro, se han utilizado los inhibidores de la colinesterasa.

A pesar de la naturaleza multifactorial de la enfermedad de Alzheimer (EA), las estrategias que se han diseñado para el tratamiento de la EA se han dirigido básicamente hacia dos objetivos:

- a) El péptido β -amiloide γ ,
- b) La neurotransmisión colinérgica.

La primera estrategia se orienta hacia la prevención de los procesos neurodegenerativos que finalmente provocan el daño irreversible en el cerebro. La EA está neurohistopatológicamente caracterizada por la aparición de placas seniles extracelulares, mayoritariamente formadas por placas del péptido β -amiloide, redes o nudos neurofibrilares debido a la hiperfosforilación de la proteína tau, y la degeneración o atrofia de las neuronas colinérgicas. El péptido β -amiloide procede de la hidrólisis de la proteína precursora β -amiloide (APP). Este proceso puede ocurrir por dos vías mutuamente excluyentes, ya sea por hidrólisis de la proteína por una α -secretasa que da lugar a fragmentos solubles de APP no tóxicos y neuroprotectores o, alternativamente, por sucesivas hidrólisis de APP por las enzimas β - y γ -secretasas que generan el péptido β -amiloide. Aunque trazas del péptido β -amiloide están siempre presentes en el metabolismo normal de APP, un aumento de la producción del péptido, su agregación y depósito como placas amiloides insolubles puede ser el desencadenante del inicio de la enfermedad. Por lo tanto, cualquier agente que impida la génesis y depósito del péptido β -amiloide será útil para impedir el progreso de la enfermedad. En cualquier caso, a pesar del reciente desarrollo de inhibidores de β - y γ -secretasas o inhibidores de la agregación de las placas amiloides, estas aproximaciones están aún en su desarrollo inicial y no hay, por lo tanto, datos clínicos al respecto.

La segunda aproximación para el tratamiento de la EA se basa en la llamada "hipótesis colinérgica" que postula que los síntomas que presentan los pacientes de la EA son el resultado de la deficiente transmisión colinérgica y del déficit en el nivel de

neurotransmisores, principalmente acetilcolina (ACh). Entre los fármacos para restaurar la neurotransmisión colinérgica, están los que actúan a:

- a) **Nivel presináptico**, *elevando el nivel de ACh*, a través de productos que bloquean los canales de potasio voltaje-dependientes (linopirdina), antagonistas muscarínicos M2 (PG-9, SCH-72788) o agonistas nicotínicos (nicotina), o a través de *productos que aumentan la absorción de colina (Ch)*, etapa clave en la síntesis de ACh (MKC-213).
- b) **Nivel postsináptico**, como los agonistas muscarínicos M1. En efecto, es bien sabido que en la EA los receptores muscarínicos M1 no sufren degeneración alguna, por lo que los agonistas muscarínicos M1 pueden ser útiles en el tratamiento de la EA, independientemente del grado de degeneración de la transmisión colinérgica. Es ésta la razón por la que los agonistas muscarínicos M1 (análogos de arecolina, espiropiperidinas/espiroquinuclidinas, o análogos heterocíclicos de acetilcolina) se han llegado a proponer como una alternativa estratégica más apropiada que los inhibidores de la AChE para tratar la EA.⁴⁴
- c) **Nivel sináptico**, como los inhibidores de acetilcolinesterasa (IACHÉ). Este tipo de inhibidores ha jugado un papel clave en el tratamiento sintomático de la EA. Es cierto que el balance global es limitado y no sin inconvenientes, ya que la respuesta clínica ha sido heterogénea, parecen idóneos sólo en las primeras etapas de la EA y sus efectos han sido más bien paliativos que decisivos para atajar la enfermedad, presumiblemente porque estos fármacos actúan más sobre una consecuencia de la enfermedad (el déficit colinérgico) que en las causas de la enfermedad.⁴⁵

GENERALIDADES DE LA ACETILCOLINESTERASA (AChE)

La función primordial de acetilcolinesterasa (AChE) es la hidrólisis rápida del neurotransmisor ACh en las sinapsis colinérgicas. La reacción de hidrólisis procede por ataque nucleófilo al grupo carbonilo, acilación de la enzima y liberación de la colina; a continuación, se hidroliza la enzima acilada dando ácido acético, regenerándose la enzima. La estructura tridimensional de AChE de *Torpedo californica*, determinada por rayos-X con una resolución de 2.8Å,⁴⁷ ha mostrado que el centro activo de la enzima se encuentra al fondo de un estrecho y largo "túnel catalítico" (de unos 20Å). Los IChE pueden actuar, o en el sitio activo catalítico, y/o en el sitio periférico. Los inhibidores que actúan sobre el centro activo impiden la unión de una molécula de sustrato, o su hidrólisis, ya sea bloqueando el sitio por su alta afinidad o reaccionando irreversiblemente con la serina próxima al centro catalítico. El sitio periférico es una zona más difusa, situada a la entrada del "túnel catalítico", y donde se unen preferentemente moléculas pequeñas (propidium) o toxinas de tipo peptídico, (fasciculinas). Otras (decametonio), interaccionan simultáneamente sobre uno u otro centro. Tal como se ha visto por los estudios cristalográficos de los complejos de AChE y sus inhibidores, el sitio activo de AChE está formado por tres aminoácidos (Ser200-His440-Glu327) localizados en el fondo de un largo y estrecho "túnel", estando la mayor parte de su superficie recubierta por unos ocho restos aromáticos, y un subsitio que incluye al Trp84, localizado cerca del fondo de la cavidad. Trp84 es el punto de interacción del grupo cuaternario de ACh y el decametonio. De la misma forma, en el sitio periférico, cerca de la entrada a la garganta se encuentra Trp279 donde se ha localizado la unión del segundo grupo cuaternario de decametonio, y que sería el responsable de la adhesión a la enzima (figura 7).

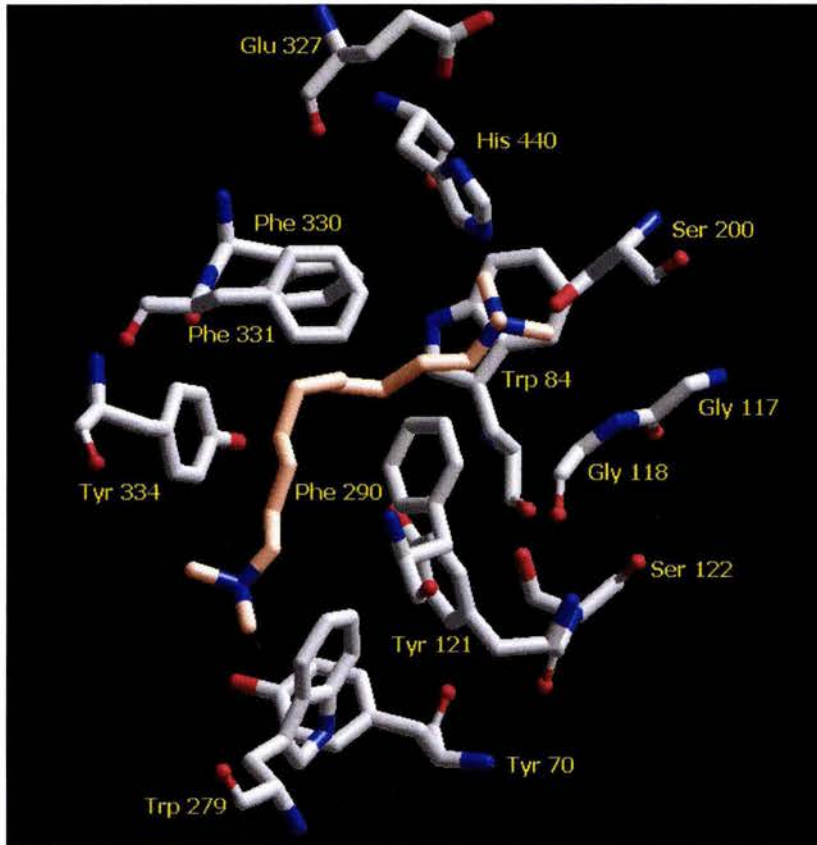


Figura 7. Estructura de rayos X del decametonio (naranja), (átomos de nitrógeno mostrados en color azul), (átomos de oxígeno mostrados en color rojo). Se muestran solamente los aminoácidos que se localizan en el sitio catalítico y sitio periférico de la AChE.⁵⁰

Recientemente se ha descrito que la AChE podría también acelerar el depósito de placas del péptido β -amiloide. Esta actividad estaría favorecida por ligandos (como decamethonium y propidium) que se unen al sitio activo aniónico periférico de AChE, mientras que no se vería afectada por inhibidores específicos del centro activo de la enzima, como edrophonium, lo que indicaría posiblemente que es el centro activo periférico de AChE el que estaría implicado en la formación de las placas β -amiloides.⁴⁶

INHIBIDORES DE LA ACETILCOLINESTERASA (IACHÉ)

Los inhibidores de la colinesterasa los podemos clasificar en cuatro categorías que son:

- Inhibidores pseudo-irreversibles,
- Inhibidores irreversibles,
- Inhibidores tipo-análogos de estados de transición, e
- Inhibidores reversibles.

2.5.1 INHIBIDORES PSEUDO-IRREVERSIBLES.

Esta clase de IACHÉ incluye un grupo de carbamatos (Figura 8-10) que forman un complejo carbamoilado con el residuo de Ser200 de la tríada catalítica de AChE el cual se hidroliza más lentamente que la forma acilada resultante de la interacción con ACh.

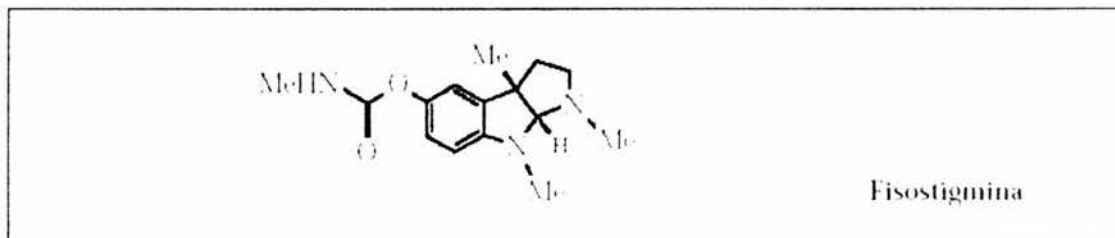


Figura 8

Fisostigmina: primer IACHÉ clínicamente estudiado para el tratamiento de EA, no superó la fase clínica III por problemas de corta vida media, variable biodisponibilidad y estrecho índice terapéutico.⁴⁶

Eptastigmina: menos tóxico y con un tiempo de acción más prolongado, está en fase clínica III.⁴⁶

Quilostigmina: ha mostrado un perfil farmacológico interesante aún se encuentra en fase I.⁴⁶

Rivastigmina (Excelon®): es mucho más potente *in vivo* e *in vitro* que la fisostigmina, además inhibe a la butirilcolinesterasa (BuChE), presenta buena combinación de selectividad cerebral, acción duradera *in vivo*, buena tolerancia y neuroprotección. Aprobada por UE en 1998 y la FDA en 2000.⁴⁸

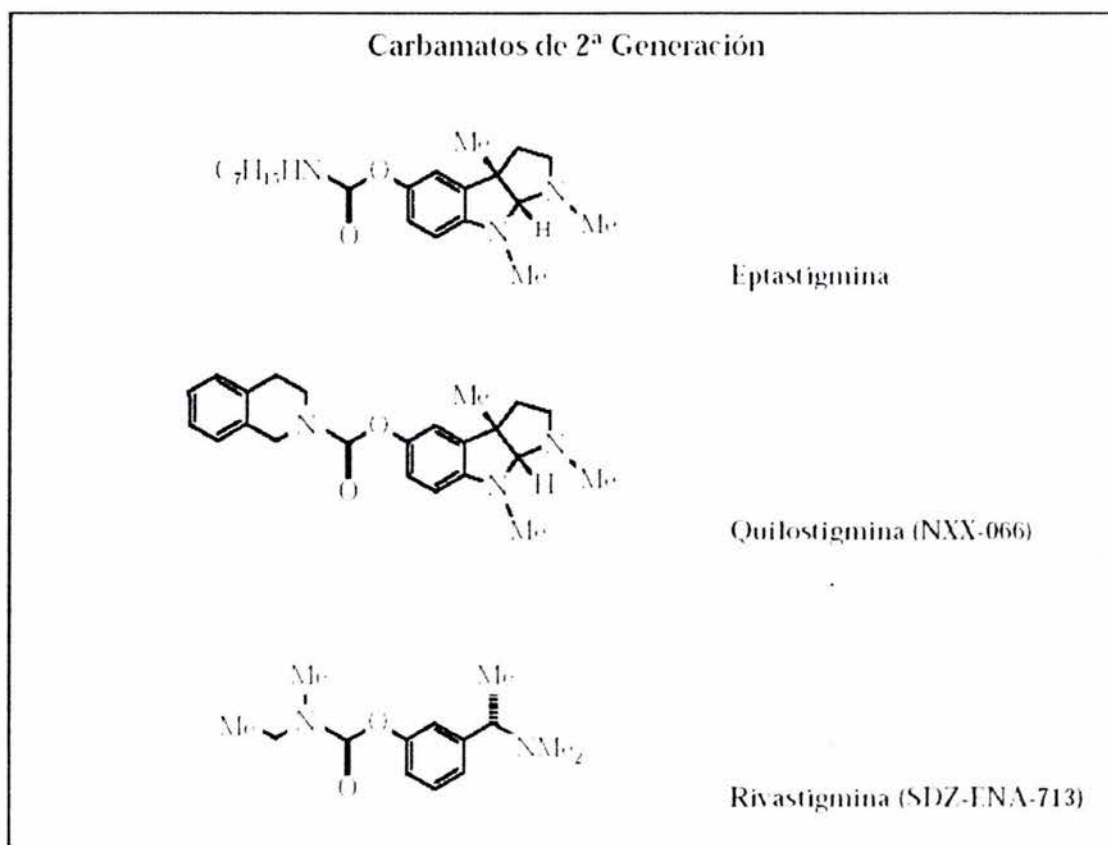


Figura 9

Fenserina y Tolserina: presentan perfil terapéutico amplio, de gran potencia para mejorar la memoria y la cognición en estudios preclínicos con animales modelo.⁴⁹

Ro 46-5934: potente agonista del receptor muscarínico M_2 , induce altos niveles de Ach a nivel extracelular.

CHF2819: inhibidor de la AChE de acción prolongada que produce tanto altos niveles de Ach y serotonina en hipocampo de rata, esto podría ser útil en la depresión de los enfermos de Alzheimer.

P10358: no selectivo IACHe, más eficaz y seguro que eptastigmina en estudios preclínicos con animales.⁴⁶

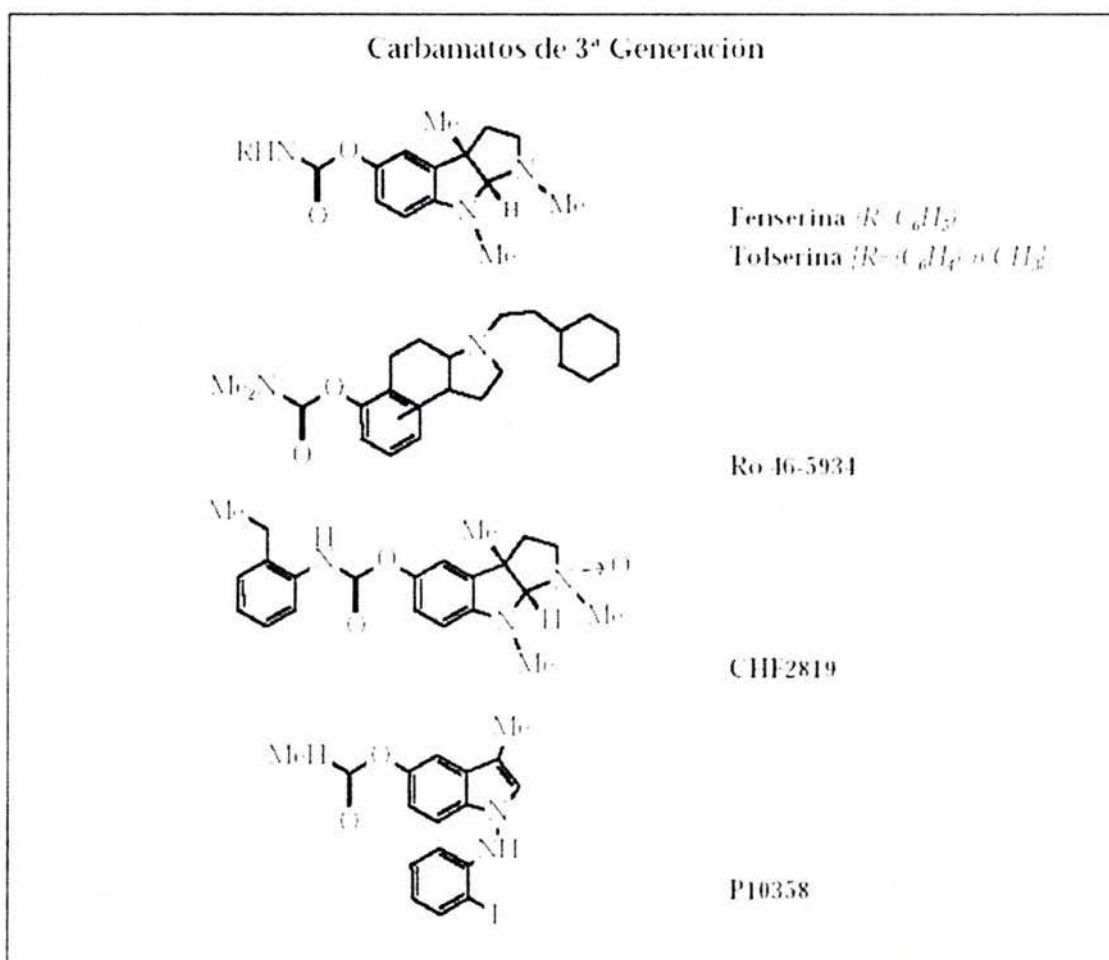


Figura 10

2.5.2 INHIBIDORES IRREVERSIBLES.

Esta familia de IChE incluye una serie de organofosfatos que forman complejos estables fosforilados con el residuo de serina en el centro activo de AChE, y cuya desfosforilación es aún más lenta que la descarbamoiación.

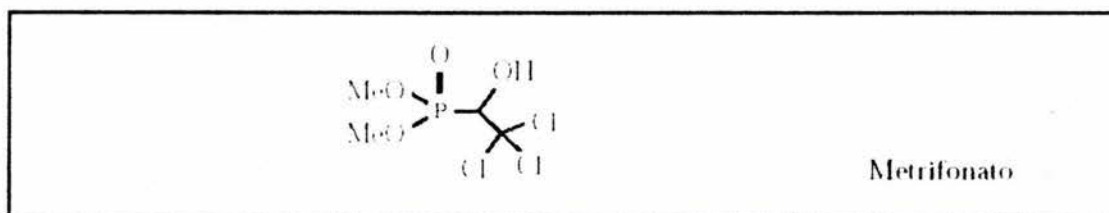


Figura 11

El único representante que ha experimentado un amplio estudio clínico es metrifonato (figura 11). Este compuesto es un pro-fármaco, de por sí no-activo, que se transforma no-enzimáticamente en 2,2-diclorovinil-dimetilfosfonato (DDVP), el verdadero IChE *in vivo* (y también de BuChE) en pequeñas dosis y por largo tiempo (varias semanas), siendo pues el IChE conocido de efecto más prolongado.

A pesar de haber superado la fase clínica III, la FDA finalmente no lo ha aprobado debido a problemas detectados en el sistema respiratorio y en músculo en un grupo pequeño de pacientes.⁴⁶

2.5.3 INHIBIDORES TIPO-ANÁLOGOS DE ESTADOS DE TRANSICIÓN

El yoduro de m-(N, N, N,-trimetilamonio)trifluoroacetofenona (figura 12) es un poderoso IChE, cuya potencia procede de la interacción covalente y reversible con el residuo de serina del centro activo de la enzima, formando un aducto hemiacetálico, tetraédrico, que recuerda el estado de transición en el mecanismo mismo de la enzima.

Sin embargo, el carácter iónico de la molécula impide su paso a través de la barrera hematoencefálica.

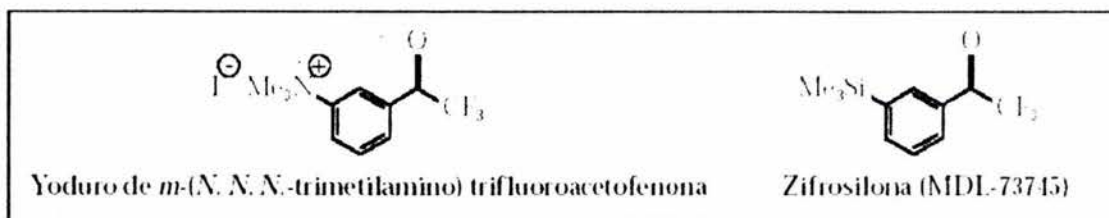


Figura 12

Teniendo el mismo diseño, el compuesto anterior ha sido superado por la **zifrosilona** (figura 12), compuesto que se está evaluando como posible fármaco para el tratamiento de la EA. Se trata de un IChE selectivo y potente, con una K_i a nivel picomolar. Zifrosilona, se ha demostrado eficiente en estudios con animales, baja toxicidad, aumentando el nivel de neuroaminas como adrenalina y dopamina.⁴⁶

2.5.2.4 INHIBIDORES REVERSIBLES.

Estos inhibidores interaccionan con la enzima cerca del sitio catalítico, sin producir complejos covalentes. Son tres familias de este grupo: tacrinas (análogos de aminoacridinas) (figura 13), las N-bencilpiperidinas (figura 14) y algunos alcaloides (figura 15).

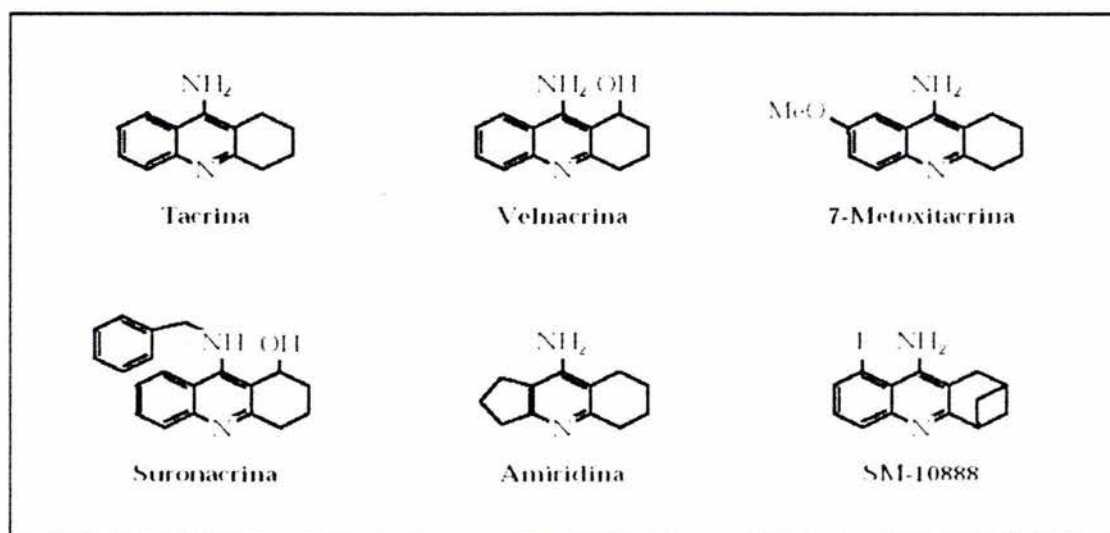


Figura 13. Análogos de aminoacridinas

TACRINAS (ANÁLOGOS DE AMINOACRIDINAS)

En este grupo se encuentra la tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina). En el análisis por rayos X del complejo tacrina-AChE se observa que tacrina dispone paralelamente entre los restos de Trp 84 y Phe 330, el átomo de nitrógeno heterocíclico está formando un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo de la cadena más larga de His 440, y el grupo amino forma un puente de hidrógeno con una molécula de agua.⁴⁶

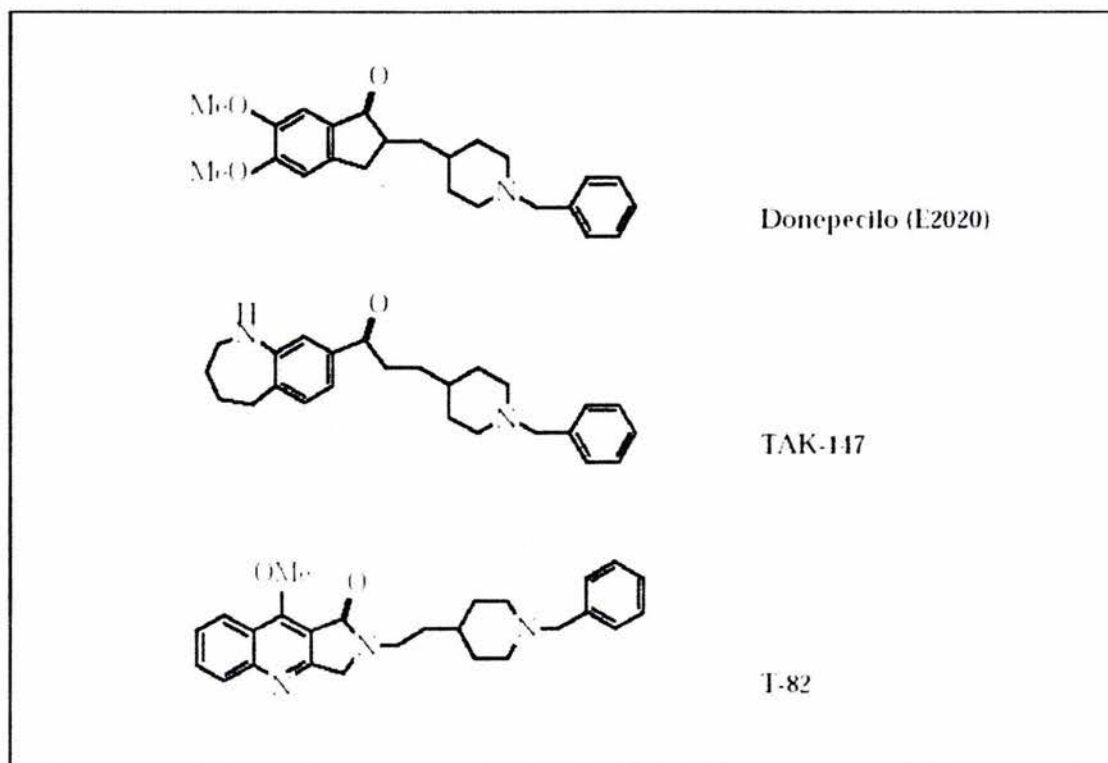


Figura 14. N-bencilpiperidinas.

N-BENCILPIPERIDINAS

A este grupo pertenece el **donepecilo**. El análisis por rayos X del complejo donepecilo-AChE, muestra que el donepecilo adopta una singular orientación, situándose desde el centro aniónico del centro catalítico hasta el sitio periférico de AChE, interaccionando con distintos restos aromáticos de los diferentes aminoácidos aromáticos y moléculas de agua. Se observa que el grupo bencilo se dispone en una posición paralela, dando lugar a una interacción p-p, con el anillo indólico de Trp 84 y, por lo tanto, ocupando el sitio de unión de los grupos cuaternarios en el centro activo; el nitrógeno cuaternario del anillo de piperidina genera una interacción catión-p con el resto de Phe 330; finalmente, el anillo de indanona se dispone paralelamente (interacción π - π) con el anillo de indol de Trp 279 en el sitio periférico.⁴²

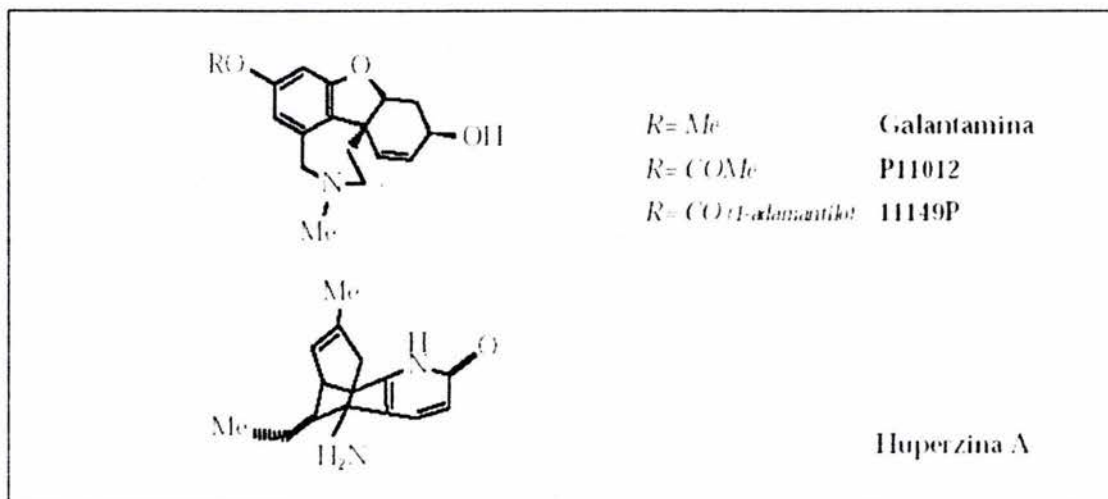


Figura 15. Alcaloides.

ALCALOIDES

En este grupo se encuentran la **galantamina** y **huperzina A**. La galantamina se une a la base del sitio activo interno de la enzima interaccionando con el bolsillo de unión del grupo acilo y con el sitio de unión del grupo amonio cuaternario. Sin embargo, la amina terciaria interacciona por medio de una molécula de agua con los restos de Trp 84 y Phe 330. Otros puntos de contacto son los puentes de hidrógeno del oxígeno del grupo metoxilo y del grupo hidroxilo de Ser 200, entre el grupo carboxílico de Glu 199.

En el análisis por rayos X de complejo huperzina A-AChE se observa que el grupo amino interacciona con los anillos aromáticos de Trp 84 y Phe 330, hay un puente de hidrógeno entre el grupo etilideno y el oxígeno principal de His 440, y varias moléculas de agua interaccionando con distintos residuos en el sitio catalítico.⁴²

2.6 SERIES DE DERIVADOS DE PIRIDAZINAS COMO IACHÉ

Estos IACHÉ son considerados inhibidores reversibles tales como tacrina, donepecilo, galantamina y rivastigmina, para esta serie de derivados se realizó un análisis

computacional en el cual se investigaron los posibles modos de unión mediante la estructura de rayos X de la AChE. Los estudios del anclaje permiten identificar algunas características del modo de unión de los inhibidores; por ejemplo se encontró que para la 3-[2-(1-bencilpiperidin-4-il)etilamino]-6-fenilpiridazina (en forma de clorhidrato) (figura 16), la región de nitrógeno de la piperidina (protonado) con densidad de carga positiva, logra formar una interacción catión-nube π , la cual interactúa con los residuos de Phe 330 y Trp 84 que están ubicados en la parte aniónica del sitio activo de la enzima.

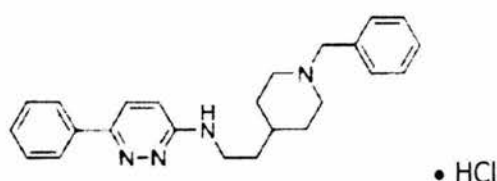


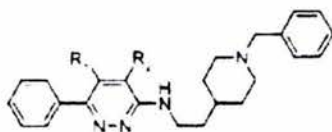
Figura 16. clorhidrato de la 3-[2-(1-bencilpiperidin-4-il)etilamino]-6-fenilpiridazina

Interacciones hidrofóbicas y de tipo van der Waals son también evidentes para el modelo de proteína inhibidor. Las interacciones de tipo van de Waals del anillo de piperidina ocurren con el residuo de Phe 331 y Tyr 334. El anillo bencílico del derivado de la figura 16 desarrolla una interacción π - π con el anillo aromático del Trp 84, la parte de la fenil-aminopiridazina está localizada en la entrada del túnel catalítico e interacciona con dos residuos aromáticos, el Trp 279 y la Tyr 70, los cuales se encuentran en el sitio periférico de la AChE. El anillo de fenilo el cual no es coplanar con el heterociclo de la aminopiridazina, parece tener interacciones π - π con el residuo aromático de Trp 279, así el anillo de la aminopiridazina ocupa la misma región en el espacio que el nitrógeno cuaternario del decamethonium. En general el inhibidor parece actuar en ambos sitios, en el sitio periférico y en el sitio activo de la enzima.⁵⁰

Aunque el estudio de modelaje molecular nos provee información interesante para el diseño de potentes inhibidores, el trabajo computacional fue realizado después de haber

iniciado la estrategia clásica de estructura-actividad. Así cuatro tipos de modificaciones estructurales fueron investigados con la finalidad de obtener la actividad contra la AChE.

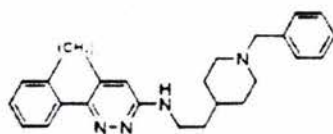
- La primera, fue realizar sustituciones en el C-4 y C-5 de la piridazina (tabla 3).



Compnd	R ₁	R ₂	Mp. (°C)	Formula	IC ₅₀ (nM) ²
1	H	H	268	C ₂₁ H ₂₁ N ₄ · 2 HCl · H ₂ O	120 ± 10
4a	H	Me	246	C ₂₂ H ₂₃ N ₄ · 2 HCl · 0.5 H ₂ O	320 ± 20
4b	H	<i>i</i> -Pr	103	C ₂₃ H ₂₅ N ₄ · 2 HCl · 2 H ₂ O	450 ± 14
4c	Me	H	135	C ₂₂ H ₂₃ N ₄ · 2 HCl · 1.2 H ₂ O	21 ± 3
4d	Et	H	270	C ₂₃ H ₂₅ N ₄ · 2 HCl · H ₂ O	27 ± 2
4e	Pr	H	177	C ₂₄ H ₂₇ N ₄ · 2 HCl · 1.5 H ₂ O	61 ± 10
4f		H	206	C ₂₄ H ₂₇ N ₄ · 2 HCl · 3 H ₂ O	440 ± 42

Tabla 3. Primer tipo de modificación para la obtención de derivados de aminopiridazinas.⁵⁰

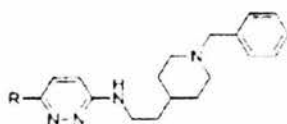
- La segunda, fue introducir un puente de metileno entre el C-5 de la piridazina y el grupo fenilo, dando una serie de análogos tricíclicos (tabla 4).



Compnd	n	Mp, °C ^a	Formula	IC ₅₀ (nM) ^b
1	0	268	C ₂₄ H ₂₇ N ₄ · 2 HCl · H ₂ O	120 ± 10
4g	1	dec	C ₂₇ H ₂₉ N ₄ · 2 HCl · 1.5 H ₂ O	10 ± 3
4h	2	270	C ₂₉ H ₃₁ N ₄ · 2 HCl · 2 H ₂ O	39 ± 5
4i		269	C ₂₆ H ₂₄ N ₄ · 2 HCl · 3.5 H ₂ O	22 ± 3
4j	3	160	C ₂₇ H ₂₇ N ₄ · 2 HCl · H ₂ O	22 ± 2

Tabla 4. Segundo tipo de modificación para la obtención de derivados de aminopiridazinas.⁵⁰

- La tercera, fue el reemplazar el grupo fenilo por un sustituyentes no aromático y aromáticos previamente estudiados (tabla 5).

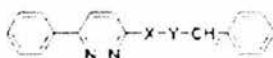


Compnd	R	Mp, °C ^a	Formula	IC ₅₀ (nM) ^b
1	Ph	268	C ₂₄ H ₂₇ N ₄ · 2 HCl · H ₂ O	120 ± 10
4k	H	129	C ₁₃ H ₁₄ N ₄ · 2 HCl · 1.5 H ₂ O	240 ± 10
5	Cl	dec	C ₁₁ H ₉ ClN ₄ · 2 HCl · H ₂ O	73 ± 4
7	MeO	129	C ₁₆ H ₁₉ N ₄ O · 2 HCl · 2 H ₂ O	220 ± 10
6a^d	2-Me-Ph	95	C ₂₇ H ₂₉ N ₄ · 2 HCl · H ₂ O	96 ± 5
6b	2-Ft-Ph	115	C ₂₇ H ₂₉ N ₄ · 2 HCl · 2.5 H ₂ O	87 ± 7
6c^d	2,4,6-(Me) ₃ -Ph	dec	C ₂₇ H ₂₉ N ₄ · 2 HCl · 1.5 H ₂ O	3 000 ± 200
6d^d	2-MeO-Ph	128	C ₂₇ H ₂₉ N ₄ O · 2 HCl · 3 H ₂ O	110 ± 10

6c	2-Cl-Ph	153	C ₁₄ H ₁₂ ClN ₄ · 2HCl · 2.5 H ₂ O	80 ± 6
6f^d	3,5-(CF ₃) ₂ -Ph	220	C ₂₃ H ₉ N ₄ F ₆ · 2 HCl	56 ± 3
6g^d	2-naphthyl	205	C ₂₃ H ₁₇ N ₄ · 2 HCl · 1.25 H ₂ O	56 ± 10
6h	3-AcNH-Ph	236	C ₂₂ H ₁₉ N ₄ O · 2 HCl · 1.5 H ₂ O	58 ± 2
6i	3-Ac-Ph	243	C ₂₂ H ₁₇ N ₄ O · 2 HCl · H ₂ O	54 ± 4
6j	3,4-OCH ₂ O-Ph	279	C ₂₃ H ₂₃ N ₄ O ₂ · 2 HCl · H ₂ O	73 ± 3
6k	4-CN-Ph	247	C ₂₃ H ₁₂ N ₄ · 2 HCl · 1.75 H ₂ O	100 ± 13
6l	4-F-Ph	253	C ₂₄ H ₁₇ FN ₄ · 2 HCl · 0.5 H ₂ O	350 ± 30
6m	4-(NMe ₂)-Ph	145	C ₂₇ H ₂₇ N ₄ · 3 HCl · 3.5 H ₂ O	210 ± 10
6n	2-thiophenyl	227	C ₁₂ H ₇ N ₄ S · 2 HCl · 2 H ₂ O	97 ± 3
6o	3-pyridinyl	131	C ₂₁ H ₁₇ N ₅ · 3 HCl · 3 H ₂ O	57 ± 4

Tabla 5. Tercer tipo de modificación para la obtención de derivados de aminopiridazinas.⁵⁰

- La cuarta, fue cambiar la cadena de la bencilpiperidinil-etilamina por otros análogos (tabla 6).

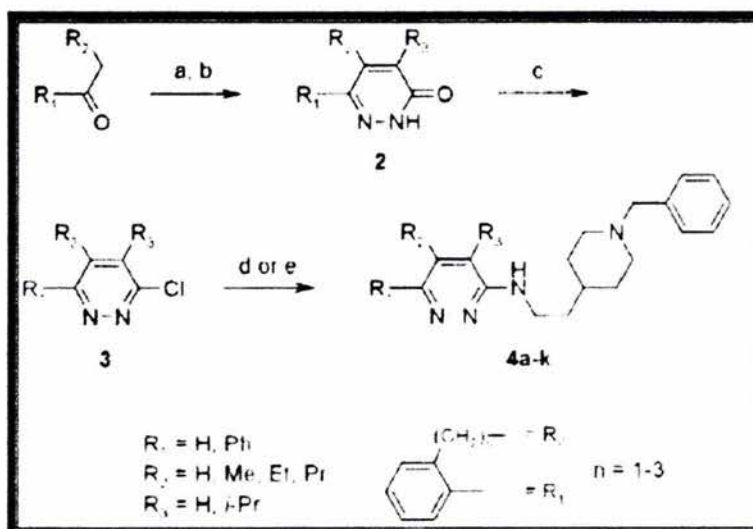


Compnd	X	Y	Mp (°C)	Formula	IC ₅₀ (µM) ^a
1	NHCH ₂ CH ₂		208	C ₂₄ H ₂₅ N ₄ · 2 HCl · H ₂ O	0.12 ± 0.01
10	OCH ₂ CH ₂		155	C ₂₃ H ₂₇ N ₄ O · 2 HCl · 0.5 H ₂ O	0.14 ± 0.02
12	SCH ₂ CH ₂		210	C ₂₃ H ₂₇ N ₄ S · 2 HCl	0.083 ± 0.003
14a	NHCOCH ₂		117	C ₂₄ H ₂₇ N ₄ O · 2 HCl · 5 H ₂ O	4.7 ± 1.6
16a	NHCH ₂ CH ₂		263	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ · 3 HCl · H ₂ O	1.5 ± 0.1
14b	NHCOCH ₂		231	C ₂₃ H ₂₇ N ₄ O · 2 HCl · 2 H ₂ O	17 ± 2
18a	NHCH ₂ CO		225	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O · 2 HCl · 3.5 H ₂ O	15 ± 1
16b	NHCH ₂ CH ₂		186	C ₂₄ H ₂₇ N ₄ · 2 HCl · 1.5 H ₂ O	24 ± 1
14c	NHCOCH ₂		234	C ₂₃ H ₂₅ N ₄ O · 2 HCl · 0.5 H ₂ O	18 ± 1
18b	NHCH ₂ CO		215	C ₂₄ H ₂₇ N ₄ O · HCl · 0.5 H ₂ O	120 ± 10

Tabla 6. Cuarto tipo de modificación para la obtención de derivados de aminopiridazinas.⁵⁰

2.6.1 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE PIRIDAZINAS COMO POTENCIALES IAcHe.

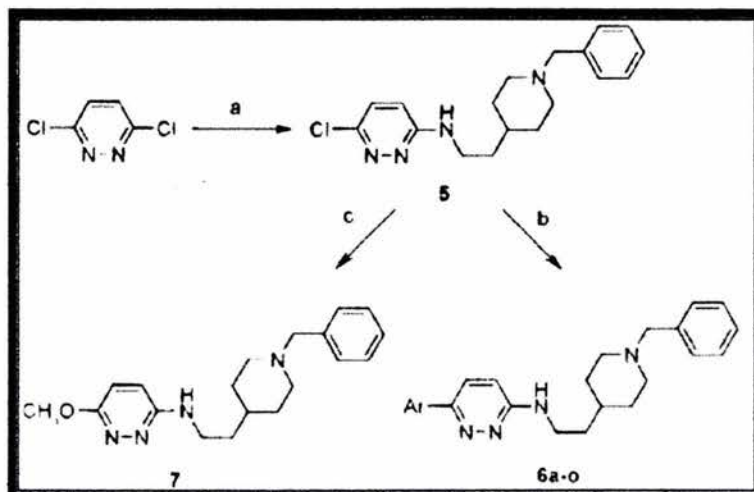
La serie sintética para la tabla 3 se realizó partiendo de un aldehído o cetona mediante una reacción de condensación con un ácido α -cetocarboxílico e hidrato de hidrazina para la obtención de la piridazinona; posteriormente se realizó la halogenación del carbonilo empleando oxiclورو de fósforo obteniendo así la 3-cloropiridazina correspondiente, por último se realizó la sustitución nucleofílica aromática sobre el anillo de la 3-cloropiridazina obteniendo el derivado correspondiente (esquema 1).⁵⁰



Reacciones y condiciones: (a) $R_3-CO-CO_2H$, ta; (b) $NH_2NH_2 \cdot H_2O$, reflujo; (c) $POCl_3$, $75^\circ C$; (d) 2-(1-bencilpiperidin-4-il)etilamina, NH_4Cl , $n-BuOH$, $130^\circ C$; (e) 2-(1-bencilpiperidin-4-il)etilamina, $100^\circ C$.

Esquema 1. Ruta sintética para la obtención de los derivados de piridazinas⁵⁰.

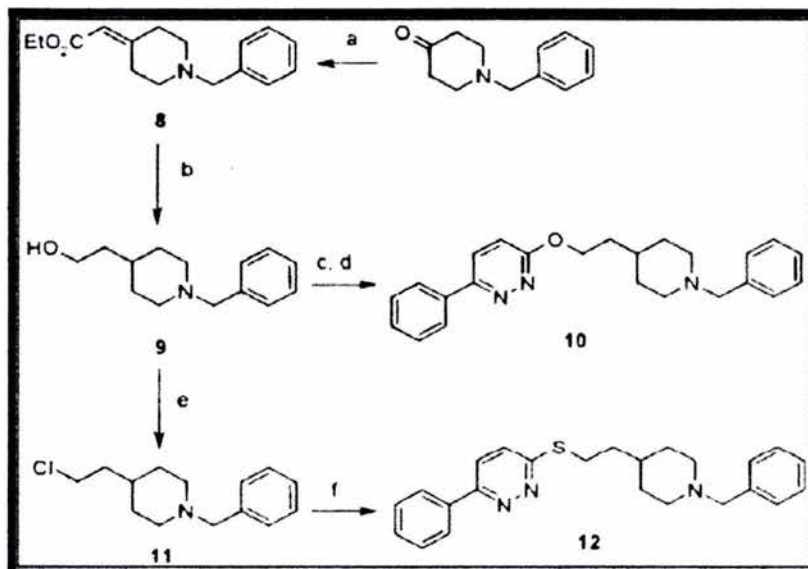
La serie sintética para la tabla 4 se realizó partiendo de la 3,6-dicloropiridazina y la 2-(1-bencilpiperidin-4-il)etilamina obteniendo el producto sustituido monoclorado, el cual posteriormente es tratado con dos distintos reactivos, el ácido acilborónico o bien el etóxido de sodio obteniendo así los derivados correspondientes (esquema 2).⁵⁰



Reacciones y condiciones: (a) 2-(1-bencilpiperidin-4-il)etilamina, HCl/H₂O/Acetona, 100°C; (b) ArB(OH)₂, base, disolvente, 100°C; (c) MeONa, DMF, 130 °C.

Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de los derivados de piridazinas.⁵⁰

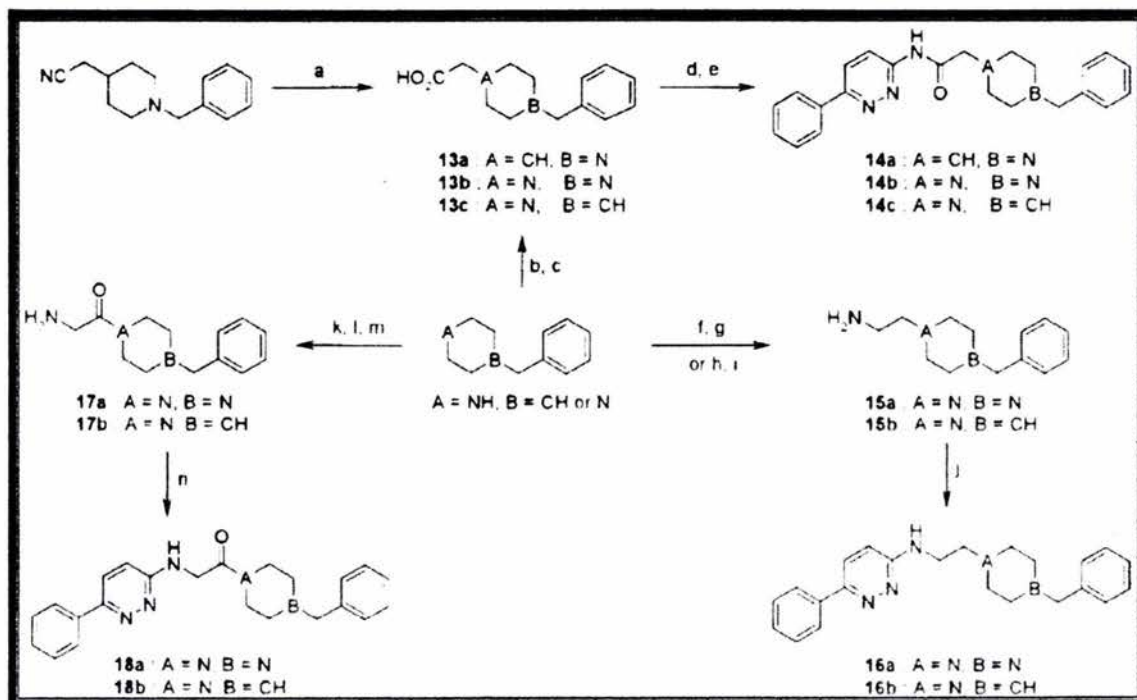
La serie sintética para la tabla 5 se realizó partiendo de 1-bencil-4-piperidona y trietil fosfonoacetato obteniendo así el 1-bencil-4-[(etoxicarbonil)metil-en]piperidina; realizando posteriormente una reducción hasta obtener el 1-bencil-4-(2-hidroxietil) piperidina que funcionaría como intermediario de la reacción para la obtención de los productos finales (esquema 3).⁵⁰



Reacciones y condiciones: (a) $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, THF, K_2CO_3 ; (b) LiAlH_4 , THF, reflujo; (c) Na, THF; (d) 3-cloro-6-fenilpiridazina, reflujo; (e) SOCl_2 , CH_2Cl_2 , reflujo; (f) 6-fenil-3-tiolpiridazina, EtONa , EtOH, reflujo.

Esquema 3. Ruta sintética para la obtención de los derivados de piridazinas.⁵⁰

La serie sintética para la tabla 6 se realizó partiendo de una mezcla de 2-(1-bencilpiperidin-4-il)acetonitrilo con hidróxido de sodio 1M, posteriormente el producto de reacción se trató con cloruro de oxalilo y 3-amino-6-fenilpiridazina, los compuestos sucesivos se sintetizaron a partir de la 2-(1-bencilpiperidin-4-il)etilamina o bien de la carboxiamina correspondiente (esquema 4).⁵⁰



Reacciones y condiciones: (a) NaOH, EtOH, reflujo; (b) $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, TEA, reflujo; (c) NaOH, EtOH, reflujo; (d) $(\text{COCl}_2)_2$, ta; (e) 3-amino-6-fenilpiridazina, CH_2Cl_2 , TEA, ta; (f) NCCH_2Cl , K_2CO_3 , reflujo; (g) LiAlH_4 , THF, ta; (h) N-bromoetilftalamida, xileno, 130°C ; (i) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, reflujo; (j) 3-cloro-6-fenilpiridazina, NH_4Cl , n-BuOH, 130°C ; (k) ClCH_2COCl , CH_2Cl_2 , reflujo; (l) ftalamida potásica, DMF, ta; (m) $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, Δ ; (n) 3-cloro-6-fenilpiridazina, piridina, reflujo.

Esquema 4. Ruta sintética para la obtención de los derivados de piridazinas.⁵⁰

3. OBJETIVOS

Objetivo general

- Realizar la síntesis de cuatro distintos derivados de la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina como potenciales inhibidores de la acetilcolinesterasa para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y evaluar su potencial actividad biológica mediante modelaje molecular.

Objetivos particulares

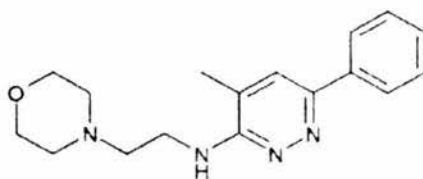
- Realizar la síntesis de cuatro derivados de la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina:
 - 6-fenil-3-(3'-furanmetoxi)-5-metilpiridazina
 - 6-fenil-3-(1'-(2"-hidroxietil)pirrolidin)-5-metilpiridazina
 - 6-fenil-3-hidrazino-5-metilpiridazina
 - 3-amino-N-(tiazol-2-il)-6-fenil-5-metilpiridazina
- Emplear el modelaje molecular mediante el programa HyperChem para realizar un estudio de acoplamiento utilizando el método de mecánica molecular (MM+) y el método semi-empírico AM-1 y PM-3 para minimizar las estructuras sintetizadas sobre el sitio periférico de la colinesterasa, evaluando así su potencial actividad como inhibidores de la acetilcolinesterasa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad existe un estimado de 37 millones de personas a nivel mundial con la enfermedad de Alzheimer, de las cuales el 6% de la población mundial son mujeres y el 5% de la población mundial son hombres (fuente OMS, 2004), por lo cual es esencial continuar el proceso de investigación el cual permita desarrollar nuevos y potentes fármacos para el tratamiento de este padecimiento.

El uso que se les da a los inhibidores de la colinesterasa es muy amplio, debido a que se cree que estos actúan previniendo la formación de las placas β -amiloides, además de incrementar los niveles de acetilcolina en el cerebro al inhibir a la AChE.

En la literatura se encuentra descrito que ciertos derivados de la piridazina han mostrado ser inhibidores hasta 60 000 veces más potentes comparados con la minaprina¹ (figura 17), razón por la cuál se decidió realizar la síntesis de cuatro derivados de la piridazina efectuando cambios estructurales en el sustituyente en posición 3 al introducir grupos de mayor polaridad con la finalidad de incrementar las interacciones de carácter polar, principalmente la formación de puentes de hidrógeno entre el potencial inhibidor y los residuos ubicados tanto en el sitio activo como en el sitio periférico de la colinesterasa. Además se evaluó su potencial actividad inhibitoria mediante la interacción con el sitio periférico de la AChE empleando modelaje molecular.



Minaprine

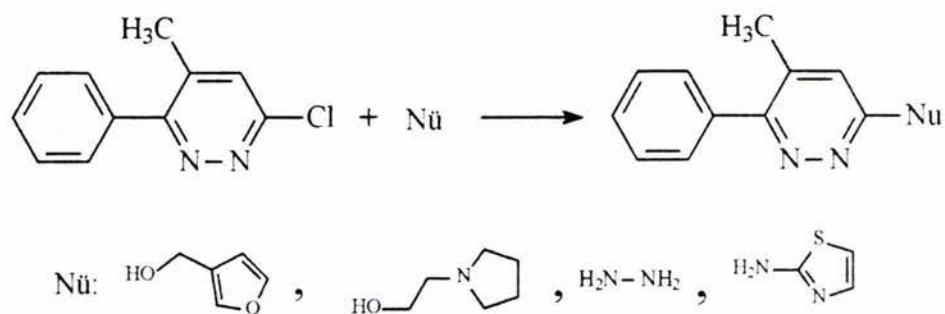
Figura 17

El estudio computacional en el cual se acopló cada uno de los derivados sintetizados con la AChE se realizó empleando la estructura cristalina de *T. californica* acomplejada con decametonio la cual fue obtenida del Brookhaven Protein Database.

En la literatura⁴⁷ se han encontrado estudios de modelaje molecular con la estructura de la acetilcolinesterasa y diversas moléculas inhibidoras; Sippl *et. al.* realizaron estudios de modelaje molecular empleando a la AChE con el decametonio como modelo de partida para acoplar a los inhibidores de prueba; por lo que en el presente trabajo se tomo la estructura tridimensional del complejo AChE-decimetonio y mediante el programa HyperChem se minimizaron las estructuras de los compuestos obtenidos empleando el método de mecánica molecular (MM+) para encontrar el confórmero de menor energía, posteriormente se utilizó el método de optimización de la geometría (AM1 y PM3) tomando como estructura base al decametonio dentro del sitio periférico de la colinesterasa y así encontrar la conformación de mínima energía, para determinar la probable formación de puentes de hidrógeno entre los residuos de Tyr y la molécula insertada, se tomaron en cuenta las distancias de interacción (en Å) entre los átomos de hidrógeno del hidroxilo de la Tyr y los átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre para los sustituyentes de las moléculas sintetizadas.

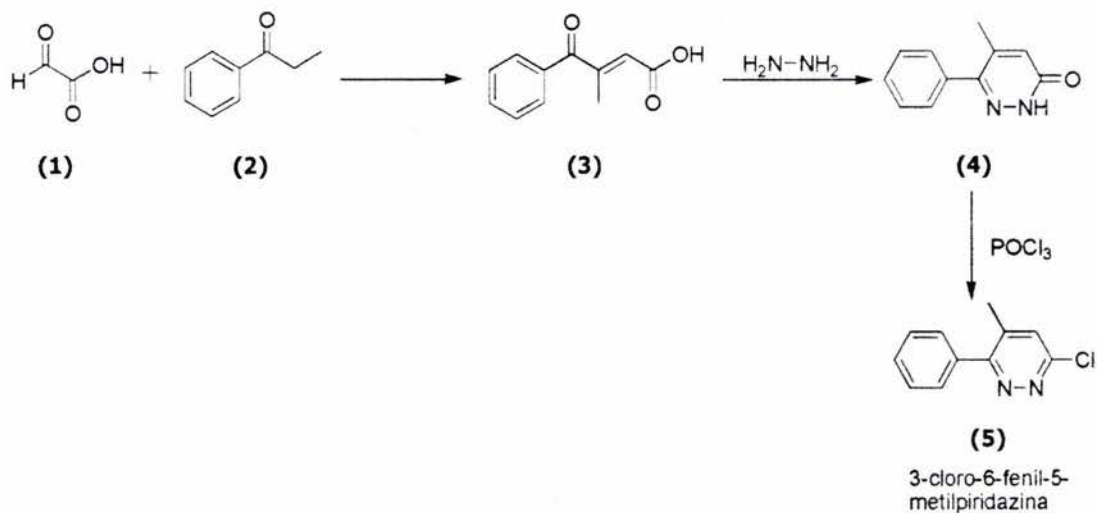
4.1 SÍNTESIS DE LA 3-CLORO-6-FENIL-5-METILPIRIDAZINA

En la estrategia de síntesis propuesta para preparar los derivados de la piridazina, existe un intermediario común llamado 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina, el cual al poseer un sitio electrofílico unido a un buen grupo saliente posibilita la interacción con distintos nucleófilos formando así los derivados (esquema 5).



Esquema 5

La preparación de la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina (5) se realizó mediante la ruta que se muestra en el esquema 6.



Esquema 6

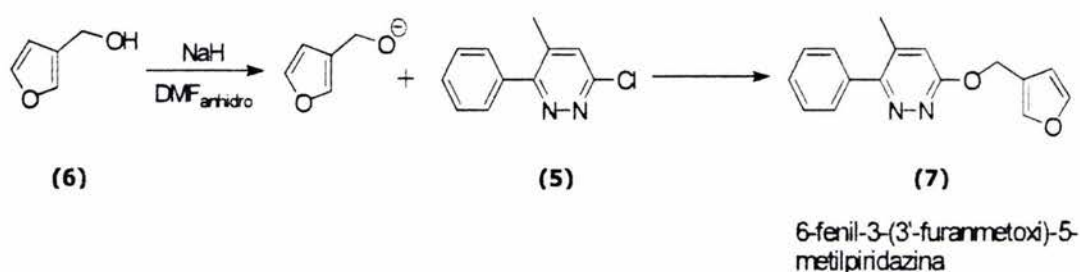
La etapa inicial de este proceso consiste en preparar el compuesto 1,4-dicarbonílico mediante una condensación aldólica entre el ácido glioxílico (1) y la propiofenona (2) formando el ácido 4-fenil-3-metil-4-oxo-2-butenóico (3) el cual se cicla al reaccionar con hidrazina generando la piridazinona (4). Cuando esta reacción se realiza empleando las mismas moles de ácido glioxílico e hidrazina, se obtiene la piridazinona con un rendimiento del 53%, sin embargo al adicionar un exceso del 50% y manteniendo el pH básico mejora notablemente el rendimiento obteniendo así un 72% de la 6-fenil-5-metil-3(2H)-piridazinona; estas condiciones ayudan a desplazar el equilibrio hacia la derecha, además a $\text{pH} \approx 9$ se asegura una concentración suficiente de amina libre.

Posteriormente la 6-fenil-5-metil-3(2H)-piridazinona se trata con oxiclورو de fósforo de acuerdo a la técnica empleada por Lam,⁵¹ en la cual se describe la reacción de halogenación de piridazinas mediante una reacción de Vilsmeier-Haack; aunque esta reacción se usa comúnmente para formular anillos aromáticos, en el caso de la piridazinona lleva a cabo una halogenación en la posición donde se ubica el oxígeno del carbonilo.

El curso de la reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina. Se determinó que empleando un exceso de 5 moles de oxiclورو de fósforo por cada mol de 3(2H)-piridazinona se obtiene el mejor rendimiento que fue del 86%.

4.2 SÍNTESIS DE LA 6-FENIL-3-(3'-FURANMETOXI)-5-METILPIRIDAZINA

Una vez realizada la síntesis del intermediario 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina, se llevó a cabo la segunda etapa que conduce a uno de los productos finales, el cual se realizó conforme a la ruta sintética que se muestra en el esquema 7.

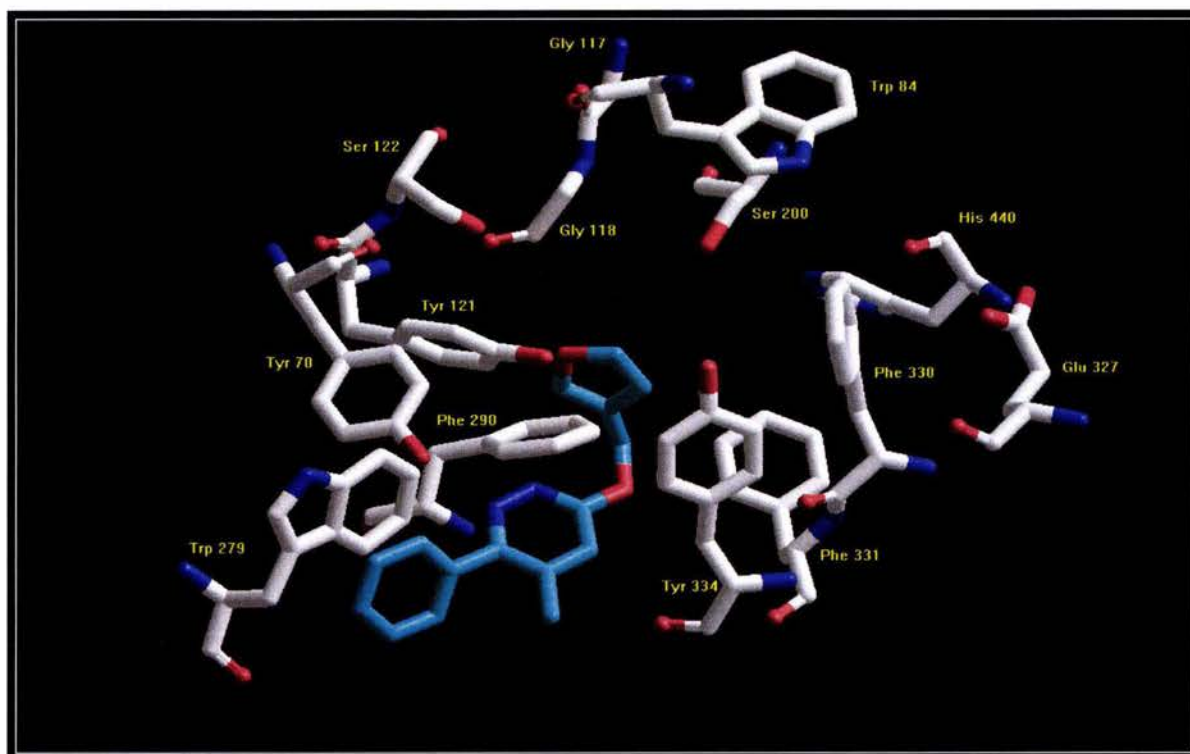


Esquema 7

La técnica empleada en la síntesis fue una adaptación de la técnica realizada por Contreras.⁵⁰

La reacción del 3-(hidroximetil)-furano (6) con hidruro de sodio da lugar a la formación del alcóxido correspondiente, el cual actúa como nucleófilo, posteriormente se agrega el reactivo electrofílico 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina (5), la reacción fue seguida por cromatografía en capa fina con la finalidad de determinar el tiempo necesario para que se efectúe la sustitución nucleofílica el cual fue de 48 horas, obteniendo un rendimiento de 47%.

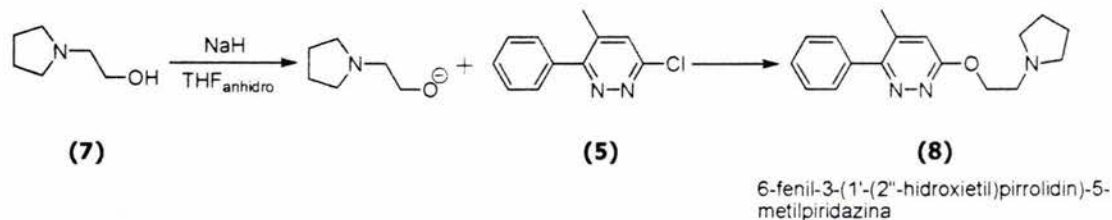
Mediante modelaje molecular se acopló el producto de síntesis en el sitio periférico de la AChE para predecir su actividad farmacológica (figura 18).

**Figura 18**

En la figura anterior se observa cómo la parte de la fenilpiridazina interacciona con dos residuos aromáticos Trp279 y Tyr70, ocurriendo una interacción de tipo π - π entre los anillos aromáticos aunque no sean coplanares. Por otro lado se observa la probable formación de puentes de hidrógeno entre el par de electrones del oxígeno del furano y el hidroxilo de la Tyr121 (1.02856 Å), además de una interacción de la nube π del furano y la parte aromática de la Tyr334.

4.3 SÍNTESIS DE LA 6-FENIL-3-(1'-(2''-HIDROXIETIL)PIRROLIDIN)-5-METILPIRIDAZINA

Respecto a la síntesis de la 6-fenil-3-(1'-(2''-hidroxietil)pirrolidin)-5-metilpiridazina se empleó una técnica similar a la del 6-fenil-3-(3'-furanmetoxi)-5-metilpiridazina, en la cual se modificó el disolvente, utilizando tetrahidrofurano (THF) y se realizó conforme a la ruta sintética mostrada en el esquema 8.



La reacción de la 1-(2'-hidroxietil)-pirrolidina (7) con hidruro de sodio da lugar a la formación de 2-pirrolidinetóxido de sodio que actúa como nucleófilo, posteriormente se adiciona la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina (5), obteniendo un rendimiento del 84%, en este caso se obtuvo un producto no cristalino, es un aceite de color amarillo claro y olor característico. Se diseñó y sintetizó el compuesto anterior para evaluar su potencial actividad farmacológica como inhibidor reversible, esto es debido a las posibles interacciones que presenta con el sitio periférico de la colinesterasa (figura 19).

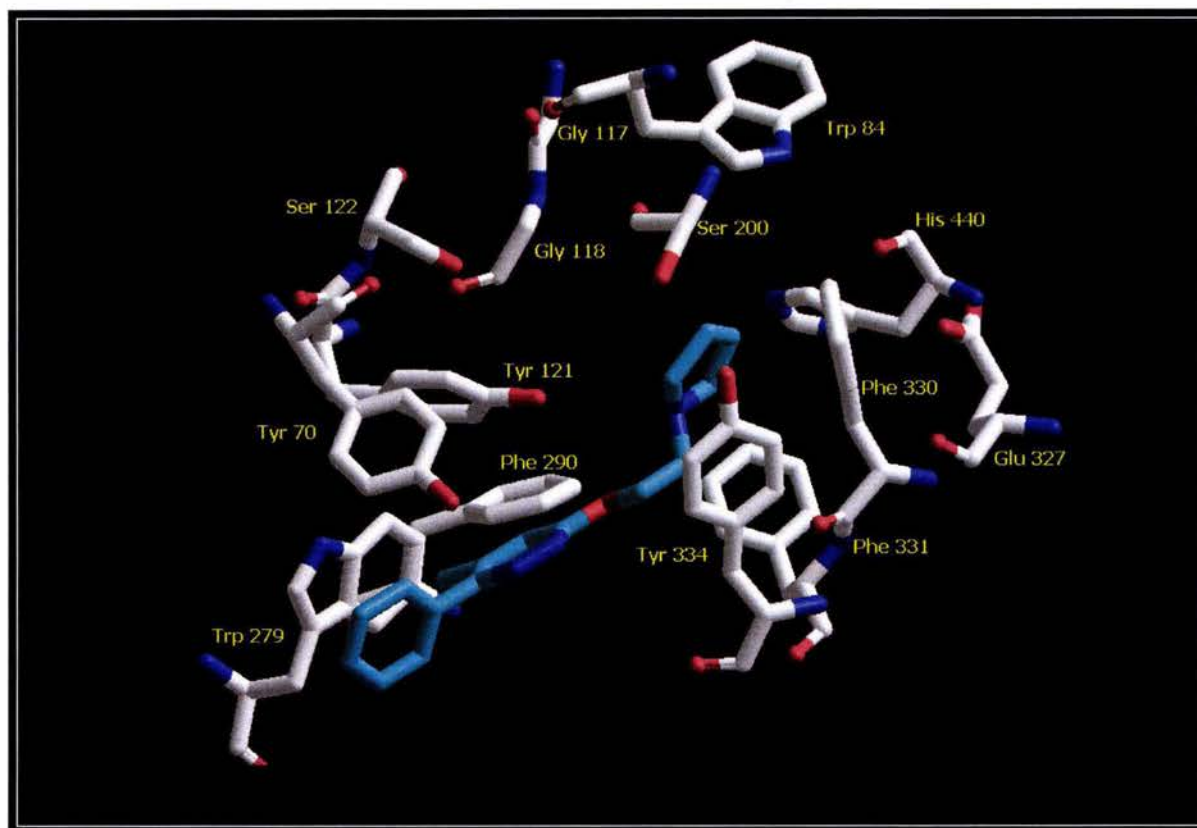


Figura 19

En la figura anterior se observa como la parte de la fenilpiridazina interacciona con dos residuos aromáticos que son el Trp279 y la Tyr70, ocurriendo una interacción de tipo π - π entre los anillos aromáticos aunque no sean coplanares. También se aprecia la probable formación de puentes de hidrógeno entre el par de electrones de los nitrógenos de la piridazina y el hidroxilo de la Tyr70, aunque esta interacción puede ser débil debido a que existe una distancia de 2.1102 Å, además de otra interacción por puentes de hidrógeno entre el nitrógeno de la pirrolidina que tiene más expuestos sus electrones debido a su conformación en el espacio y el hidroxilo de la Tyr121 (1.1102 Å), por otro lado también se observa una probable interacción entre el hidroxilo de la Tyr121 y el oxígeno que se encuentra como sustituyente ubicado en la posición 3 de la piridazina

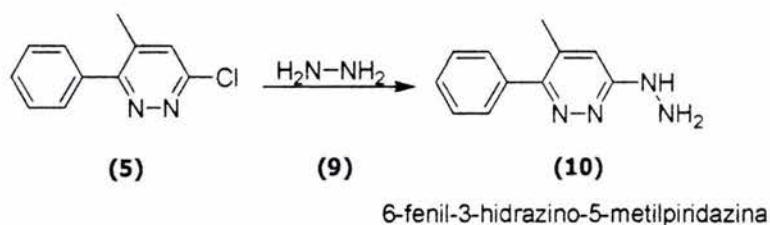
(1.15653 Å); el residuo de Phe290 se observa que tiene interacción coplanar con el anillo de la piridazina.

Lo que se puede apreciar claramente en esta estructura es que el número de interacciones en el sitio periférico es mayor comparado con el de las demás estructuras, esto le podría dar la característica al derivado formado de permanecer más tiempo unido al sitio periférico de la colinesterasa y con esto prolongar su actividad inhibitoria en la formación de placas β -amiloides y disminuir la velocidad de hidrólisis de la acetilcolina.

4.4 SÍNTESIS DE LA 6-FENIL-3-HIDRAZINO-5-METIL PIRIDAZINA

En la estrategia de síntesis propuesta para preparar los derivados de la piridazina, se incluyó a la 6-fenil-3-hidrazino-5-metilpiridazina (10) debido a que el grupo hidrazino ubicado en la posición 3, le confiere propiedades bloqueadoras β -adrenérgicas y actividad vasodilatadora,⁵¹ además porque se ha observado que moléculas similares tienen propiedades inhibitorias de la colinesterasa.

La preparación de la 6-fenil-3-hidrazino-5-metilpiridazina se realizó mediante la reacción de la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina (5) e hidrazina (9) (esquema 9).



Esquema 9

La técnica empleada por Pifferi,⁵³ Coates⁵⁴ y Steiner,⁵⁵ fue modificada para llevar a cabo dicha reacción, en la cual se varió el tiempo de reacción disminuyendo de 3 a 1 hora. La cantidad de hidrazina empleada se redujo de un exceso de 70 mmol de hidrazina por cada mmol de 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina a un exceso de 60 mmol de hidrazina. En esta reacción de solvólisis se obtuvo un 76% de rendimiento. El producto es un sólido cristalino en forma de agujas de color amarillo claro y con un p.f. = 121-121.5°C.

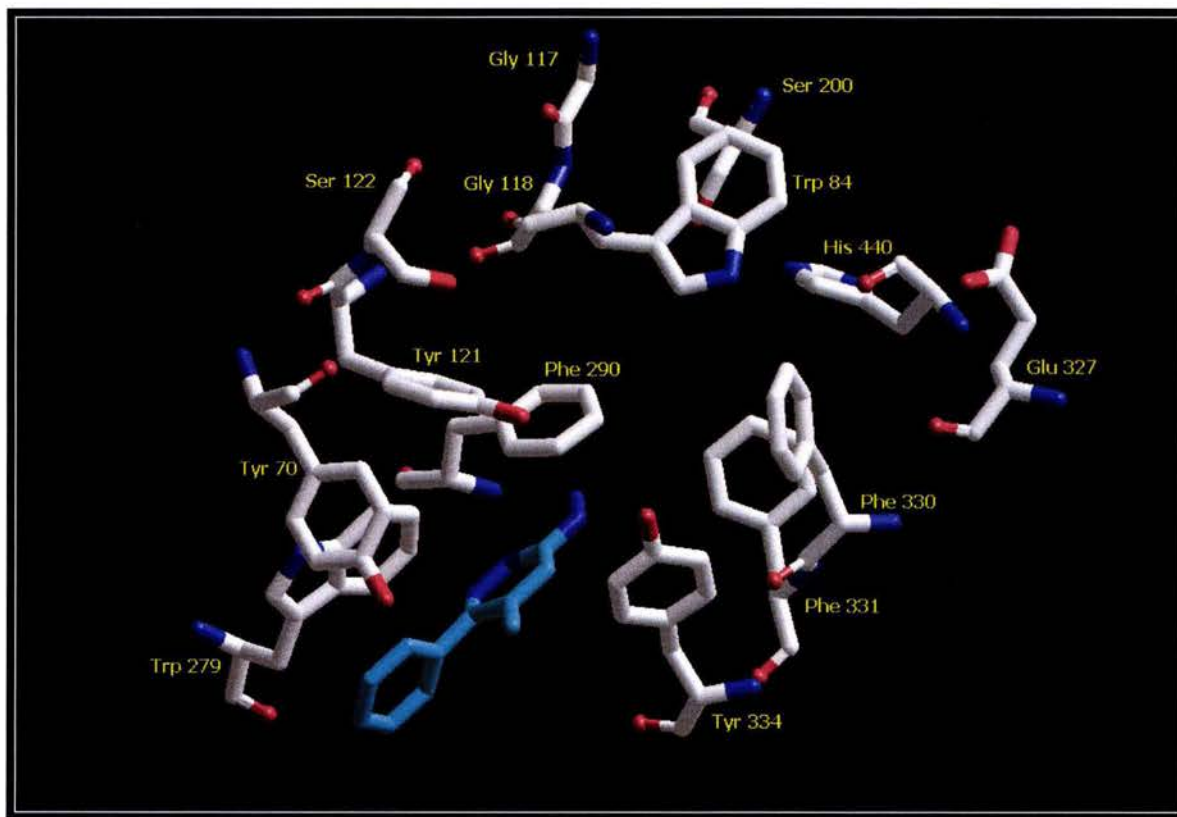


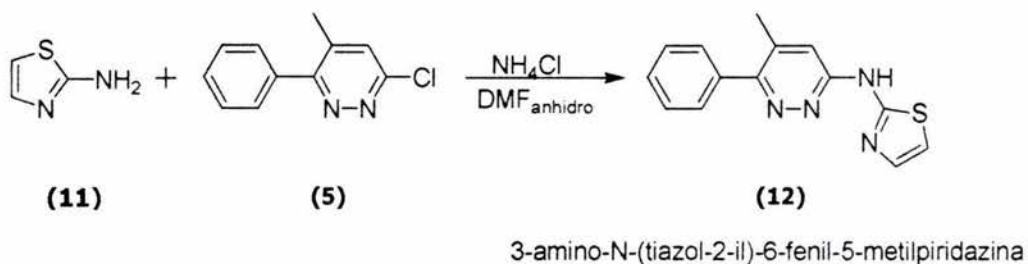
Figura 20

En la figura anterior se observa cómo la parte de la fenilpiridazina interacciona con dos residuos aromáticos que son el Trp279 y la Tyr70, ocurriendo una interacción de tipo π - π entre los anillos aromáticos aunque no sean coplanares. Se aprecia una interacción por puentes de hidrógeno entre el nitrógeno de la hidrazina y el hidroxilo de la Tyr121, esta interacción podría ser ligeramente débil debido a la distancia de 1.60894 Å que existe entre estos dos átomos, por otro lado también se observa una probable interacción entre el hidroxilo de la Tyr121 y el nitrógeno adyacente al carbono 3 de la piridazina (1.2001 Å).

Lo que se aprecia en esta imagen, es que el número de interacciones en el sitio periférico es menor comparado con el anterior, esto le podría dar la característica de ser menos estable dentro del sitio periférico de la colinesterasa, sin embargo no se descarta su posible actividad inhibitoria, es decir, que tenga una actividad prolongada en comparación con el diseño anterior.

4.5 SÍNTESIS DE LA 3-AMINO-N-(TIAZOL-2-IL)-6-FENIL-5-METILPIRIDAZINA

La síntesis del 3-amino-N-(tiazol-2-il)-6-fenil-5-metilpiridazina, se probó empleando catálisis ácida; se hizo reaccionar la cloropiridazina con el 2-aminotiazol en presencia de NH_4Cl y DMF como disolvente (esquema 10).



Esquema 10

El producto en estas condiciones de reacción es el 3-amino-6-fenil-N,N,5-trimetilpiridazina (figura 21), estructuralmente distinto al producto esperado, lo cual demuestra la participación de la DMF como disolvente y también como intermediario para la formación del nucleófilo en el proceso de transformación.

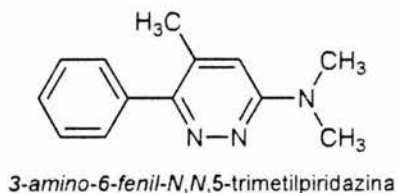
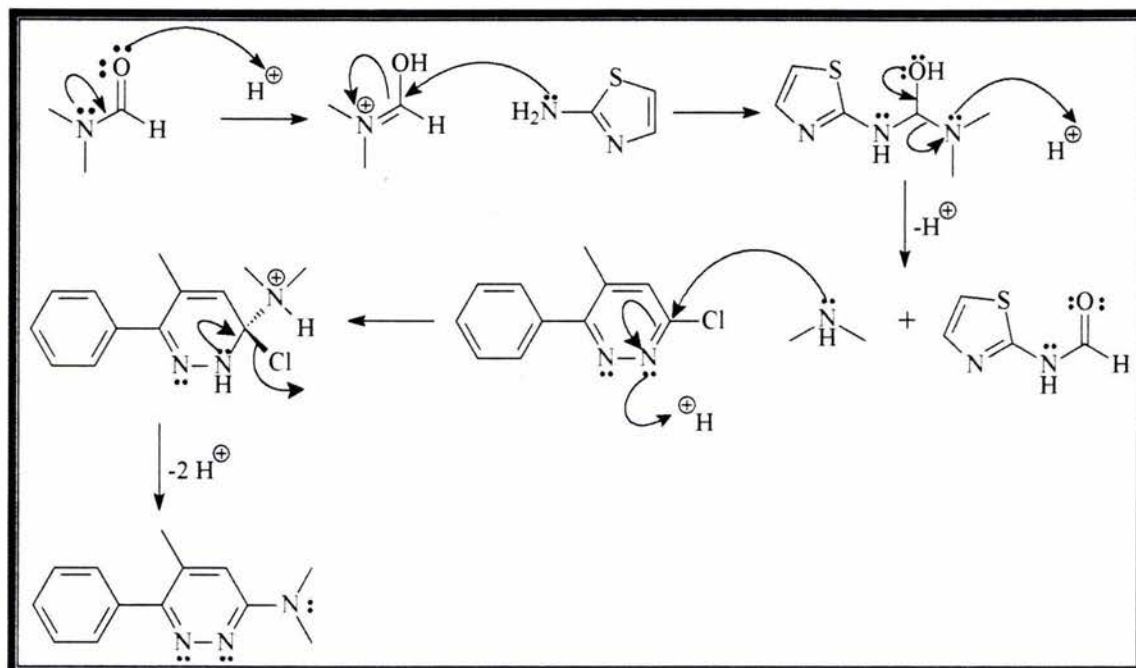


Figura 21

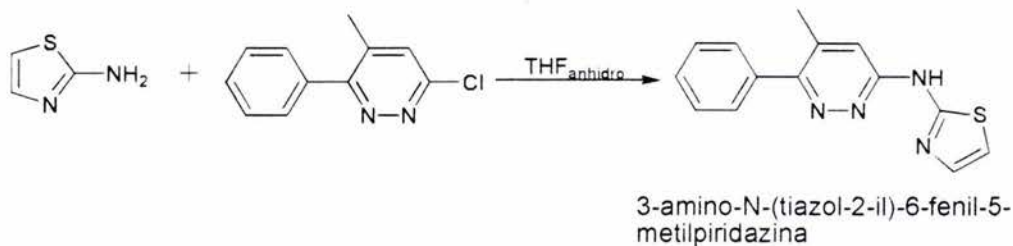
A continuación se propone un mecanismo de reacción para la formación del 3-amino-6-fenil-N,N,5-trimetilpiridazina y así tratar de explicar cómo ocurrió esta transformación.



Esquema 11. Posible mecanismo ocurrido durante la reacción.

El producto, 3-amino-6-fenil-N,N,5-trimetilpiridazina se obtuvo como un cristal amarillo amorfo con un 45% de rendimiento.

En una segunda variante para la síntesis del 3-amino-N-(tiazol-2-il)-6-fenil-5-metilpiridazina. Se decidió cambiar el disolvente, puesto que era la dimetilformamida la que estaba reaccionando con el 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina. Se decidió emplear tetrahidrofurano seco (esquema 12).



Esquema 12

En este caso de igual manera que en el caso anterior se siguió la reacción por cromatografía en capa fina y no se observó transformación alguna, por lo que se presume que el disolvente no alcanza una temperatura de ebullición lo suficientemente alta para que se efectúe la reacción.

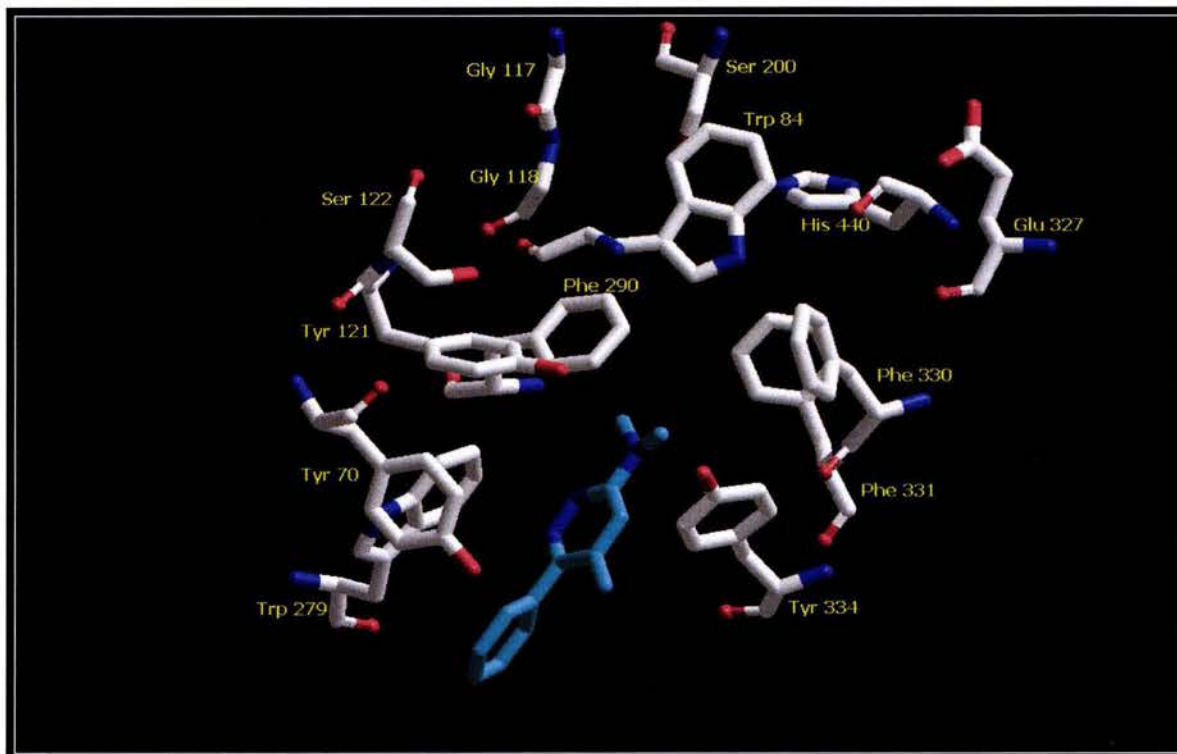


Figura 22

En la figura anterior se observa que al igual que en las moléculas anteriores la parte de la fenilpiridazina interacciona con dos residuos aromáticos que son el Trp279 y la Tyr70, ocurriendo una interacción de tipo π - π entre los anillos aromáticos aunque no sean coplanares. Se observa una probable interacción por puentes de hidrógeno entre el nitrógeno del sustituyente N,N-dimetilamino y el hidroxilo de la Tyr334 (1.49901 Å), además del hidroxilo de la Tyr121, el cual también podría interactuar con el nitrógeno formando puentes de hidrógeno (1.23008 Å).

En esta imagen se advierte que el número de interacciones en el sitio periférico no es cuantiosa, además, estas interacciones pueden variar en el caso de existir un rearrreglo de la 3-amino-6-fenil-N,N,5-trimetilpiridazina dentro del sitio periférico de la colinesterasa, con esto no se descarta su posible actividad inhibitoria, es decir, su arreglo dentro del sitio periférico va a depender de su estabilidad y por consecuencia la duración de su actividad inhibitoria.

Una vez realizado el análisis estructural de la 3-amino-6-fenil-N,N,5-trimetilpiridazina, se muestra en la figura 22, la potencial actividad del 3-amino-N-(tiazol-2-il)-6-fenil-5-metilpiridazina, aunque no se logró realizar su síntesis por los motivos expuestos anteriormente se presenta la razón por la cual es de interés esta molécula para su síntesis como un potencial inhibidor de la colinesterasa.

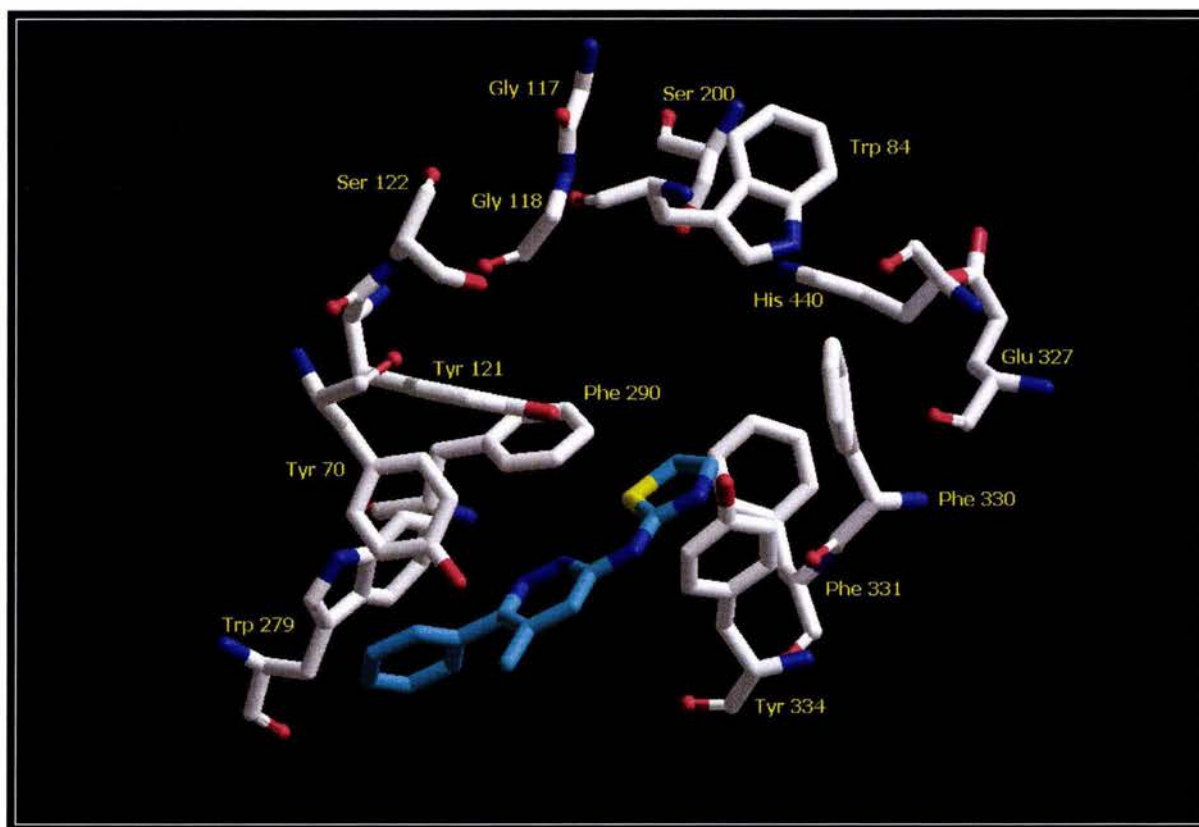


Figura 23

En la presente imagen se observa que la parte de la fenilpiridazina interacciona con un residuo aromáticos que es el Trp279, ocurriendo una interacción de tipo π - π entre los anillos aromáticos aunque no sean coplanares, además de otra interacción por puentes de hidrógeno entre el azufre del aminotiazol que tiene más expuestos sus electrones por su conformación en el espacio y el hidroxilo de la Tyr121 (1.36809 Å), por otro lado también se observa una probable interacción entre el hidroxilo de la Tyr334 y el nitrógeno del aminotiazol aunque esta interacción podría ser débil debido a que presenta una distancia de enlace de 1.76329 Å; por otra parte el residuo de Phe290 se observa que interacciona de manera coplanar con el anillo del aminotiazol.

Lo que se aprecia finalmente es que la 3-amino-N-(tiazol-2-il)-6-fenil-5-metilpiridazina presenta numerosas interacciones en el sitio periférico de la AChE en comparación con los otros tres productos que se lograron preparar en el laboratorio.

5. PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión fueron determinados con un aparato Fischer y no están corregidos.

La cromatografía en capa fina se llevó a cabo con placas de aluminio recubiertas con gel de sílice G/UV 254 de la casa Alugram.

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro *Perkin Elmer de transformada de Fourier* (FTIR-1600). (Se reportan como cm^{-1}).

Los espectros de RMP así como los de carbono-13 fueron determinados en un espectrómetro *Varian Inova 300*. (δ =desplazamiento químico, ppm=partes por millón, J=constantes de acoplamiento, s=singulete, d=doblete, dd=doble de dobles, t=triplete, q=cuadruplete, m=multiplete).

Los espectros de masas fueron determinados por impacto electrónico en aparatos *JEOL-JMS-SX 102 A* y *Finningam Mat GCQ de trampa de iones*. (M^+ =ion molecular)

5.1 MÉTODO DE SÍNTESIS DE PIRIDAZINONAS

En un matraz bola de 250 mL provisto de agitación magnética, se coloca una mezcla de 2.485 g (27 mmol) de ácido glioxílico y 10.84 mL (81.5 mmol) de propiofenona la cual se calienta de 100-105 °C durante 2 horas; posteriormente se deja enfriar a 40°C y se adicionan 20 mL de agua seguido de hidróxido de amonio concentrado hasta obtener un pH de 10. La mezcla de reacción se extrae con hexano (4 x 25 mL). A la solución amoniacal se le adicionan 1.309 mL (27 mmol) de hidrazina hidratada, continuando con

agitación magnética y calentamiento a reflujo durante dos horas más. Después de enfriar, el precipitado formado se colecta por filtración y se lava con agua fría. El crudo de reacción obtenido se recristaliza de etanol.

6-fenil-5-metil-3(2H)-piridazinona

Se obtuvieron 3.645 g (72%) de un sólido blanco en forma de agujas con un p.f.= 213°C. **Espectro de IR** (KBr) (espectro 1), 3062 cm^{-1} (Ar C-H), 2100-1700 cm^{-1} (sobretonos monosustitución), 1669 cm^{-1} (N-C=O), 746 cm^{-1} y 702 cm^{-1} (confirmación monosustitución). **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm) (espectro 7). 2.1 (d, 3H, $J=0.9$, - CH_3), 6.8 (q, 1H, $J=0.9$ Piridazina C-H), 7.3-7.5 (m, 5H, Ar C-H), 7.6 (m, 1H, N-H).

5.2 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LA 3-CLORO-6-FENIL-5-METILPIRIDAZINA

En un matraz bola de 50 mL provisto de agitación magnética, se coloca una mezcla de 0.28 g (1.5 mmol) de 6-fenil-5-metil-3(2H)-piridazinona, 1.15 g (7.5 mmol) de oxiclورو de fósforo, 10 mL de DMF, y se calienta a $80 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 4 horas. El exceso de oxiclورو de fósforo se retira del matraz mediante una destilación a presión reducida. El matraz se coloca sobre hielo y se le adicionan aproximadamente 10 mL de agua helada, posteriormente se alcaliniza con hidróxido de sodio al 40% adicionando gota a gota hasta alcanzar un pH de 10. El sólido blanco obtenido se filtra, se lava con agua helada y se recristaliza de etanol.

3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina

Se obtuvieron 5.42 g (86%) de un sólido blanco en forma de agujas con un p.f.= 118-119 °C. **Espectro de IR** (KBr) (espectro2), Desaparición de la banda correspondiente al carbonilo. En 1561 cm^{-1} (N=C), 1110 cm^{-1} (C-Cl). **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm) (espectro 8). 2.4 (d, 3H, $J=0.9$, $-\text{CH}_3$), 7.42 (q, 1H, $J=0.9$, Piridazina C-H) y 7.4-7.5 (m, 5H, Ar C-H). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm) (espectro 13). Se detectaron nueve núcleos de los cuales en 129 los carbonos se encuentran orto al anillo aromático y en 128 los carbonos en meta, teniendo un total de 11 núcleos. **Espectrometría de masas** (espectro 18), peso molecular calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2\text{Cl}$, 204. M^+ 203, 100%.

5.3 MÉTODO DE SÍNTESIS DE LA 6-FENIL-3-(3'-FURANMETOXI)-5-METILPIRIDAZINA

En un matraz bola de 100 mL provisto de agitación magnética en atmósfera de nitrógeno, se colocan 0.20 g (6 mmol) de hidruro de sodio al cual se le adicionan 10 mL de dimetilformamida anhidra, posteriormente se le adiciona gota a gota 0.44 mL (5.1 mmol) de 3-furanmetanol y se mantiene con agitación magnética durante 1 hora. Posteriormente se agregan 1.04 g (5.1 mmol) de 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina previamente disuelta en 10 mL de dimetilformamida anhidra y se mantiene a reflujo durante 48 horas. La dimetilformamida se destila a presión reducida, al sobrante del matraz se le adicionan 10 mL de agua destilada y se lleva hasta pH de 10 con hidróxido de amonio concentrado. La extracción se realiza con acetato de etilo (3 x 30 mL). La fase orgánica se concentra en el rotavapor. El aceite obtenido se purifica mediante

cromatografía flash utilizando silica gel Si 60 (0.040-0.063 mm) como fase estacionaria y un sistema de elusión de Hexano: AcOEt (9:1).

6-fenil-3-(3'-furanmetoxi)-5-metilpiridazina

Se obtuvieron 0.71 g (47%) de un sólido cristalino café claro con p.f.= 66-68°C.

Espectro de IR (KBr) (espectro 3), Se aprecia la desaparición de la banda de la vibración C-Cl. En 1597 cm^{-1} (C=N), 1160 y 1349 cm^{-1} (CO-C, furano). **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm) (espectro 9). 2.3 (d, 3H, $J=0.9$, $-\text{CH}_3$), 5.49 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 6.56 (dd, 1H, $J=4.8$ y $J=0.3$, H-5 furano), 6.89 (dd, 1H, $J=0.9$, H-2 furano), 7.61 (s, 1H, furano), 7.4-7.58 (m, 6H, Piridazina C-H y Ar C-H). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm) (espectro 14). Se observa la presencia de 14 núcleos de los 16 carbonos de la 6-fenil-3-(3'-furanmetoxi)-5-metilpiridazina, ya que los dos carbonos en posición orto y los dos carbonos en posición meta se presentan como una señal respectivamente. **Espectrometría de masas** (espectro 19). El ion molecular (266) es el pico base.

5.4 MÉTODO DE SÍNTESIS DE LA 6-FENIL-3-(1'-(2''-HIDROXIETIL) PIRROLIDIN)-5-METILPIRIDAZINA

En un matraz bola de 100 mL provisto de agitación magnética en atmósfera de nitrógeno, se colocan 0.068 g (3 mmol) de hidruro de sodio y 15 mL de tetrahidrofurano anhidro, posteriormente se le adiciona gota a gota 0.34 mL (3 mmol) de 1-(2'-hidroxietil)pirrolidina y se mantiene agitando durante 45 minutos. Enseguida se adicionan 0.204 g (1 mmol) de 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina previamente disuelta en 15 mL de tetrahidrofurano anhidro, se calienta a reflujo durante 48 horas. Se concentra en

rotavapor y se añaden 10 mL de agua destilada, se lleva hasta pH 10 utilizando hidróxido de amonio concentrado. La extracción se realiza con acetato de etilo (3 x 10 mL). La fase orgánica se concentra en rotavapor. El aceite obtenido se purifica empleando una columna para cromatografía flash empacada con sílica gel Si 60 (0.040-0.063 mm) como fase estacionaria y un sistema de elusión de Hexano: AcOEt: MeOH (6:3:1).

6-fenil-3-(1'-(2''-hidroxietil)pirrolidin)-5-metilpiridazina

Se obtuvieron 0.236 g (84%) de un aceite amarillo claro. **Espectro de IR** (Película) (espectro 4), 1598 cm^{-1} (C=N), 1165 cm^{-1} (C-O-C). **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm) (espectro 10). 2.0 (m, 4H, Pirrolidina C-H), 2.3 (d, 3H, $J=0.9$, $-\text{CH}_3$), 3.0 (m, 4H, Pirrolidina C-H), 3.2 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}$), 4.9 (t, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-}$), 6.9 (d, 1H, $J=0.9$, Piridazina C-H), 7.4-7.5 (m, 5H, Ar C-H). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm) (espectro 15). Se observa la presencia de 13 núcleos de los 17 carbonos de la 6-fenil-3-(1'-(2''-hidroxietil)pirrolidin)-5-metilpiridazina, ya que los dos carbonos en posición orto y los dos carbonos en posición meta se presentan como una señal, asimismo los carbonos de las posiciones 2-5 y 3-4 se manifiestan de la misma manera.

5.5 MÉTODO DE SÍNTESIS DE LA 6-FENIL-3-HIDRAZINO-5-METILPIRIDAZINA

En un matraz bola de 100 mL provisto de agitación magnética, se colocan 0.204 g (1 mmol) de 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina y 3 mL de hidrato de hidrazina (60 mmol), se calienta a reflujo durante 1 hora. Se enfría y se le adiciona cloruro de metileno (15 mL), la

mezcla se extrae con agua (3 X 5 mL), la fase orgánica se seca con sulfato de sodio y se concentra empleando un rotavapor, quedando un producto sólido cristalino.

6-fenil-3-hidrazino-5-metilpiridazina

Se obtuvieron 0.22 g (76%) de un producto cristalino amarillo claro en forma de agujas con un p.f.=163-165 °C. **Espectro de IR** (KBr) (espectro 5), 3441 cm^{-1} (N-H₂), 1600 cm^{-1} (C=N), 3168-3450 y 702 cm^{-1} (-N-H₂). **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm) (espectro 11). 2.2 (s, 3H, -CH₃), 3.5 (brs, 3H, -NH-NH₂), 7.4 (s, 1H, Piridazina C-H) y 7.3 (s, 5H, Ar C-H). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm) (espectros 16). Se observa la presencia de 9 núcleos de los 11 carbonos de la 6-fenil-3-hidrazino-5-metilpiridazina, ya que los dos carbonos en posición orto y los dos carbonos en posición meta se presentan como una señal respectivamente. **Espectrometría de masas** (espectro 20) peso molecular calculado para C₁₁H₁₂N₄, 200. M⁺ 200, 100%.

5.6 MÉTODO DE SÍNTESIS DE LA 3-AMINO-N-(TIAZOL-2-IL)-6-FENIL-5-METILPIRIDAZINA

Técnica No.1

En un matraz bola de 100 mL provisto de agitación magnética y en atmósfera de nitrógeno, se adicionan 0.20 g (2 mmol) de 2-aminotiazol, 0.204 g (1 mmol) 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina y 0.05g (1 mmol) de cloruro de amonio, posteriormente se le agregan 25 mL de dimetilformamida anhidra, y se mantiene a reflujo por 48 horas. La dimetilformamida se destila a presión reducida, al sobrante del matraz se le adiciona gota

a gota hidróxido de amonio concentrado hasta pH de 10. Se realiza la extracción con acetato de etilo (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra en el rotavapor. El aceite obtenido se purifica empleando una columna para cromatografía flash utilizando silica gel Si 60 (0.040-0.063 mm) como fase estacionaria y un sistema de elusión de Hexano: AcOEt: CHCl₃ (5:4:1).

Se obtuvieron 95.85 mg (45%) de cristales amorfos de color amarillo con un P.f. 121-121.5°C. **Espectro de IR** (KBr) (Espectro 6), 3057 cm⁻¹ y 3028 cm⁻¹ (Ar C-H), 2854 cm⁻¹ y 2803 cm⁻¹ (C-H), 2000 a 1700 cm⁻¹ (sobretonos monosustitución), 1599 cm⁻¹ (N=C), 752 cm⁻¹ y los 698 cm⁻¹ (confirmación monosustitución). **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm) (Espectro 12). 2.3 (s, 3H, -CH₃), 3.2 (s, 6H, -N-(CH₃)₂), 6.7 (s, 1H, Piridazina C-H), 7.4 (m, 3H, Ar C-H) y 7.5 (m, 2H, Ar C-H). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm) (Espectro 17). Se observa la presencia de 10 núcleos lo que corresponde a los 13 carbonos presentes en la molécula puesto que los dos carbonos en posición orto y los dos carbonos en posición meta se presentan como una señal al igual que los dos carbonos de los metilos unidos al nitrógeno. **Espectrometría de masas** (Espectro 21) peso molecular calculado para C₁₃H₁₅N₃, 213. M⁺ 213, 100%.

Técnica No.2

En un matraz bola de 100 mL provisto de agitación magnética se adicionan 10 mL de tetrahidrofurano anhidro y 0.20 g (2 mmol) de 2-aminotiazol, posteriormente se agregan 0.204 g (1 mmol) de 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina previamente disuelta en 15 mL de tetrahidrofurano anhidro, se mantiene a reflujo durante 48 horas. Se concentra en rotavapor, al sobrante del matraz se le adiciona gota a gota hidróxido de amonio concentrado hasta pH de 10. Se realiza la extracción con acetato de etilo (3 x 10 mL). La

fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra en rotavapor. El aceite obtenido se purifica empleando una columna para cromatografía flash utilizando silica gel Si 60 (0.040-0.063 mm) como fase estacionaria y un sistema de elusión de Hexano: AcOEt (65:35).

No hubo transformación.

6. CONCLUSIONES

- ✿ Se llevó a cabo la síntesis de cuatro derivados de la 3-cloro-6-fenil-5-metilpiridazina los cuales se obtuvieron con buenos rendimientos.
- ✿ El derivado 6-fenil-3-(3'-furanmetoxi)-5-metilpiridazina, podría funcionar como inhibidor de la AChE debido al gran número de interacciones observadas en el acoplamiento de la molécula con la enzima en particular el sustituyente 3-furanmetoxi brinda características polares para efectuar probables interacciones por puentes de hidrógeno, además de la interacciones π - π debido a la aromaticidad del furano y de la parte de la fenilpiridazina.
- ✿ El derivado 6-fenil-3-(1'-(2''-hidroxietil)pirrolidin)-5-metilpiridazina, podría funcionar como inhibidor por numerosas de interacciones apreciadas en el acoplamiento con la enzima, aunque las características del sustituyente 2-hidroxietilpirrolidina no son muy polares mostró, tener posibles interacciones por puentes de hidrógeno debido al cambio conformacional que presenta el nitrógeno de la pirrolidina.
- ✿ En el derivado 6-fenil-3-hidrazino-5-metilpiridazina, no se encontraron múltiples interacciones en comparación con las moléculas anteriores.
- ✿ De la reacción para la formación de la 3-amino-N-(tiazol-2-il)-6-fenil-5-metilpiridazina, se obtuvo mediante las rutas de síntesis propuestas la 3-amino-6-fenil-N,N,5-trimetilpiridazina, que aunque no fue el compuesto esperado, debido a sus características polares de la porción de la N,N dimetilamina se le realizó el análisis computacional y este puede presentar actividad biológica, aunque de menor afinidad en comparación con la 6-fenil-3-(3'-furanmetoxi)-5-metilpiridazina y la 6-fenil-3-(1'-(2''-hidroxietil)pirrolidin)-5-metilpiridazina.

CONCLUSIONES

- ✿ Para cada una de estas moléculas se requiere realizar una serie de estudios *in Vitro* para evaluar su actividad inhibitoria en acetilcolinesterasa, lo cual da pie a continuar este estudio de los inhibidores de la AChE.

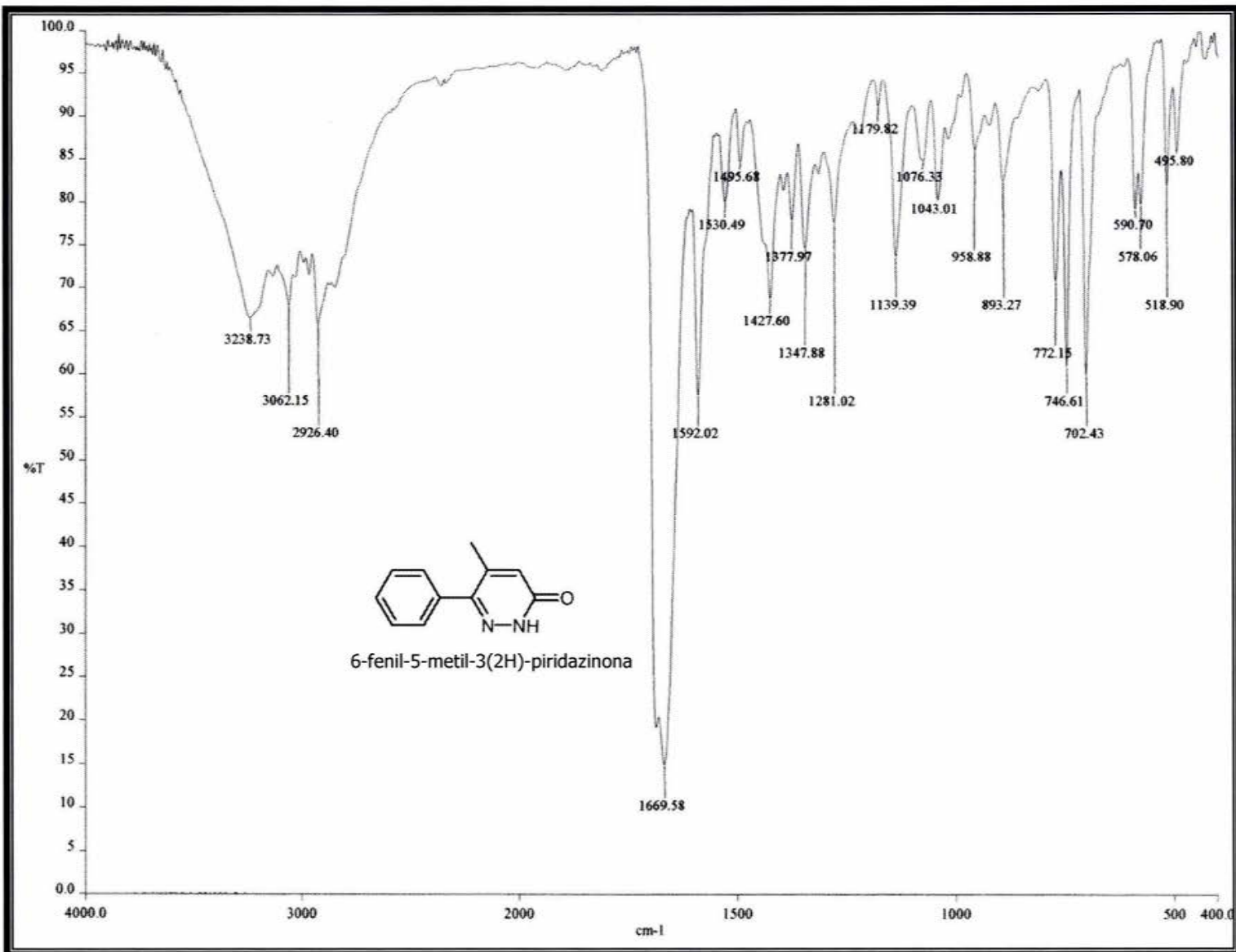
7. BIBLIOGRAFÍA

1. O'Brien, C., *Science*, **1996**, 273, 28.
2. Sandoval, H., Brownell, G., Serrana, J. A., Del Muro, R., *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, **1999**, 30, 2, 8-16.
3. Van Leeuwen, F. W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1989**, 86, 6417-6420.
4. Evans, D. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1994**, 21, 6059-6063.
5. Van Leeuwen, F. W. et al., *Science*, **1998**, 279, 242.
6. Vogel, G., *Science*, **1998**, 279, 174.
7. Science now., **1998**, <http://sciencenow.sciencemag.org>
8. Selhoe, D. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, 85, 7341-7345.
9. Kaag, J. et al., *Nature*, **1987**, 325, 733-736.
10. Tanzi, R. E., *Science*, **1987**, 235, 880-884.
11. Esch, F. S., *Science*, **1990**, 248, 112-124.
12. Sisoda, S. S., *Science*, **1990**, 248, 492-495.
13. Selkoe, D. J., *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1994**, 10, 373-403.
14. Marx, J., *Science*, **1992**, 255, 688-689.
15. Estus, S. et. al., *Science*, **1992**, 255, 726-728.
16. Golde, T. E., et. al., *Science*, **1992**, 255, 728-730.
17. Marx, J., *Science*, **1993**, 259, 457-458.
18. Cai, X., et. al., *Science*, **1993**, 259, 514-516.
19. Lee, V. M., *Science*, **1991**, 251, 675-678.
20. Roush, W., *Science*, **1995**, 267, 793-794.
21. Selkoe, D. J., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 1295-1298.
22. Schmidt, M. L., *Am. J. Pathol.*, **1997**, 151, 69-80.

23. Roush, W., *Science*, **1997**, 277, 31-32.
24. Barinaga, M., *Science*, **1995**, 268, 1845-1846.
25. Schellenberg, G. D., *Science*, **1992**, 258, 668-671.
26. Levy-Lahad, E., *Science*, **1995**, 269, 970-972.
27. Barinaga, M., *Science*, **1995**, 269, 917-918.
28. Sherrington, R., *Nature*, **1995**, 375, 754-760.
29. Rogaeve, E. I., *Nature*, **1995**, 376, 775.
30. Levy-Lahad, E., *Science*, **1995**, 269, 973-977.
31. Scheuner, D., *Nat. Med.*, **1996**, 2, 864-870.
32. Maccioni, R., **1999**, <http://www.uniacc.cl/talon/anteriores/talonaquiles4/talon4-2.htm>
33. De Strooper, B., *Nature*, **1998**, 391, 387-390.
34. Haass, C., Selkoe, D. J., *Nature*, **1998**, 391, 339-340.
35. Wolozin, B., *Science*, **1996**, 274, 710-713.
36. Schubert, D., Chevion, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, 216, 702-707.
37. Xie, C. X., *Brain Res.*, **1996**, 743, 271-277.
38. Bush, A. I., *Science*, **1994**, 265, 1464-1467.
39. Cuajungco, M. P., Lees, G. J., *Brain. Res. Rev.*, **1997**, 23, 219-239.
40. Elser, W. P., *J. Neurochem.*, **1996**, 66, 723-732.
41. Saunders, A. M., Trowers, M. K., Shimkets, R. A., Blakemore, S., Crowther, D. J., Mansfield, T.A., Wallace, D. M., Strittmatter, W. J. & Roses, A. D., *Biochem. Biophys. Acta*, **2000**, 1502, 85-94.
42. Ávila, G. J., *Serie científica*, Universidad Autónoma de Madrid, **2002**, 3, 141-155.
<http://www.farmaindustria.es/farmaweb/7pb43811prod.nsf/Editores/1A9B17D293445A6CC1256CE50045B670?OpenDocument>

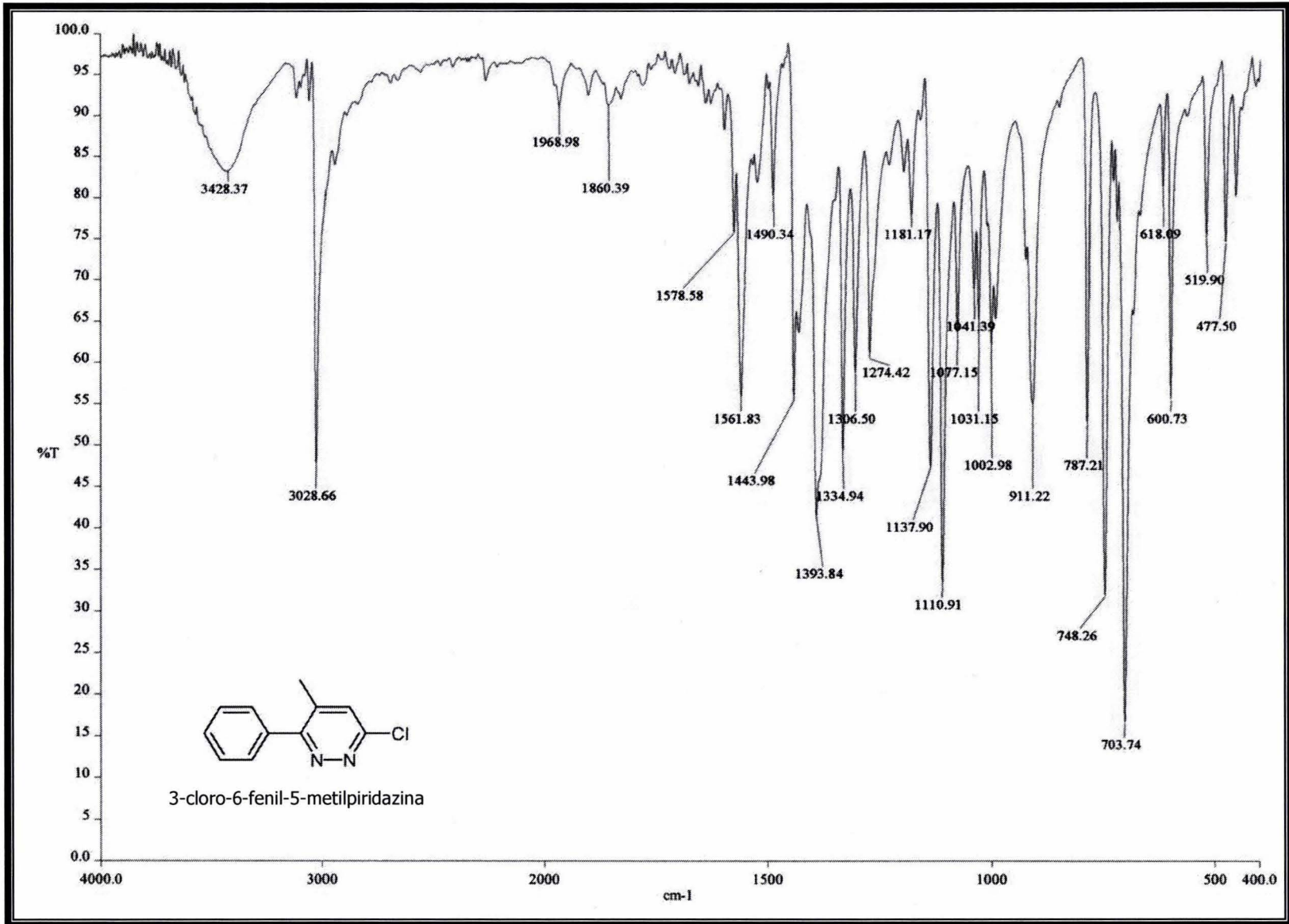
43. Marx, J., *Nature*, **1996**, 273, 50-53.
44. Felder, C. C., Bymaster, F. P., Ward, J., *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 4333.
45. Larner, A., *J. Mini Rev. Med. Chem.*, **2002**, 2, 1.
46. Marco, J. L., *Serie científica*, Universidad Autónoma de Madrid, **2002**, 8, 141-155.
<http://www.farmaindustria.es/farmaweb/7pb43811prod.nsf/Editores/1A9B17D293445A6CC1256CE50045B670?OpenDocument>
47. Sippl, W., Contreras, J. M., Parrot, I., Rivalb, Y., Wermuth, C., *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2001**, 15, 395-410.
48. Novartis Pharmaceuticals Corporation, **2001**, <http://www.novartis.com>
49. Patel, N., *Neuroreport*, **1998**, 9, 171.
50. Contreras, J. M.; Parrot, I.; Sippl, W.; Rival, Y. M.; Wermuth, C. G., *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2707-2718.
51. Lam, B. L., *European Patent 0047164*, **1981**, 6 pp.
52. Contreras, J. M.; Sippl, W.; Chayer, S.; Bourguignon J. J.; Wermuth, C. G., *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 730-741.
53. Pifferi, G., Parravicini, F., Carpi, C., Dorigotti, L., *J. Med. Chem.*, **1975**, 18, 7, 741-746.
54. Coates, W. J., Roe, A. M., Slater, R. A., Taylor, E. M., *U.S. Pat 4053601*, **1977**, 16pp.
55. Steiner, G., Gries, J., Lenke, D., *J. Med. Chem.*, **1981**, 24, 59-63.

8.1 ESPECTROS DE INFRAROJO

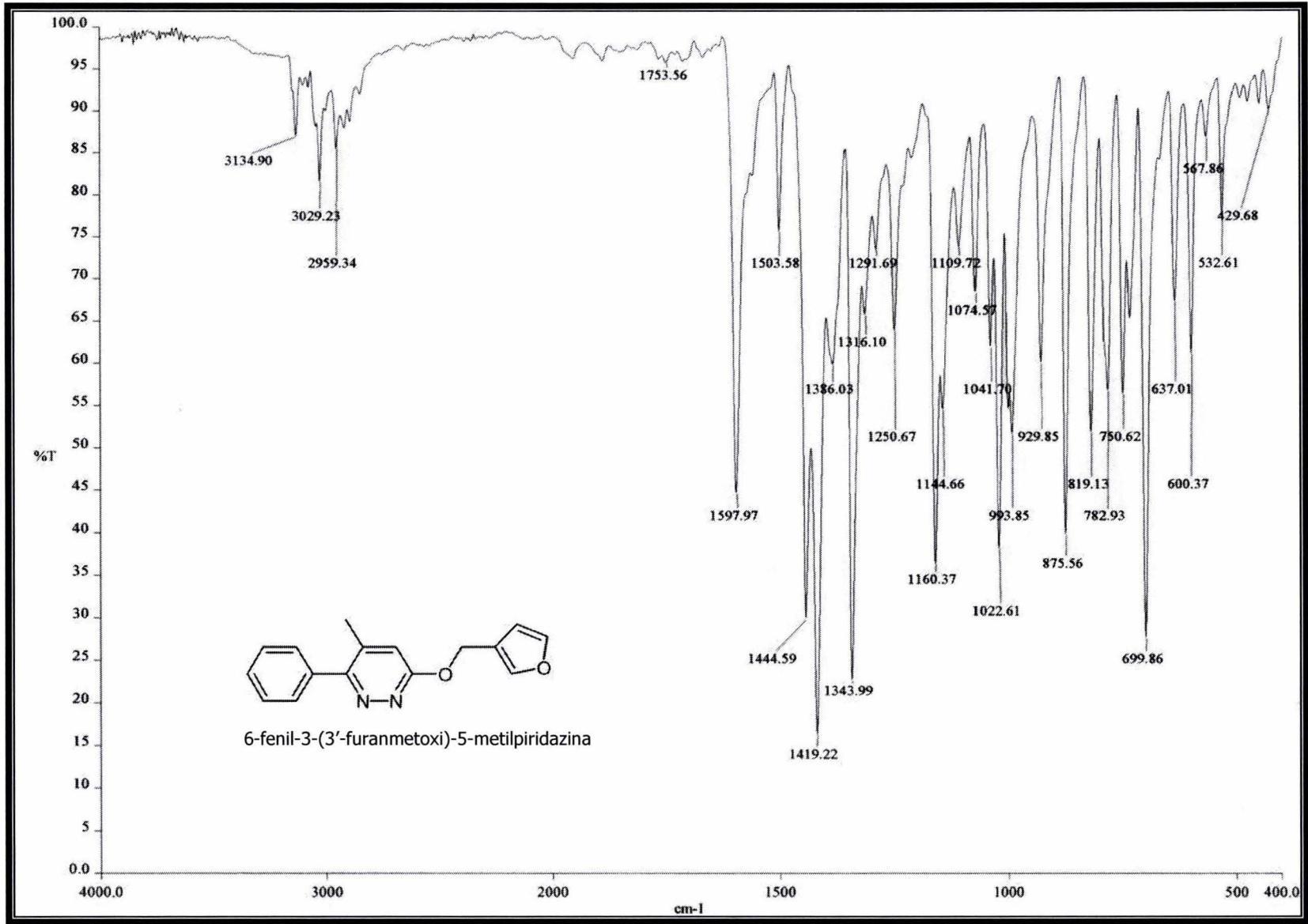


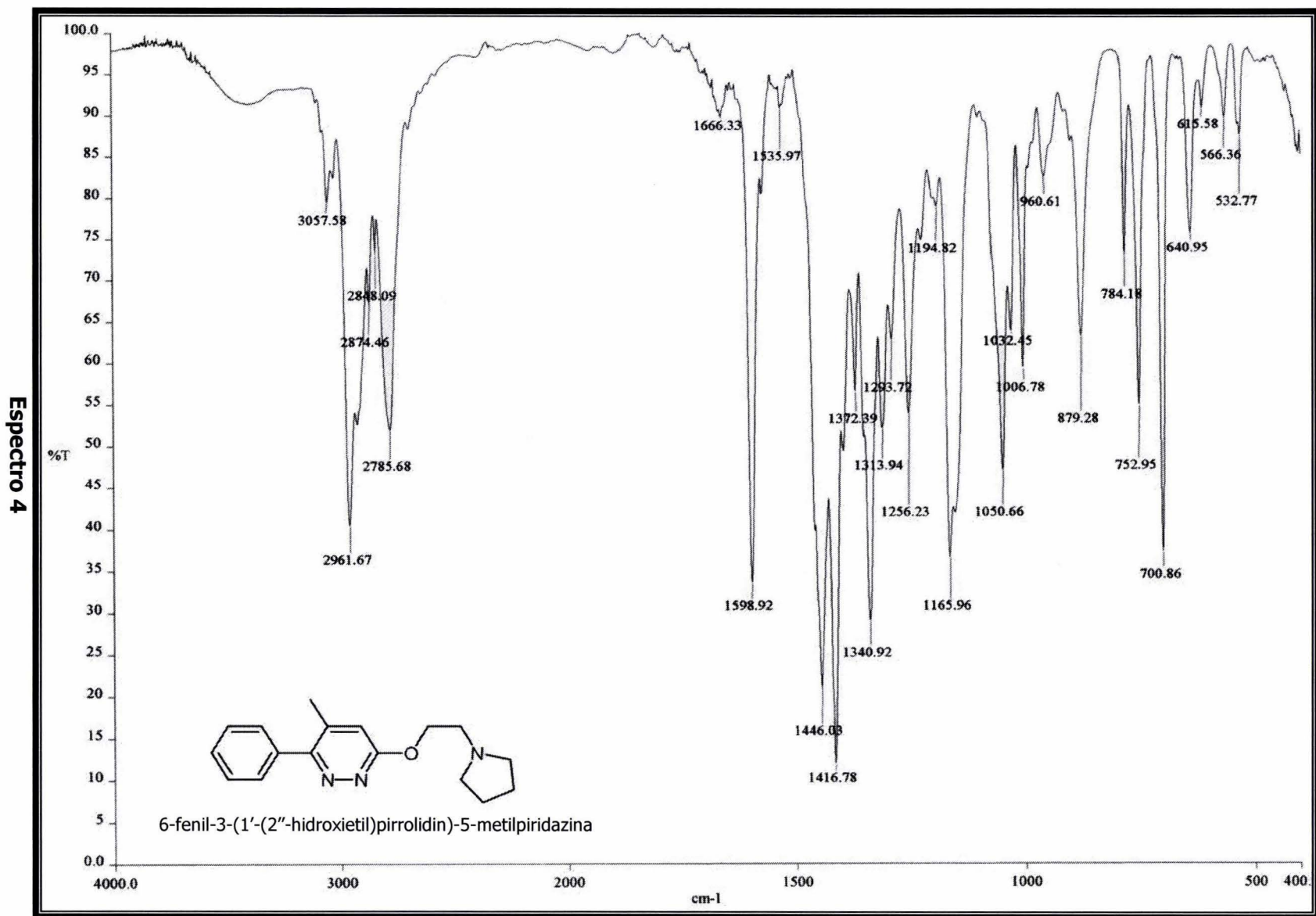
Espectro 1

Espectro 2

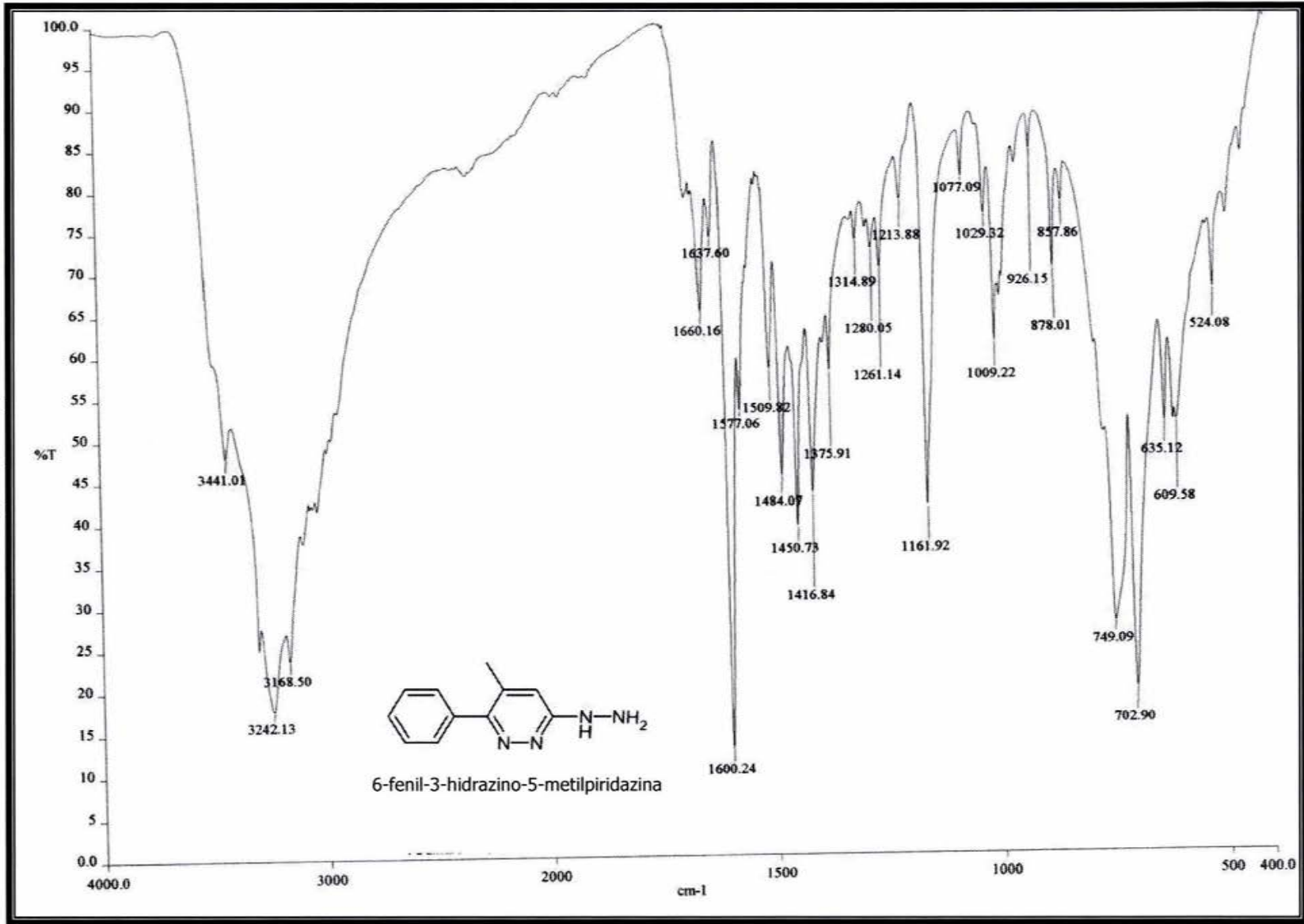


Espectro 3

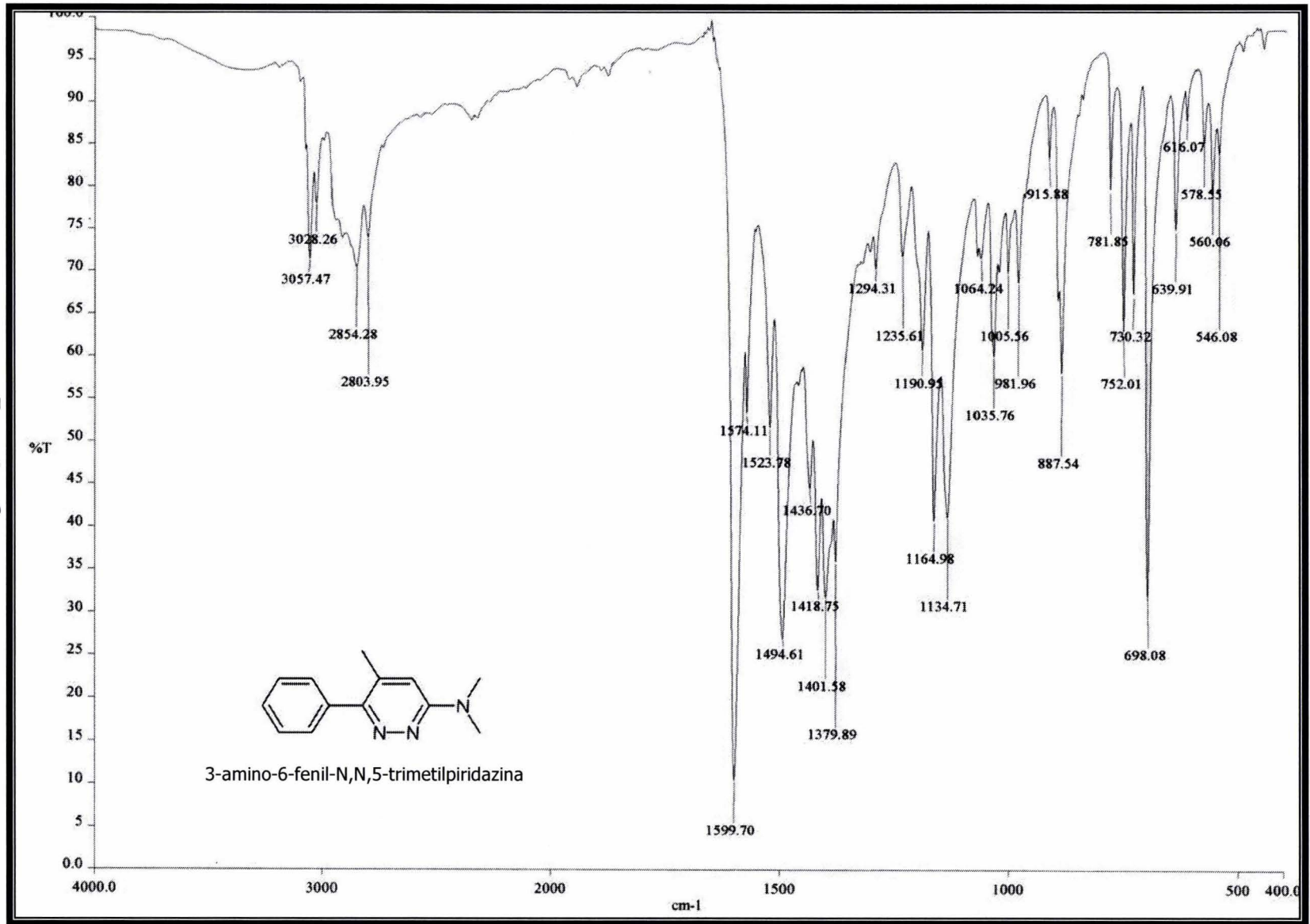




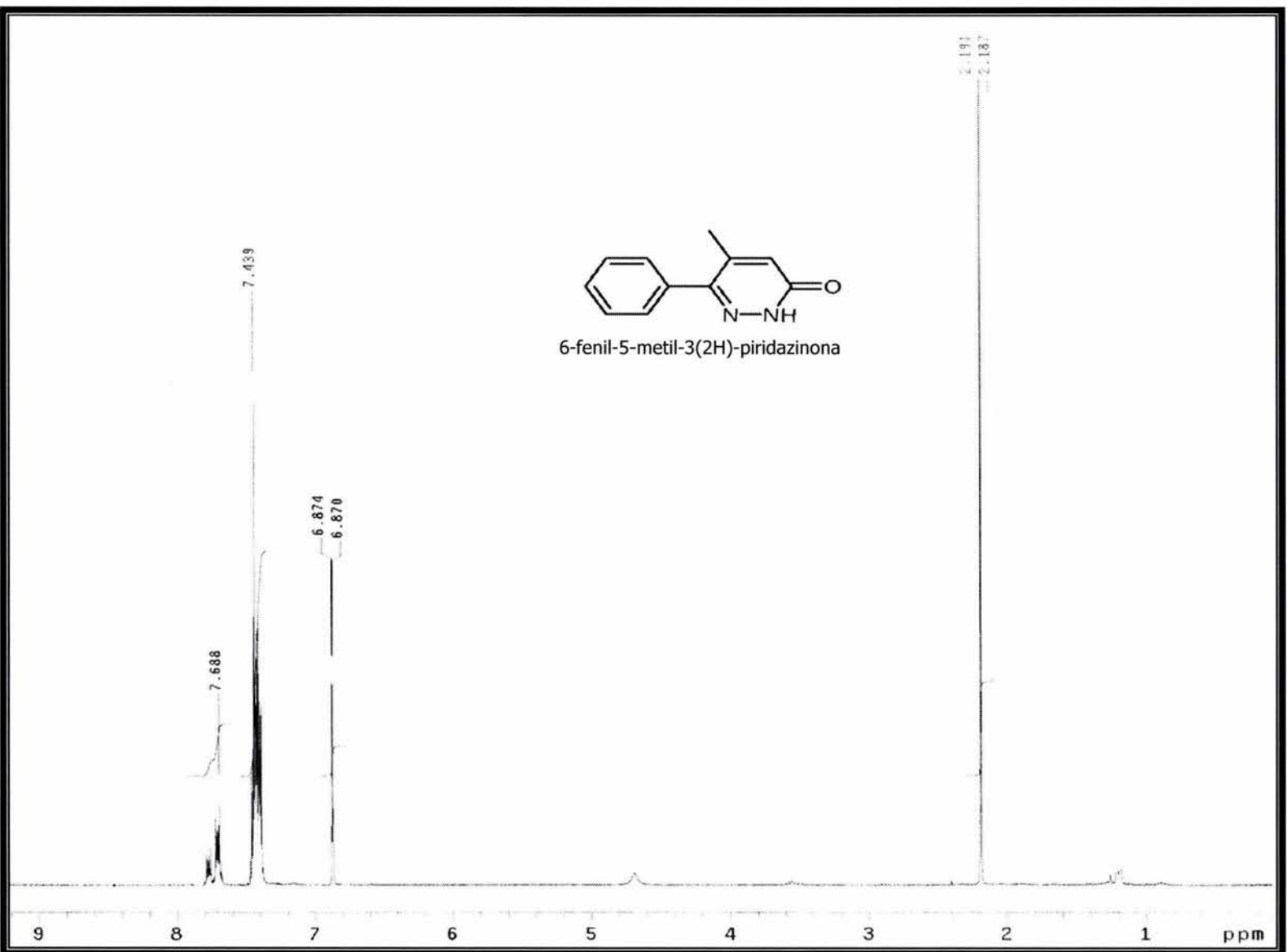
Espectro 5



Espectro 6

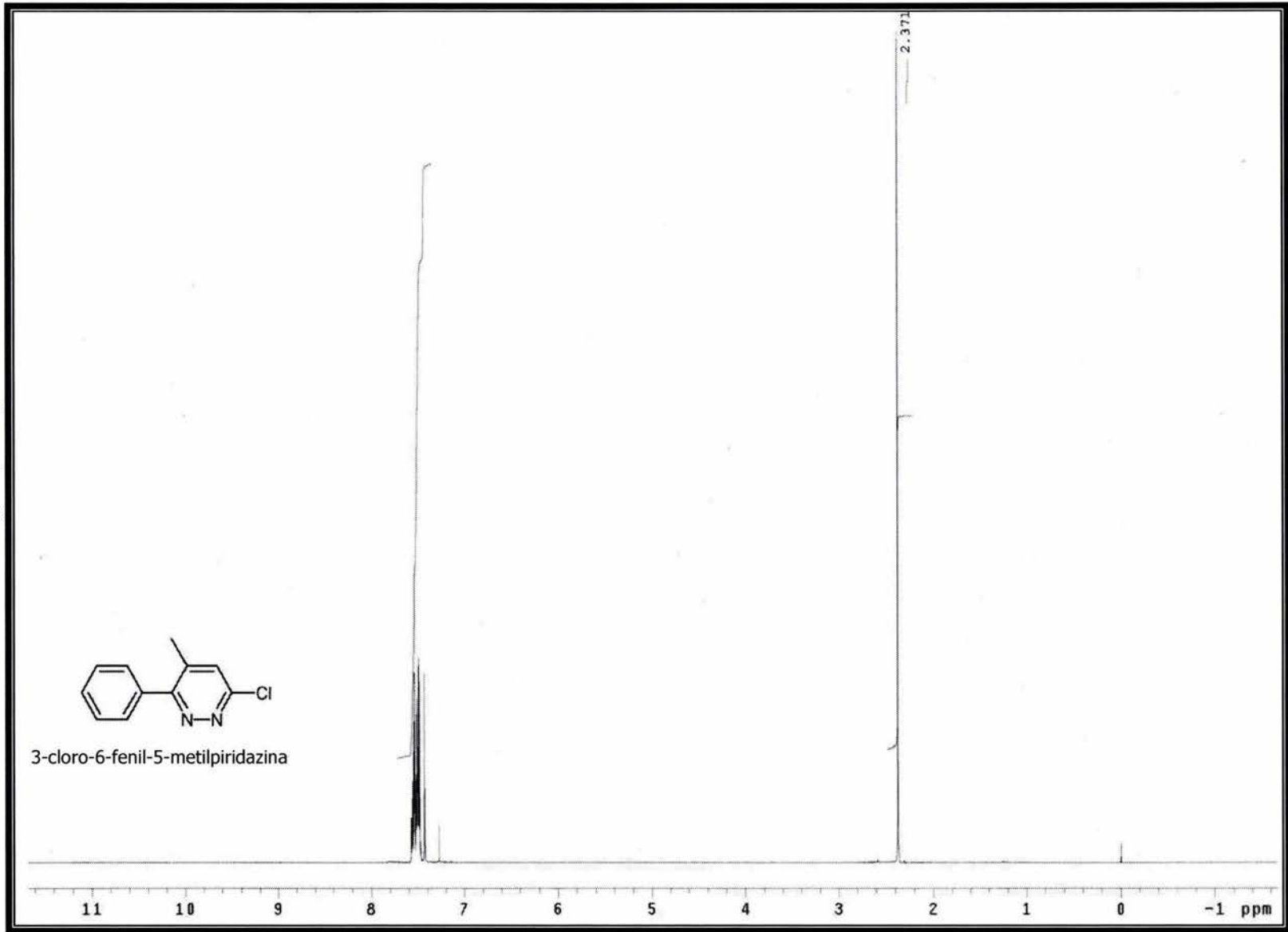


8.2 ESPECTROS DE RMN-¹H

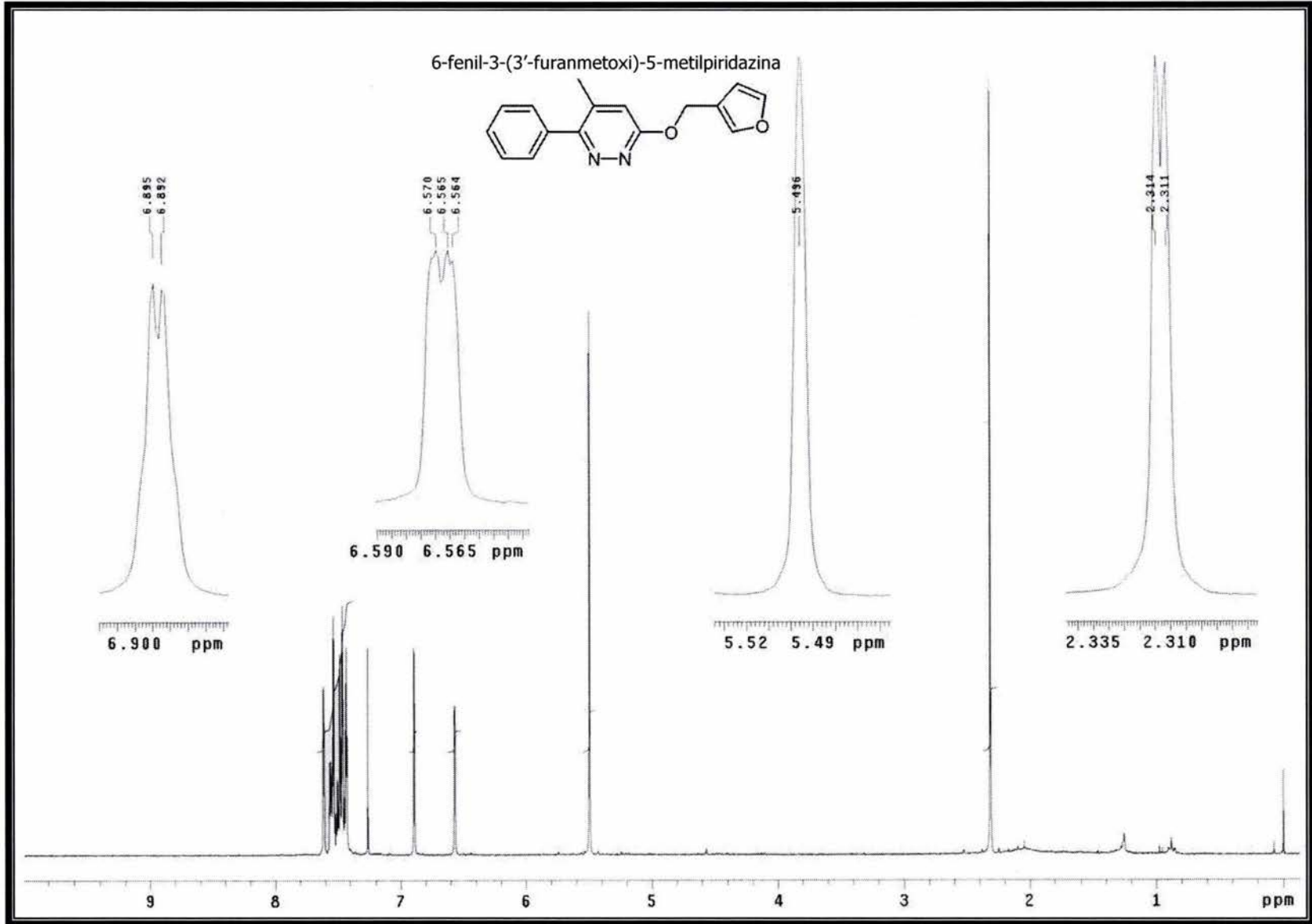


Espectro 7

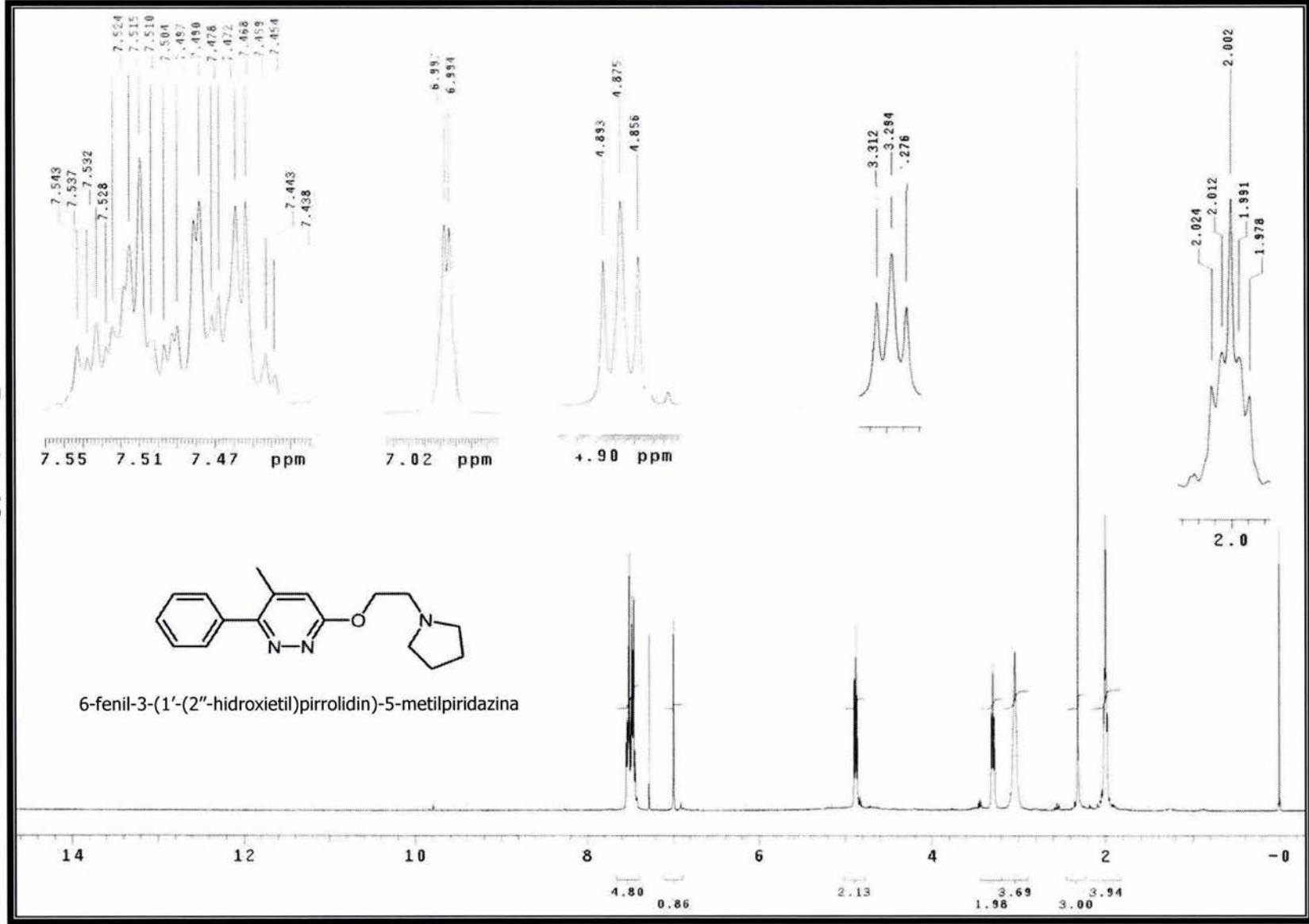
Espectro 8



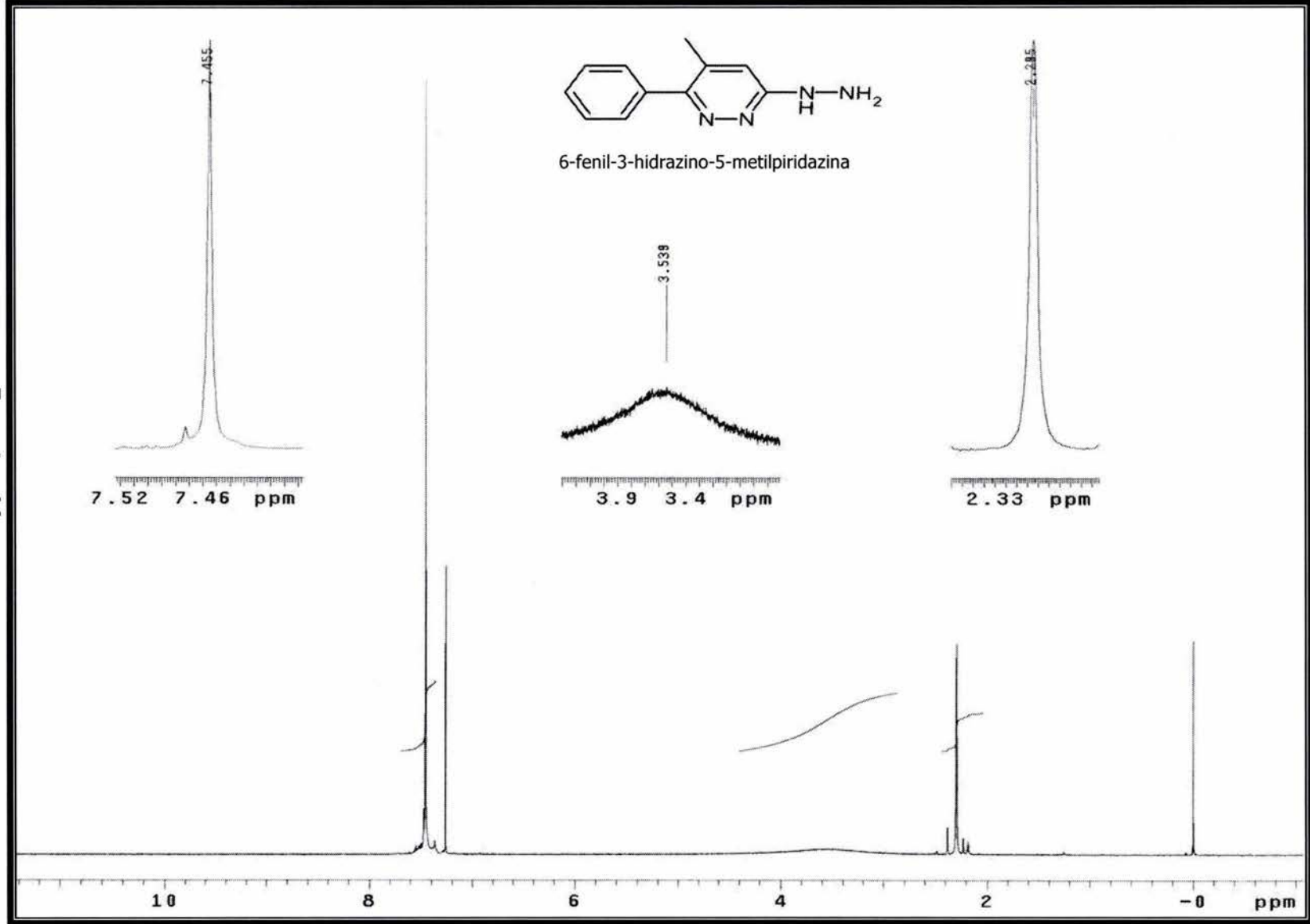
Espectro 9

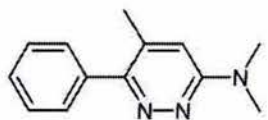


Espectro 10

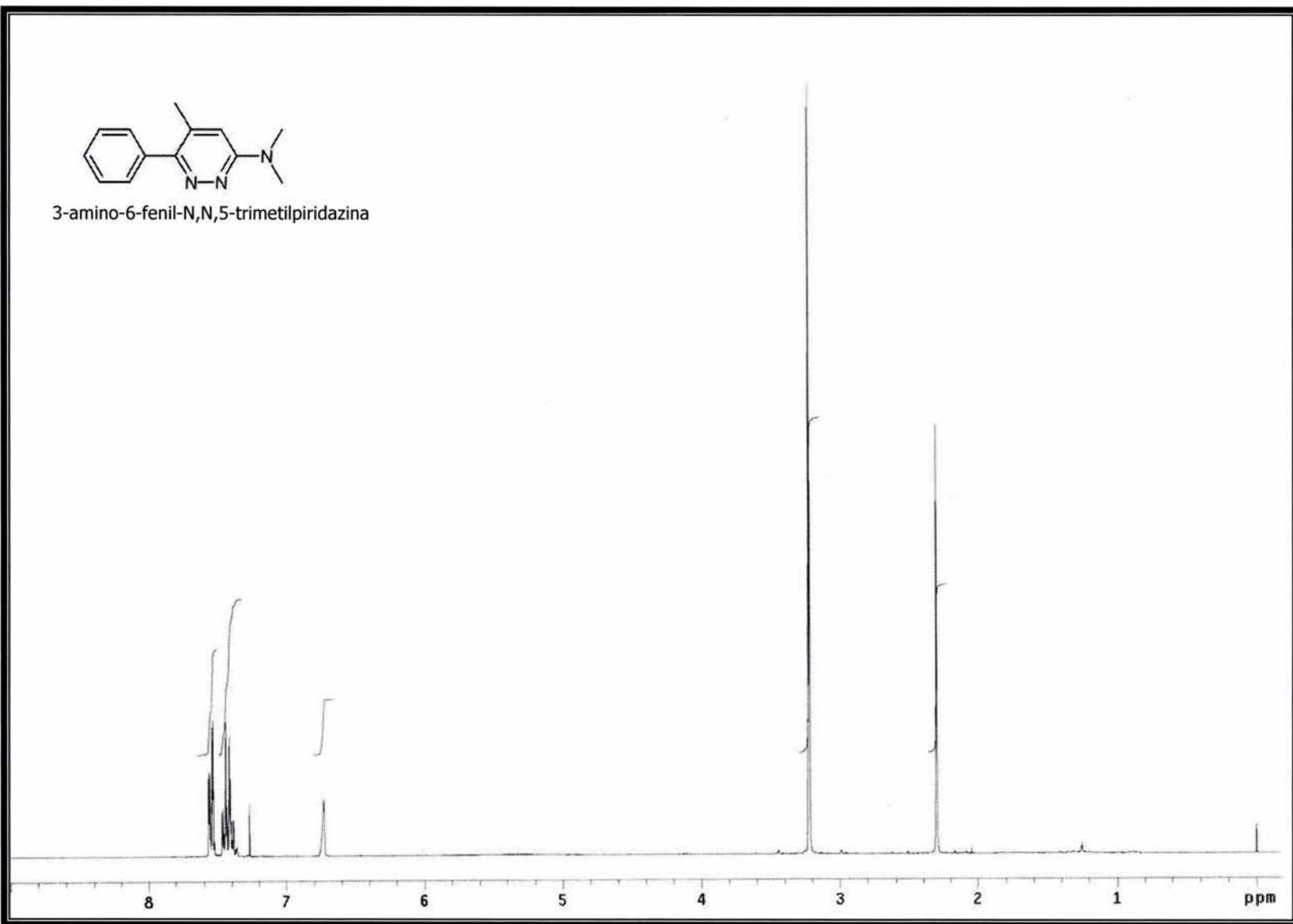


Espectro 11

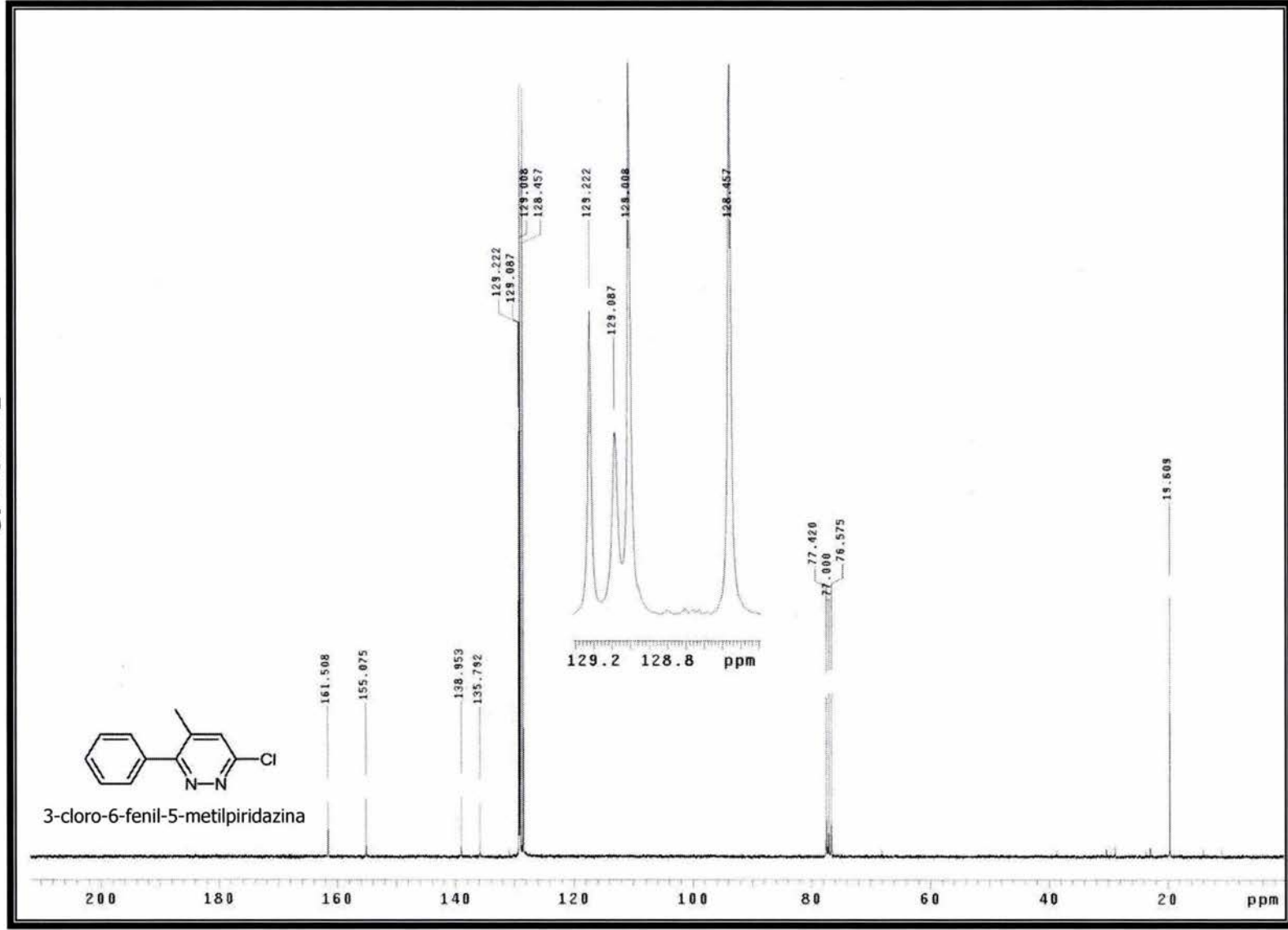




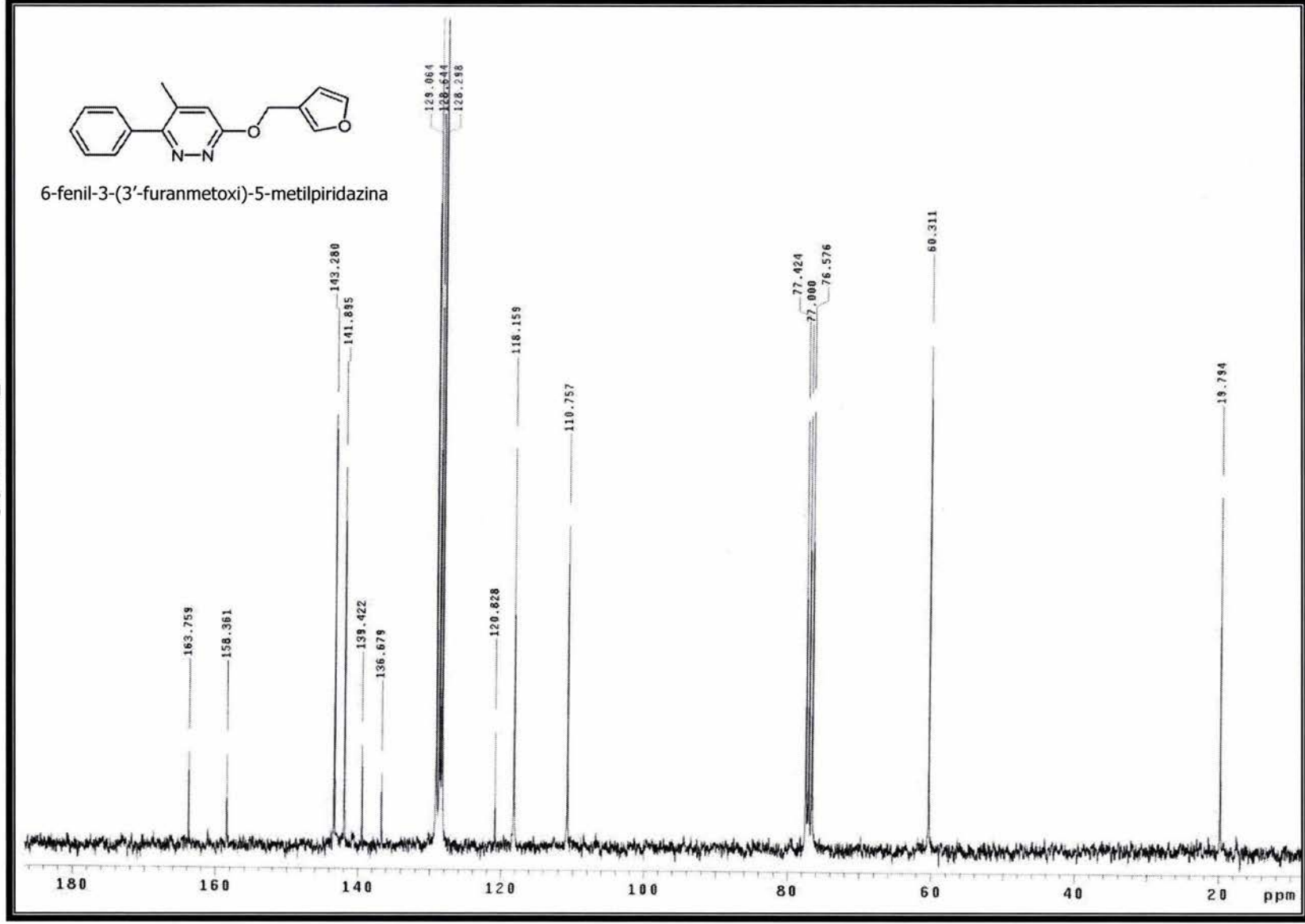
3-amino-6-fenil-N,N,5-trimetilpiridazina

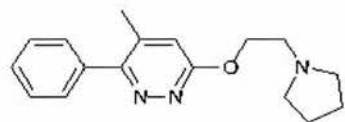


Espectro 13

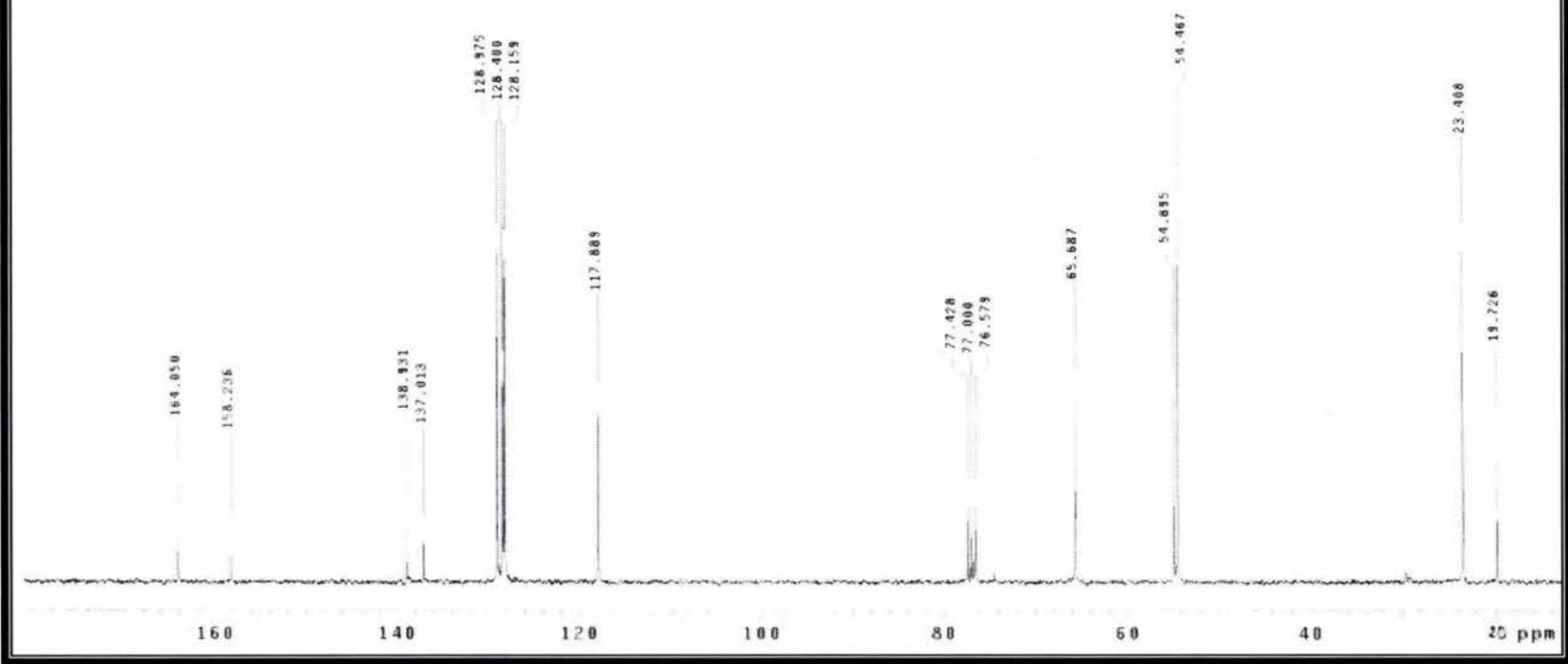


Espectro 14

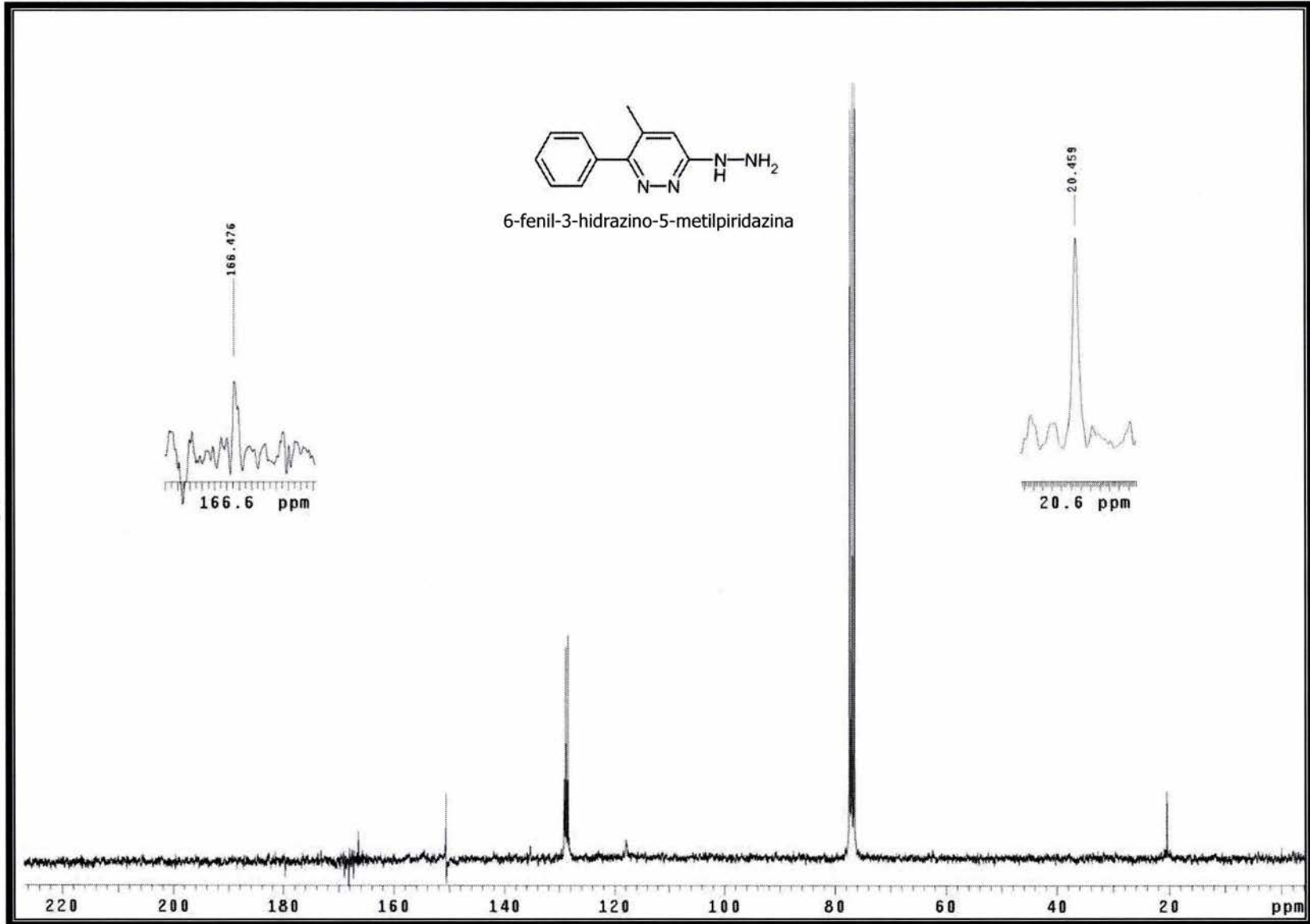




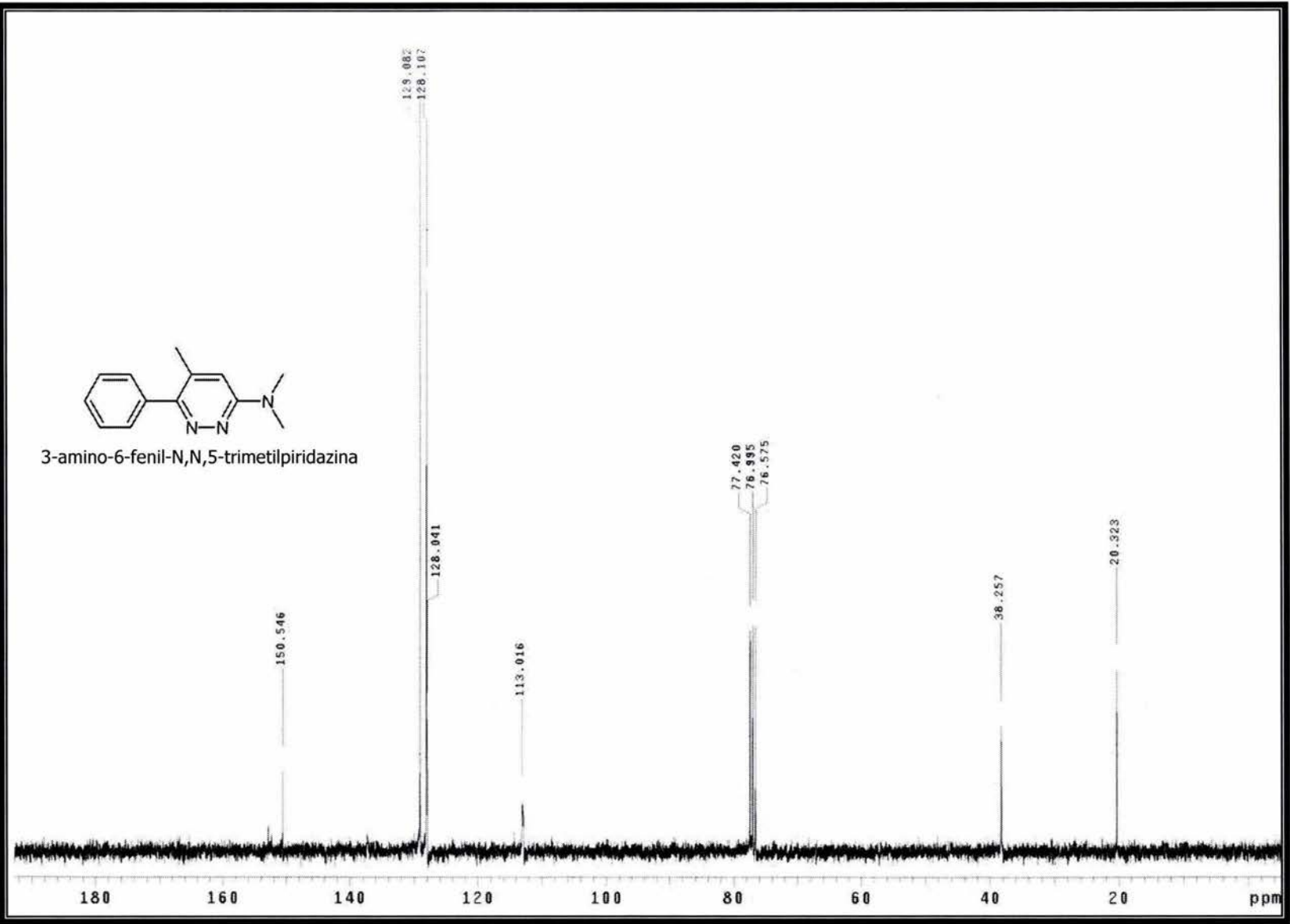
6-fenil-3-(1'-(2"-hidroxietil)pirrolidin)-5-metilpiridazina



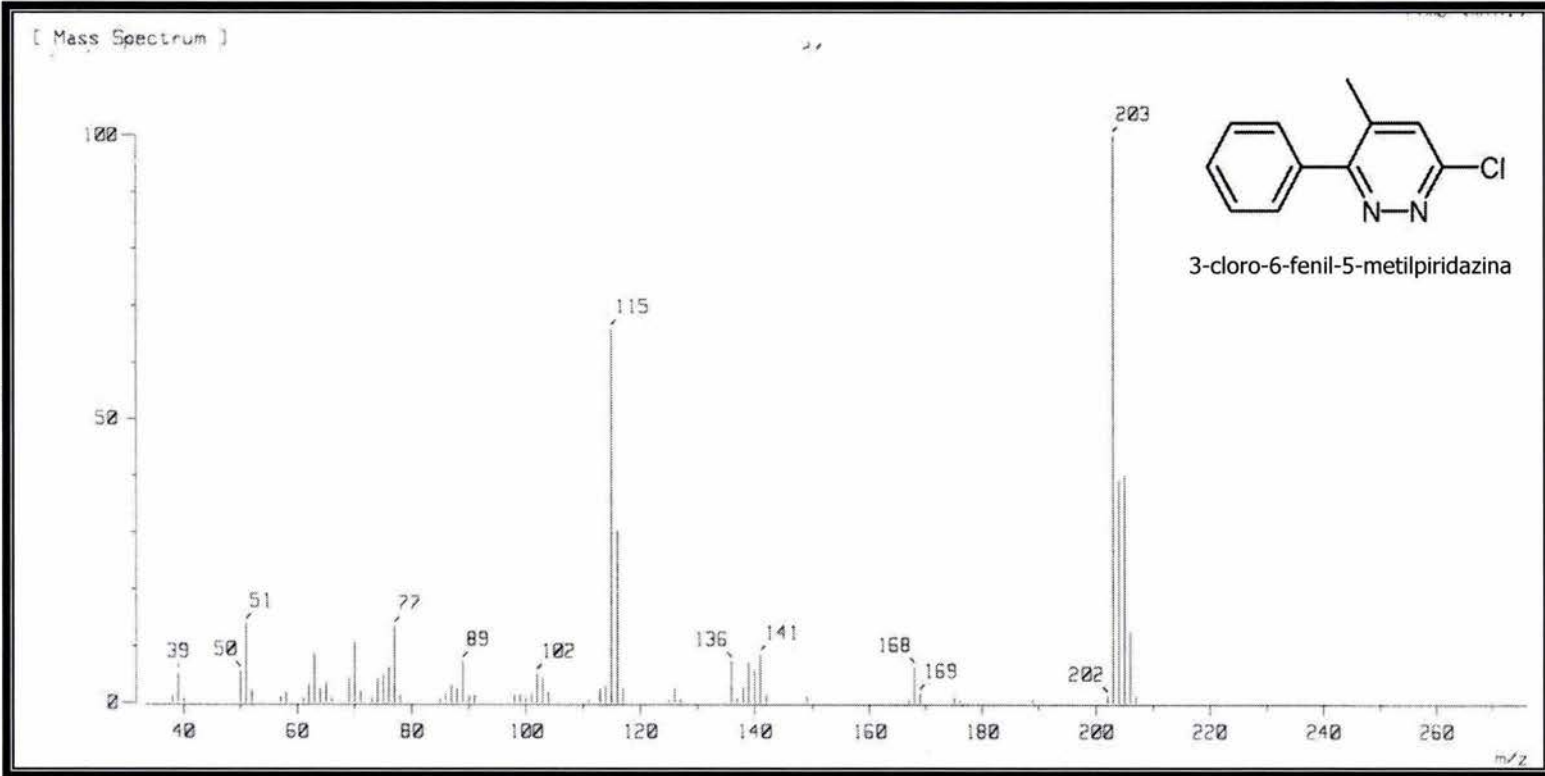
Espectro 16



Espectro 17



8.4 ESPECTROS DE MASAS



Espectro 18

[Mass Spectrum]

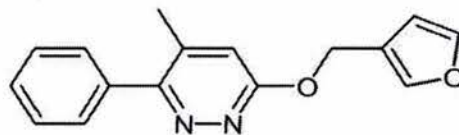
RT : 13.09 min

Ion Mode : EI+

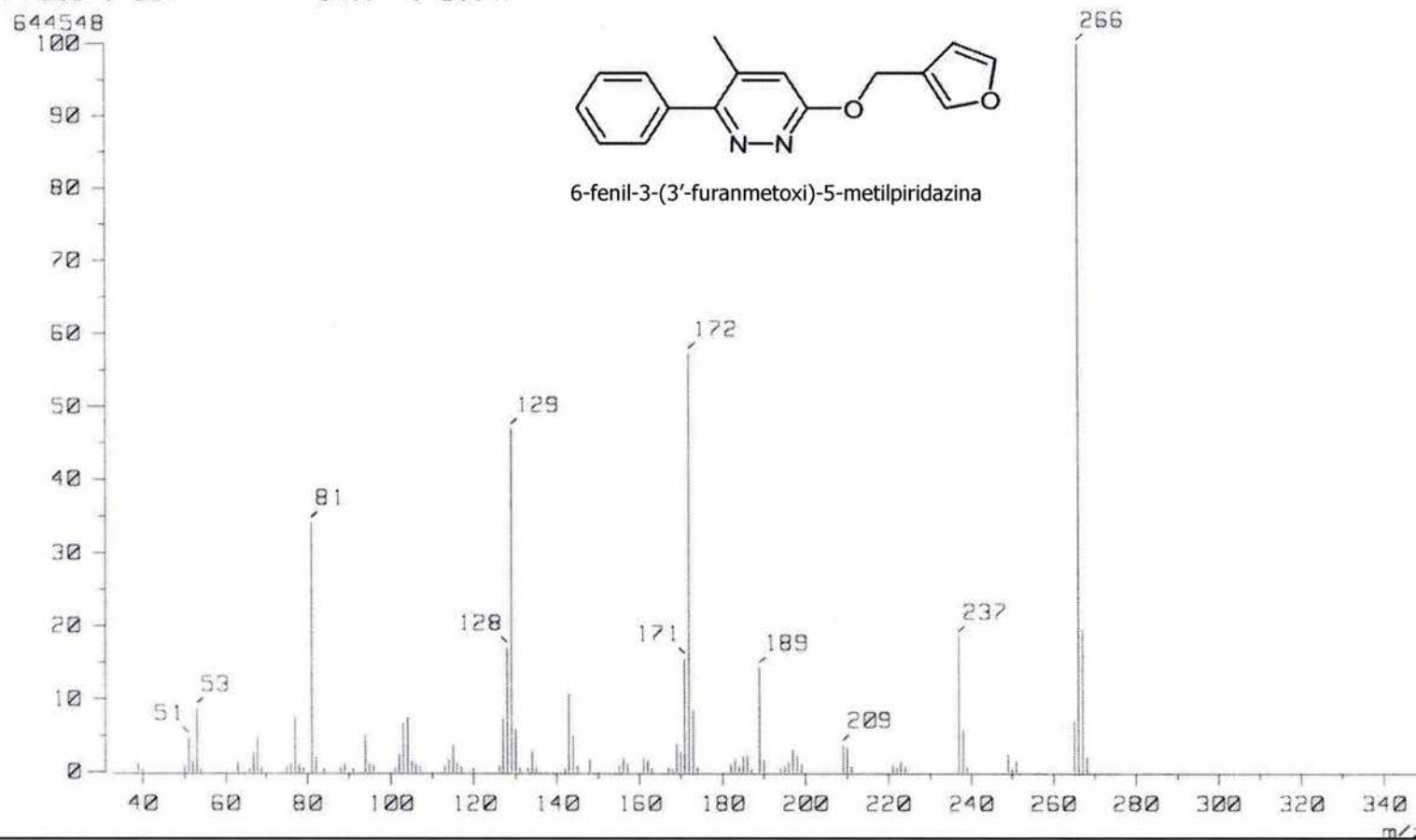
Scan# : (475,477)-(495,532)

Temp : 26.2 deg.C

Int. : 61.47



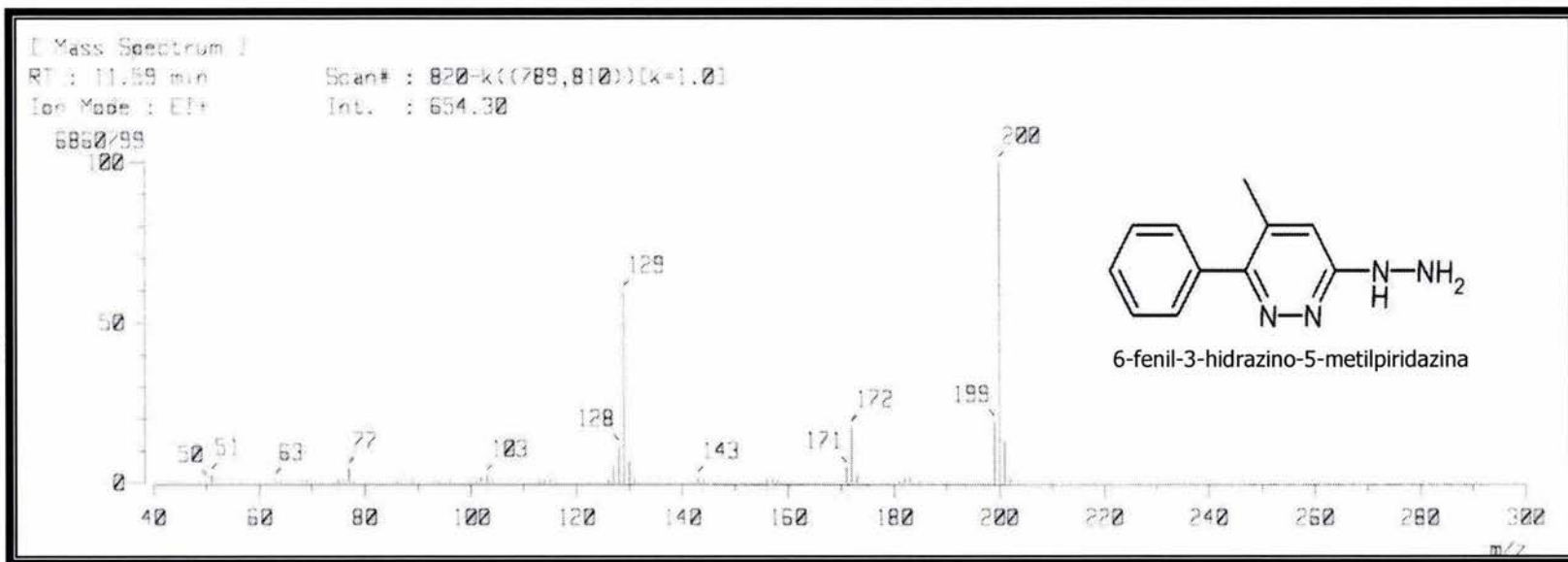
6-fenil-3-(3'-furanmetoxi)-5-metilpiridazina



Espectro 19

ESPECTROS

Espectro 20



Espectro 21

