

Novedoso profármaco derivado de la lilolidina con actividad dopaminérgica central.

María Matilde Ramírez Morán¹, Ligia Biagina Angel Migliore¹, Mariagracia Vera Sosa¹, Marienmy del Valle Velásquez Lugo¹, José Daniel García Carmona¹, Jesús Alberto Salazar Castillo¹, Alejandra del Valle Villalba¹, Biagina del Carmen Migliore¹, Jaime Charris Charris², Anita Israel³, Simón López D´Sola⁴, Rodolfo Izquierdo⁵ y Jorge Eduardo Angel Guio¹.

¹Laboratorio de Síntesis Orgánica, Diseño y Evaluación Farmacológica de nuevos productos Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

²Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

³Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

⁴Department of Chemistry, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

⁵Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: agonista dopaminérgico; lilolidina; neurodegenerativas; Enfermedad de Parkinson; Corea de Huntington.

Resumen. La desregulación de la neurotransmisión dopaminérgica central ha sido relacionada con enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson y la Corea de Huntington. En las últimas décadas son muchos los compuestos con actividad dopaminérgica central que se han diseñado, sintetizado y evaluado farmacológicamente y, a pesar de estos esfuerzos, no se ha logrado obtener un fármaco efectivo capaz de mejorar o curar estas patologías. Con el fin de contribuir en esta búsqueda primordial, en el presente trabajo se describe el diseño, la síntesis y la evaluación farmacológica del derivado de la lilolidina, clorhidrato de 6-(2-aminoindanil)-*N*-(2,4,5,6-tetrahidro-1*H*-pirrolo[3,2,1-*ij*]quinolina) 4 (MAIL), con el propósito de restablecer la homeostasis de la transmisión dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson y/o la Corea de Huntington. Para ello, se utilizaron las diferentes estrategias

Autor de correspondencia: Jorge Eduardo Angel Guio. Universidad del Zulia, Laboratorio de Síntesis Orgánica, Diseño y Evaluación Farmacológica de nuevos productos, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Maracaibo, Venezuela. Correo electrónico: jangel63@yahoo.com

clásicas y heterocíclicas enmarcadas en la síntesis orgánica a través de una ruta convergente. Asimismo, se realizó la evaluación farmacológica preliminar, al determinar el comportamiento estereotipado en ratas Sprague-Dawley cuando les fue administrado el derivado de la lilolidina, por las vías ICV (intracerebroventricular) e IE (intraestriatal). Los resultados obtenidos del compuesto **4** mostraron una acción central como agonista, a través de mecanismos dopaminérgicos.

Novel prodrug derivative from lilolidine with central dopaminergic activity.

Invest Clin 2017; 58(3): 259 - 273

Keywords: dopaminergic agonist; lilolidine; neurodegenerative; Parkinson's Disease; Huntington's Chorea.

Abstract. Central dopaminergic neurotransmission deregulation has been related with neurodegenerative sicknesses, like Parkinson's disease and Huntington's Chorea. During the last decades, many compounds with dopaminergic activity have been designed, synthesized and pharmacologically evaluated, but despite all these efforts, an effective drug able to improve or cure these pathologies has not been achieved. With the purpose to contribute in this essential search, this work describes the design, synthesis and pharmacological evaluation of the lilolidine derivative, 6-(2-aminoindanyl)-*N*-(2,4,5,6-tetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,2,1-*ij*]quinoline hydrochloride) **4** (MAIL), with the purpose of restoring the homeostasis of dopaminergic transmission in Parkinson's disease and/or Huntington's Chorea. To perform that, different organic synthesis classic and heterocyclic strategies were employed through a convergent route. Also, a preliminar pharmacological evaluation was done, where the stereotyped behavior of Sprague-Dawley rats was studied after the ICV (intracerebroventricular) and IE (intrastriatum) administration of the lilodine derivative. The results obtained of compound **4** showed a central dopaminergic agonist activity through dopaminergic mechanisms.

Recibido: 20-01-2017 Aceptado: 29-04-2017

INTRODUCCIÓN

La dopamina **1** (DA) (Fig. 1), está involucrada en una gran variedad de funciones a nivel cerebral y no es extraño que múltiples desórdenes hayan sido relacionados con las disfunciones dopaminérgicas (1). En el sistema nervioso central (SNC), la DA es un neurotransmisor precursor de las catecolaminas involucrado en la

regulación de una gama de funciones fisiológicas, que incluyen el control motor y la habilidad para experimentar placer (2). La DA se encuentra principalmente en las vías nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical y tuberoinfundibular (3). Por esta razón, la DA ha sido implicada en los trastornos neurodegenerativos, como la Enfermedad de Parkinson (EP), que se caracteriza por la degeneración progresiva de las vías nigroes-

triadas que conduce a una deficiencia de DA y origina desórdenes neuromotores, así como también en la Enfermedad de Huntington (EH) que se debe a la pérdida de neuronas estructurales de los ganglios basales, lo que genera anomalías en el control del movimiento (1,3,4).

Con el propósito de encontrar una solución terapéutica a estas patologías se han diseñado y sintetizado numerosos compuestos, análogos del 2-aminoindano **2** y 2-aminotetralina **3**, a los cuales se le han incorporado las aproximaciones farmacofóricas necesarias para interactuar en los blancos de acción dentro del sistema dopaminérgico central (5-9). Con el fin de contribuir en esta búsqueda primordial, en el presente trabajo se describe el diseño, la síntesis y la evaluación farmacológica del análogo de la lilolidina **4** (MAIL) (Fig. 1), como un aporte importante para el desarrollo de nuevos fármacos, capaces de restablecer la homeostasis de la transmisión dopaminérgica en las enfermedades de Parkinson y/o Huntington.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este diseño se basó en la estrategia químico-medicinal llamada hibridación, en la cual se involucra un agonista y/o antagonista unidos a través de un enlace covalente; en este caso se incorporaron los fragmentos 2-aminoindano **10** y lilolidina **15**. En cuanto a la estrategia sintética se utilizó la tipo convergente (Fig. 2), y la obtención del producto final se realizó a través de la reacción de aminación reductiva, entre los intermediarios claves **10** y **15**, previamente sintetizados(5,7-15). La existencia de los intermediarios claves y el producto final se confirmaron a través de sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H , ^{13}C , HETCOR, COSY y DEPT.

Sección Química

Los puntos de fusión no fueron corregidos y se determinaron mediante el uso de un aparato Fisher-Johns 300 °C y un aparato Stuart Scientific. Los espectros de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C fueron registrados a través de un

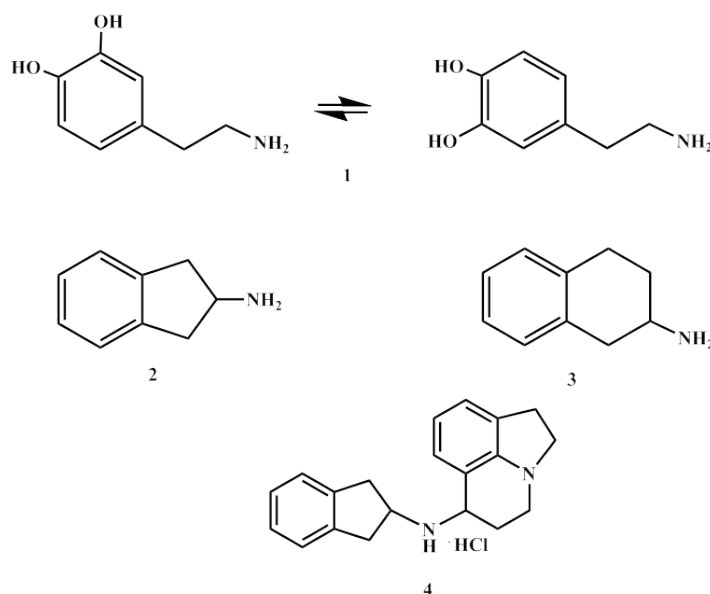


Fig.1. Estructuras de los compuestos 1-4.

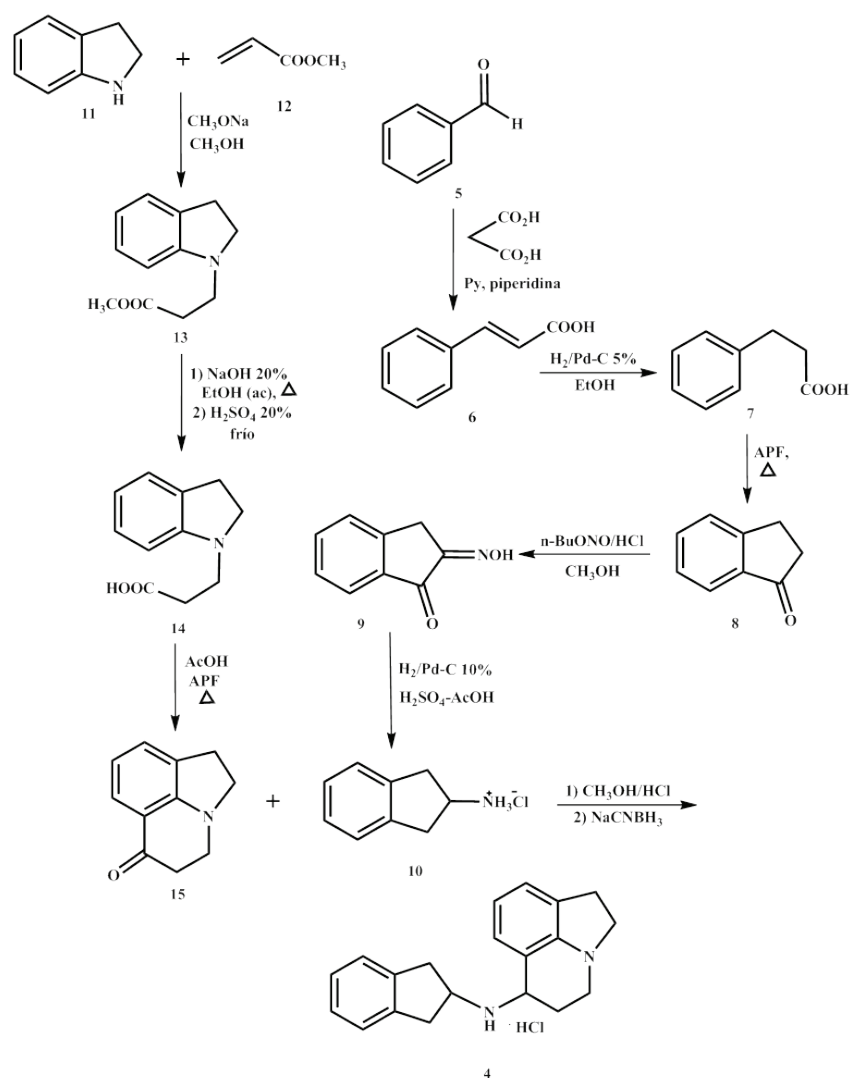


Fig.2. Ruta de síntesis para la obtención de producto final 4.

Espectrómetro Jeol de 270 MHz, ubicado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, y se reportaron en ppm (δ). La pureza de todos los compuestos fue determinada por cromatografía de capa fina usando solventes de distinta polaridad. Todos los solventes fueron destilados y secados por métodos estándar.

Síntesis del éster *N*-1-indolin- β -propanoato de metilo **13**

A una solución de 0,31 g (13,48 mmol) de sodio metálico en 10 mL de metanol, se le añadió gota a gota una mezcla de 2 mL de indolina **11** (2,126 g, 17,87 mmol), 1,23 mL de acrilato de metilo **12** (1,13 g, 13,16 mmol) en 5 mL de metanol con agitación. La mezcla resultante se mantuvo bajo agitación constante a temperatura

ambiente durante 24 horas. Finalizada la reacción, se adicionó una solución acuosa de HCl al 10% y se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó sucesivamente con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se eliminó el solvente bajo presión reducida para obtener 1,9 g (70%) de un aceite rojo (Rf= 0,8).

Caracterización del *N*-1-indolin- β -propanoato de metilo **13**

IR (KBr): 3381 (C-N); 3047, 3026 (ArH); 2951, 2926 (=CH, ArH); 2845 (CH₂); 1737 (C=O); 1606 (C=C); 1489, 1460, 1437, 1390 (C=C, ArH); 1267, 1246, 1197, 1170 (C-O); 839, 748 (ArH). ¹H: RMN (270 MHz, CDCl₃, δ); 2,61 ppm (t, 2H, CH₂ (C₂), J=6,75 Hz y J=9 Hz); 2,95 ppm (t, 2H, CH₂ (C₃), J=9 Hz); 3,39 ppm (m, 4H, CH₂ y CH₂ (C₂ y C₁)); 3,68 ppm (s, 3H, OCH₃), 6,53 ppm (d, 1H, Ar-H (C₇), J=6 Hz (H₇-H₆) y J=3 Hz (H₇-H₅)); 6,67 ppm (t, 1H, Ar-H (C₅), J=7,5 Hz (H₅-H₆) y J=7,5 Hz (H₅-H₄)), 7,05 ppm (dd, 1H, Ar-H (C₄), J=6 Hz (H₄-H₅) y J=1,5 Hz (H₄-H₆)); 7,09 ppm (st, 1H, Ar-H (C₆), J=6 Hz (H₆-H₅), J=6 Hz (H₆-H₇) y J=3 Hz (H₆-H₄)).

Síntesis del ácido

N-1-indolin- β -propiónico **14**

A 1,5 g (7,32 mmol) del compuesto **13** se le añadieron 20 mL de hidróxido de sodio al 20%, 5 mL de etanol acuoso y la mezcla se calentó entre 100 a 120 °C durante aproximadamente 24 horas. El solvente se evaporó bajo presión reducida, el residuo acuoso fue diluido en agua, llevado a pH 5 con una solución de ácido sulfúrico al 10% y extraído con acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó sucesivamente con agua y fue secado sobre sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se filtró y el solvente fue eliminado bajo presión reducida obteniéndose 1,2 g (86%) de un aceite viscoso que precipitó lentamente formando un sólido marrón, p.f. 71-72°C (Lit. p.f. 75-76°C). (11).

Caracterización del ácido *N*-1-indolin- β -propiónico **14**

IR(KBr): (cm-1): 3473 (COOH); 3045 (ArH); 2926 (=CH, ArH); 2848 (CH₂); 1710 (C=O); 1604 (C=C); 1487 (C=C, ArH); 1265, 1201 (C-O); 746 (ArH).

Síntesis de la cetona 5-cetolilolidina (6-oxo-1,4,5,6-tetrahidro-2*H*-pirrolo[3,2,1,*ij*]quinolina) **15**

En un balón de 100 mL se pesó 0,5 g (2,62 mmol) del compuesto **14**, al cual se le añadieron 5 g de ácido polifosfórico y 3 mL de ácido acético; la mezcla fue sometida a calentamiento en un baño de arena (entre 60 y 120°C), con agitación constante y a presión reducida durante 3 horas. Finalizado el tiempo de reacción, se añadió hielo triturado y se extrajo con varias porciones de diclorometano (pH=2,0-3,5), empleando pequeñas cantidades de bicarbonato de sodio. Los extractos orgánicos fueron lavados con agua y luego se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. El solvente fue eliminado bajo presión reducida y se obtuvo un crudo de color marrón, el cual fue purificado por cromatografía de columna empleando los gradientes en las mezclas de eluentes a partir del cloroformo y acetato de etilo, obteniéndose 0,130 g (30%) de un aceite amarillo intenso que precipitó lentamente como un sólido verde fosforescente, p.f. 58°C (Lit. p.f. 55-56°C) (11).

Caracterización de la 5-cetolilolidina (6-oxo-1,4,5,6-tetrahidro-2*H*-pirrolo[3,2,1,*ij*]quinolina) **15**

¹H: RMN (270 MHz, CDCl₃, δ); 2,75 ppm (t, 2H, CH₂ (C₁), J=7 Hz y J=10 Hz); 3,05 ppm (t, 2H, CH₂ (C₅), J=7 Hz y J=10 Hz); 3,34 ppm (2t, 4H, CH₂ y CH₂ (C₂ y C₄), J=7 Hz y J=10 Hz); 6,66 ppm (dd, 1H, Ar-H (C₈), J=6,75 Hz (H₈-H₇) y J=6,75 Hz (H₈-H₉)); 7,19 ppm (dd, 1H, Ar-H (C₉), J=6,75 Hz (H₉-H₈) y J= 2,25 Hz (H₉-H₇)); 7,51 ppm (dd, 1H, Ar-H (C₇), J=6,75 Hz

(H₇-H₈) y J= 2,25 Hz (H₇-H₉). ¹³C: RMN (270 MHz, CDCl₃, δ); 28,64 ppm (CH₂ (C₅)); 37,84 ppm (CH₂ (C₁)); 48,09 ppm (CH₂ (C₄)); 54,50 ppm (CH₂ (C₂)); 116,15 ppm, 118,37 ppm, 123,05 ppm, 124,15 ppm, 129,14 ppm, 130,56 ppm, 157,70 ppm, carbonos aromáticos, 192,57 ppm (C=O, C₆). RMN-HETCOR: A 28,64 ppm (CH₂ (C₅)) se correlaciona con la señal a 3,05 ppm (t, 2H, CH₂ (C₅)); a 37,84 ppm (CH₂ (C₁)) se correlaciona con la señal a 2,75 ppm (t, 2H, CH₂ (C₁)); a 48,09 ppm (CH₂ (C₄)) y 54,50 ppm (CH₂ (C₂)) se correlaciona con la señal a 3,34 ppm (2t, 4H, CH₂ y CH₂ (C₂ y C₄)); a 118,37 ppm (CH, aromático (C₈)) se correlaciona con la señal a 6,66 ppm (m, 1H, Ar-H (C₈)); a 123,05 ppm (CH, aromático (C₇)) se correlaciona con la señal a 7,51 ppm (dd, 1H, Ar-H (C₇)); a 129,14 ppm (CH, aromático (C₉)) se correlaciona con la señal a 7,19 ppm (dd, 1H, Ar-H (C₉)).

Síntesis del compuesto final clorhidrato de 6-(2-aminoindanil)-N-(2,4,5,6-tetrahidro-1H-pirrolol[3,2,1-ij]quinolina) 4

A 0,110 g (0,635 mmol) de la 5-cetolilolidina **15** se le adicionaron 0,092 g (0,5422 mmol) del 2-aminoindano **10**, 25 mL de metanol y 0,04 mL de ácido clorhídrico concentrado (pH= 1-2), la solución fue sometida a reflujo por 72 horas, a un rango de temperatura entre 70 y 150°C. Posteriormente, en frío, se añadió 0,01 g (0,1478 mmol) de cianoborohidruro de sodio y se controló el pH entre 2 y 3 unidades. La mezcla se dejó a temperatura ambiente con agitación constante por 72 horas, luego las sustancias volátiles se eliminaron a presión reducida. Seguidamente se añadieron 10 mL de agua, se trató con HCl concentrado en exceso y se lavó con éter etílico. La fase acuosa se llevó a un rango de pH entre 8 y 10 con solución acuosa de hidróxido de sodio al 20% y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y el solvente se evaporó a pre-

sión reducida. El crudo obtenido se purificó a través de cromatografía de columna usando sílica gel (fase estacionaria) y como eluentes cloroformo y metanol; el aceite (marrón) fue disuelto en éter o diclorometano. Posteriormente fue tratado con una solución recién preparada de éter/HCl y se obtuvieron 0,05 g (28%) de un sólido amarillo (higroscópico), con un punto de fusión de 255-257°C. (12,13).

Caracterización del Clorhidrato de 6-(2-aminoindanil)-N-(2,4,5,6-tetrahidro-1H-pirrolol[3,2,1-ij]quinolina) 4

¹H: RMN (270 MHz, DMSO-d₆, δ); 2,75 ppm (t, 2H, CH₂ (C₁)); 2,98 ppm (dd, 2H, CH₂ (C₁ ó C₃, pseudoaxiales-indano) J=6,75 Hz y J=13,5 Hz); 3,26 ppm (dd, 2H, CH₂ (C₁ ó C₃, pseudoecuatoriales-indano) J=6,75 Hz y J=13,5 Hz); 3,96 ppm (m, 1H, CH (C₂-indano)); 4,89 ppm (t, 1H, CH (C₆)); 7,22 ppm (m, 4H, Ar-H, indano); 7,67 ppm (pst, 1H, Ar-H (C₈), J=7,7 Hz (H₈-H₇) y J=7,7 Hz (H₈-H₉)); 7,83 ppm (dd, 1H, Ar-H (C₉), J= 7,7 Hz (H₉-H₈) y J=1,9 Hz (H₉-H₇)); 7,97 ppm (d, 1H, Ar-H (C₇), J=7,7 Hz (H₇-H₈)); 8,36 ppm (s ancho, 1H, NH). ¹H: RMN (270 MHz, MeOH-d₃, δ); 2,92 ppm (d, 2H, CH₂ (C₁)); 3,02 ppm (dd, 2H, CH₂ (C₁ ó C₃, pseudoaxiales-indano)); 3,24 ppm (pst, 2H, CH₂ (C₅)); 3,40 ppm (dd, 2H, CH₂ (C₁ ó C₃, pseudoecuatoriales-indano)); 3,77 ppm (t, 2H, CH₂ (C₅)); 3,86 ppm (dt, 2H, CH₂ (C₅)); 4,08 ppm (m, 1H, CH (C₂-indano)); 5,03 ppm (t, 1H, CH (C₆)); 7,25 ppm (m, 4H, Ar-H, indano); 7,77 ppm (pst, 1H, Ar-H (C₈), J=6,75 Hz (H₈-H₇) y J=6,75 Hz (H₈-H₉)); 7,89 ppm (dd, 1H, Ar-H (C₉), J= 6,75 Hz (H₉-H₈) y J=1,7 Hz (H₉-H₇)); 8,1 ppm (dd, 1H, Ar-H (C₇), J=6,75 Hz (H₇-H₈) y J=1,7 Hz (H₇-H₉)). ¹³C: RMN (270 MHz, MeOH-d₃, δ); 27,62 ppm (CH₂ (C₅)); 37,37 ppm (CH₂ (C₁) y CH₂ (C₁ y C₃)); 48,37 ppm (CH₂ (C₄)); 51,27 ppm (CH (C₂-indano)); 54,42 ppm (CH₂ (C₂)); 106,68 ppm (CH (C₆)); 119,65 ppm, 123,92 ppm, 124,58 ppm, 127,22 ppm, 128,70 ppm, 129,19

ppm, 135,77 ppm, 138,94 ppm, 143,24 ppm carbonos aromáticos. RMN-DEPT; inversión de las señales: 27,62 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ (C_5)); 37,37 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ (C_1) y $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ (C_1 y C_3)); 48,37 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ (C_4)) y 54,42 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$ (C_2)). 51,27 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}$ (C_2 -indano)); 106,68 ppm ($\underline{\text{C}}\text{H}$ (C_6)) y los carbonos no cuaternarios 119,65 ppm, 124,58 ppm, 127,22 ppm, 128,70 ppm, 129,19 ppm, 140,63 ppm, 143,19 ppm. RMN COSY (MeOH- d_3); correlación de la señal a 5,03 ppm (t, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}$ (C_6)) con 3,77 ppm (t, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ (C_5)).

Sección farmacológica

Se utilizaron ratas machos de la cepa *Sprague-Dawley* de 150 a 250 g de peso corporal, mantenidas bajo períodos alternos de luz y oscuridad, con libre acceso al agua y alimento estándar (Ratarina[®], Protinal). Cinco días antes del experimento se les implantó a las ratas, bajo anestesia con cilazina (Setton[®] al 2%) (1mg/Kg.; ip) y relajación con ketamina, una cánula metálica en el ventrículo lateral-derecho y en el estriado anterior derecho, según las coordenadas: antero-posterior -0,40 mm del Bregma; 1,2 mm lateral, (ICV) (8,9) y anteroposterior = +1,2; Lateral = +2,8; Ventral = -5,5 (IE) (16, 17) respectivamente. Las cánulas, empleadas como guía para la introducción de la aguja de inyección ICV e IE, se fabricaron utilizando inyectoras 20G con un largo inferior a 4 mm, fijadas al cráneo permanentemente mediante acrílico y cemento plástico. Para las pruebas de estereotipia se preparó una solución de las drogas patrones de apomorfina (APO-go PEN 10 mg/mL, solución inyectable), haloperidol (Haldol 50mg/mL, solución inyectable, JANSSEN PHARMACEUTICA), ziprasidona (Geodon, Polvo para solución Inyectable, laboratorios Pfizer) y buspirona (Buspar, comprimidos de 20 mg) disueltas en solución salina e inyectadas por vía intraperitoneal a la dosis de 1mg/Kg de peso corporal. El compuesto **4** se disolvió en solución isotónica de NaCl y se inyectaron 5 μ L en el

ventrículo lateral derecho (ICV) y en el estriado anterior derecho (IE); para ello se empleó una jeringa Hamilton de 10 μ L provista de un tope, para aplicación precisa del compuesto. A un grupo de ratas canuladas se le realizó una lesión con 2,4,5-trihidroxifenetilamina o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) (112mM, pH=7,4). La solución neurotóxica fue infundida en el ventrículo lateral-derecho (ICV) y en el estriado anterior derecho (IE), con la ayuda de una inyectora Hamilton de 10 μ L a una dosis de 200 μ g/5 μ L. Para conocer si el compuesto **4** inducía en las ratas conductas estereotipadas; es decir, una actividad motora repetitiva y sin propósito, las observaciones se realizaron introduciendo a cada animal en una caja de observación de acrílico transparente con las dimensiones: 32x28x28 cm. Para cada una de las pruebas, se utilizaron grupos de cuatro animales, a los cuales se les evaluaron las siguientes conductas: lamidas, roídas (mordidas), olfateos y acicalamientos. Antes de la medición de la conducta estereotipada, los animales se introdujeron en la caja de observación y se dejaron por un período de 15 minutos para que se habituaran a la misma. Los datos recolectados se registraron empleando una computadora dotada de un software para contar el número de movimientos estereotipados. Las observaciones se realizaron por 60 minutos, divididos en 10 intervalos de 6 minutos cada uno (8,9,14-16). El compuesto **4** se inyectó de manera individual para cada grupo de prueba, a las dosis de 50 μ g/5 μ L y 5 μ g/5 μ L.

Posteriormente, se evaluó la conducta estereotipada inducida por el compuesto **4**, en los grupos de ratas pretratadas con haloperidol (0,2mg/Kg PC, i.p) un conocido antagonista de los receptores dopaminérgicos, ziprasidona (1mg/Kg PC, i.p) un antipsicótico atípico y buspirona (1mg/Kg PC, i.p) un agonista parcial de los receptores de serotonina (5HT_{1a}). Para tales efectos, se procedió a inyectar cada una de es-

tas drogas 15 minutos antes de la administración (ICV) o (IE) del compuesto evaluado. Con respecto al grupo de ratas canuladas, a las cuales se les practicó la lesión con 2,4,5-trihidroxifenetilamina o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) a nivel (ICV) o (IE), se les administró por estas vías el compuesto **4** a la dosis de 50µg/5µL.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media ± E.E.M. La significancia de los resultados fue analizada mediante el análisis de varianza de una y dos vías (ANOVA) (18) y la prueba de Newman-Keuls. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. El análisis de los resultados y la elaboración de los gráficos se realizaron empleando el programa GraphPadPrism versión 5.1.

RESULTADOS

En el presente trabajo se evaluó la actividad farmacológica preliminar del compuesto **4** (MAIL), a través de los estudios conductuales estereotipados a nivel ICV e IE, en dosis de 5µg/5µL y 50µg/5µL. Cuando se administró el compuesto **4** por la vía ICV, por sí solo, indujo cambios significativos en las respuestas estereotipadas (lamidas, acicalamientos y roídas) a las dosis de 5µg/5µL y 50µg/5µL, las cuales fueron bloqueados por el antipsicótico típico, haloperidol. Al administrar el compuesto, vía ICV, en dosis de 5µg/5µL y 50µg/5µL al grupo de ratas pretratadas con el antipsicótico atípico ziprasidona, se observó un aumento significativo de las lamidas y los acicalamientos. Así mismo la administración del compuesto **4**, vía ICV, en una dosis de 50µg/5µL, aumentó significativamente las lamidas y los acicalamientos en el grupo de ratas desnervadas por la neurotóxina 6-OHDA. También se observaron diferencias significativas en el pretratamiento con el agonista parcial 5HT_{1a}, buspirona, donde se observó un aumen-

to en las lamidas a la dosis de 50µg/5µL y disminución en los acicalamientos a ambas dosis (5µg/5µL y 50µg/5µL) (Fig. 3).

En cuanto a la administración del compuesto **4** por la vía IE a las dosis de 50µg/5µL y 5µg/5µL al grupo de ratas normales, indujo un aumento significativo de las cuatros conductas evaluadas (lamidas, acicalamientos, roídas y olfateos), mientras que, cuando se evaluó en ratas desnervadas (nivel estriatal) con la 6-OHDA, a la dosis de 50µg/5µL, las lamidas, los acicalamientos y los olfateos aumentaron significativamente (Fig. 4).

DISCUSIÓN

Es bien conocido que la estereotipia es el principal componente de varios desórdenes psiquiátricos, incluidos el autismo infantil (19) y la esquizofrenia (20). Se ha establecido que la estereotipia (olfateos y roídas), es un comportamiento dependiente de la dopamina y el sustrato neural del comportamiento estereotipado inducido por la apomorfina en animales, se debe a las proyecciones dopaminérgicas de la región de los núcleos caudado y putamen (21). La apomorfina es conocida por ser un agonista mixto de los receptores de dopamina D₁-D₂. La activación de los receptores de dopamina D₁-D₂ sobre el núcleo estriado es expresada como la respuesta de un comportamiento excesivo y repetitivo (estereotipia) (20-24). Es decir, que la activación de los receptores dopaminérgicos a nivel del sistema límbico expresa la conducta estereotipada de lamidas y acicalamientos, mientras que los olfateos y roídas son respuestas a la activación de los receptores a nivel del sistema extrapiramidal.

Para interpretar los resultados de este estudio es necesario analizar el mecanismo de acción farmacológico de los fármacos utilizados como patrones. La apomorfina interactúa sobre los receptores D₁-D₂, así como también el anta-

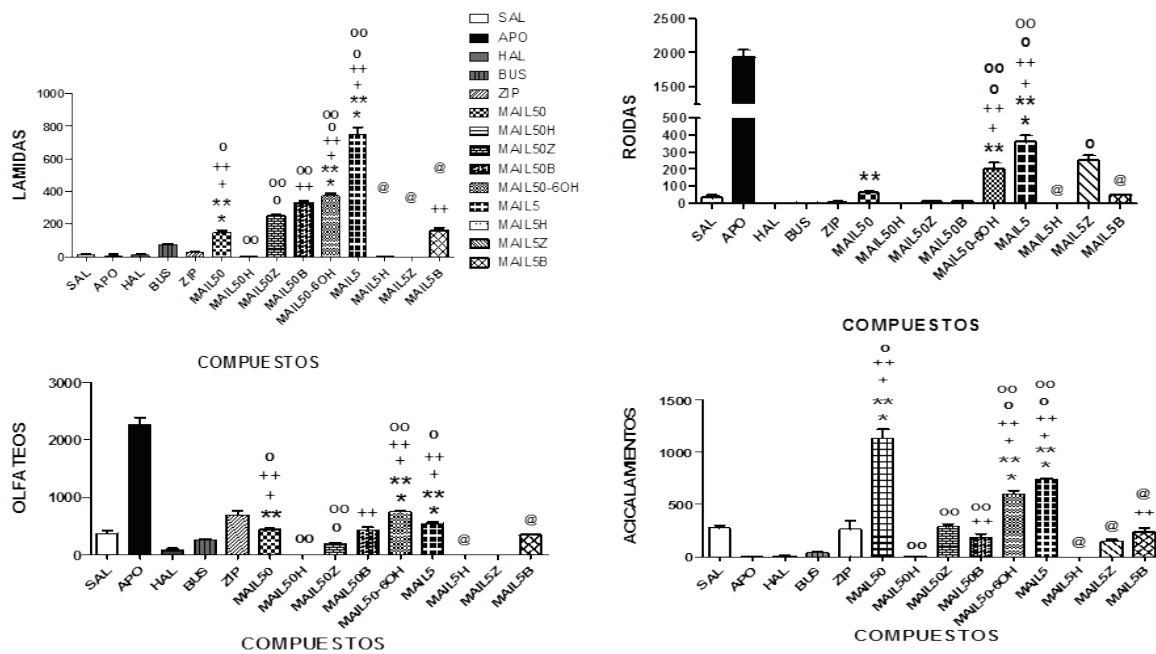


Fig.3. Efecto del compuesto 4 (MAIL) sobre la conducta estereotipada en ratas. En las ordenadas, la suma de las conductas medidas. En las abscisas, los compuestos probados. Las observaciones se realizaron durante una hora. Los resultados se expresaron como $X \pm EE$ de cuatro mediciones independientes. Los datos fueron analizados mediante análisis de variancia (ANOVA) de una y dos vías y la prueba de Newman-Keul. * diferencia significativa (ds) vs salina (SAL); ** ds vs apomorfina (APO); + ds vs haloperidol (HAL); ++ ds vs bupiriona (BUS); ° ds vs ziprasidona (ZIP); °° ds vs MAIL 50, @ ds vs MAIL 5. $P < 0,001$.

gonista del receptor dopaminérgico, haloperidol (antipsicótico típico). En cuanto a la ziprasidona, cuya acción farmacológica se diferencia del haloperidol, por ser un antipsicótico atípico, bloquea los receptores $5HT_{2a}$ y D_2 (en una proporción de 8:1 respectivamente) y es un agonista del receptor $5HT_{1a}$ (19,23,24). La bupiriona es un agonista parcial postsináptico del receptor $5HT_{1a}$ (25).

De acuerdo a los resultados farmacológicos preliminares (Fig.3), el compuesto 4 mostró un comportamiento estereotipado como agonista a nivel del sistema extrapiramidal (roídas) y en el sistema límbico (acicalamientos y lamidas). El bloqueo con haloperidol (antagonista no selectivo), demuestra su acción dopaminérgica en ambos sitios. Cabe destacar que el pretratamiento

con la ziprasidona, bloquea las respuestas dopaminérgicas en el sistema extrapiramidal (roídas) y aumenta las respuestas conductuales lamidas y acicalamientos, propios del sistema límbico. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Angel y col, quienes sintetizaron y evaluaron nuevos compuestos (5, 8, 9,13-16), y encontraron que la co-administración con ziprasidona, aumenta las lamidas y los acicalamientos.

Es importante reseñar que el bloqueo realizado con los antipsicóticos atípicos ziprasidona y clozapina, sobre las conductas estereotipadas ejercidas por la apomorfina, induce un aumento en las lamidas y los acicalamientos. Esto es debido al aumento del tono dopaminérgico, ya que al activar los receptores $5HT_{1a}$ y bloquear los

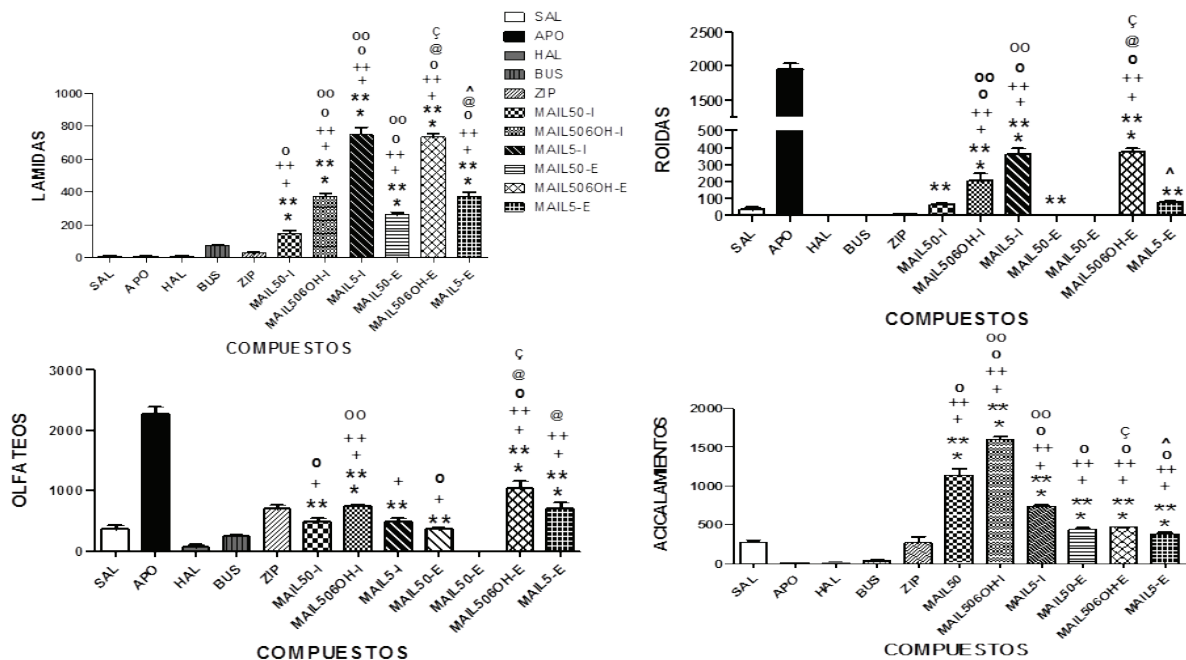


Fig.4. Efecto del compuesto 4 (MAIL) ICV y ESTRITATAL sobre la conducta estereotipada en ratas. En las ordenadas, la suma de las conductas medidas. En las abscisas, los compuestos probados. Las observaciones se realizaron durante una hora. Los resultados se expresaron como $X \pm EE$ de cuatro mediciones independientes. Los datos fueron analizados mediante análisis de variancia (ANOVA) de una y dos vías y la prueba de Newman-Keul. * diferencia significativa (ds) vs salina (SAL); ** ds vs apomorfina (APO); + ds vs haloperidol (HAL); ++ ds vs buspirona (BUS); ° ds vs ziprasidona (ZIP); °° ds vs MAIL 50 μg ICV (MAIL 50-I), @ ds vs MAIL 50 μg ESTRITATAL (MAIL 50-E); ç ds vs MAIL 50 μg denervación ICV (MAIL 506OH-I); ^ ds vs MAIL 5 μg ICV (MAIL5-I).

5HT_{2a} se genera un incremento selectivo de la liberación de dopamina en una región de la corteza prefrontal (sistema mesocortical). Por otro lado, se conoce que tanto la clozapina como la ziprasidona reducen la transmisión dopaminérgica al bloquear los receptores D₂ (sistema mesolímbico). Estos mecanismos moderan la reducción de la función dopaminérgica, lo cual explica la eficacia de la clozapina y la ziprasidona, sobre los síntomas positivos con menos producción de los movimientos extrapiramidales involuntarios y, al mismo tiempo, que se produce un bloqueo serotoninérgico, el cual podría explicar su eficacia sobre los síntomas negativos

y los desórdenes del humor (19,23,24). En el presente trabajo, el aumento en los acicalamientos y lamidas mostradas en el compuesto 4, está en concordancia con lo antes expuesto, ya que al interactuar la ziprasidona sobre los receptores 5HT_{1a} como agonista y 5HT_{2a} como antagonista, estaría aumentando la activación dopaminérgica a nivel del sistema límbico en concomitancia con la acción *per se* del compuesto en estudio.

Con el propósito de tener una aproximación más acertada sobre su posible mecanismo de acción, fue importante realizar la denervación presináptica de las neuronas dopaminérgicas,

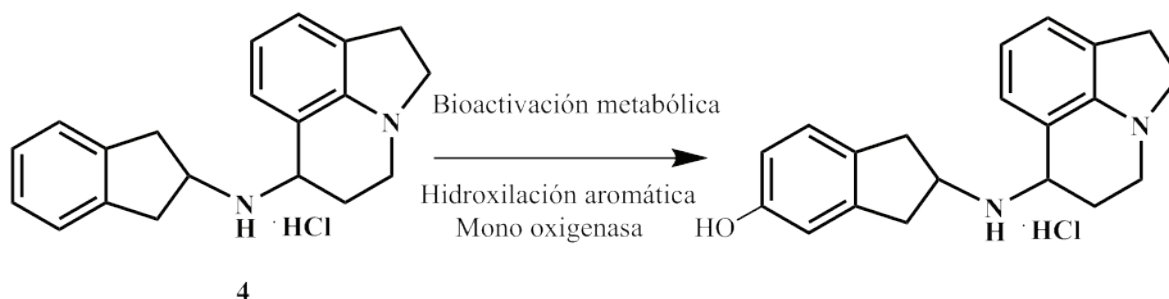


Fig.5. Bioactivación metabólica del compuesto MAIL 4.

a nivel ICV e IE, con la neurotoxina 6-OHDA (17). Esto obedece a la dificultad de conocer con certeza, el sitio de unión (debido a la imposibilidad en realizar los estudios de ligando “binding”) que desencadena la respuesta agonística ejercida por el compuesto a través de mecanismos dopaminérgicos centrales. Esa respuesta podría ser la resultante de una acción presináptica o postsináptica. En la vía presináptica el compuesto **4**, podría estar involucrado en la depleción del neurotransmisor o bien por un antagonismo sobre algún receptor dopaminérgico presináptico, mientras que en la vía postsináptica estaría interactuando sobre su propio receptor dopaminérgico. Los resultados del presente estudio demuestran que la acción agonista ejercida por el compuesto a través de mecanismos dopaminérgicos, proviene de la acción postsináptica, ya que al desnervar la neurona presináptica con la 6-OHDA y administrar el compuesto **4** vía ICV, aumentaron significativamente las lamidas y los acicalamientos, mientras que con la administración a nivel estriatal, las lamidas, los acicalamientos y los olfateos aumentaron significativamente. Es decir, la respuesta dopaminérgica ocurre a nivel postsináptico (Fig. 4).

Sin embargo, este resultado no es aún concluyente ya que la respuesta agonística podría venir por la acción del compuesto **4** sobre las neuronas serotoninérgicas. Valiéndose de que la bupiriona es un agonista parcial del receptor $5HT_{1a}$ postsináptico y que la respuesta farmaco-

lógica resultante entre un agonista parcial y uno total es un antagonismo a alta dosis y un agonismo a baja dosis, se procedió realizar esta evaluación con un grupo de ratas pretratadas con bupiriona (26). Si el compuesto **4** seguía este comportamiento, era indicativo que su actividad procedía a través del receptor $5HT_{1a^2}$ como agonista. Los agonistas del receptor $5HT_{1a^2}$ aumentan la liberación de dopamina a nivel central. Los resultados de este estudio revelan que la respuesta conductual estereotipada del compuesto **4** con la bupiriona, no está acorde con el patrón mostrado entre un agonista parcial y un agonista total; la respuesta farmacológica obtenida demuestra, que el compuesto **4** no está interactuando sobre el receptor $5HT_{1a}$. Al parecer sus respuestas estereotipadas son netamente dopaminérgicas; las evaluaciones de este estudio mostraron un aumento significativo en las lamidas a la dosis de $50\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ y una disminución en los acicalamientos a ambas dosis estudiadas (Fig. 3).

Posiblemente la activación dopaminérgica ejercida por el compuesto de estudio sea el producto de la interacción sobre los receptores dopaminérgicos ($D_2 > D_1$); ya que las respuestas farmacológicas validaron esta acción cuando se realizaron las denervaciones presinápticas dopaminérgicas tanto a nivel ICV como IE (zona rica de receptores $D_2 > D_1$) y los pretratamientos con haloperidol, ziprasidona y bupiriona. Por otro lado, aún no se descarta que el compues-

to **4** pueda estar interactuando al mismo tiempo sobre algún receptor de serotonina (5HT), que contribuya a aumentar el tono dopaminérgico. Sin embargo, los resultados de este estudio demuestran que el compuesto MAIL no interactúa sobre los receptores 5HT_{1a} y 5HT_{2a}, pero sí sobre los receptores dopaminérgicos a nivel postsináptico. Es importante mencionar lo acertado de la aproximación químico medicinal en el diseño de este compuesto, lo cual está en concordancia con los resultados farmacológicos preliminar, donde se revela la acción agonística a través de la activación de los mecanismos dopaminérgicos sobre el sistema nervioso central.

Desde el punto de vista químico medicinal la actividad mostrada por el compuesto **4** se debe a la incorporación de la estrategia de hibridación en su diseño, que permite la unión de dos fragmentos farmacofóricos a través de un enlace covalente. En una porción está presente el fragmento del 2-aminoindano **10** que contiene el farmacóforo parcial del receptor dopaminérgico y, en la otra, está presente el núcleo de la lolidina **15**. Los resultados obtenidos permiten proponer que el compuesto **4** al ser administrado ICV o IE podría sufrir una activación metabólica, por medio de una reacción de hidroxilación aromática en el núcleo 2-aminoindano y el producto metabólicamente activo guardaría una estrecha relación con el farmacóforo dopaminérgico (fragmento m-hidroxifeniletilamina), necesario para ejercer la actividad (Fig. 5). Vale la pena destacar las respuestas agonísticas mostradas por el compuesto **4**, cuando fue administrado por las vías ICV e IE. En la primera, el compuesto **4** tiene que atravesar membranas y difundirse hacia las diferentes estructuras cerebrales donde esté presente el sistema dopaminérgico y así ejercer su acción sobre su receptor, mientras que en la segunda vía, el compuesto **4** está presente en los sitios ricos de los receptores dopaminérgicos del tipo D₂ > D₁. Es decir que en ambas administraciones el compuesto MAIL,

debe sufrir la bioactivación metabólica para incorporar el farmacóforo dopaminérgico y, de esta manera, interactuar sobre el receptor dopaminérgico postsináptico. Los resultados farmacológicos obtenidos en estas dos vías validan la actividad agonística y, por otro lado, la lesión de las neuronas presinápticas con la 6-OHDA confirman su acción postsináptica. Durante el diseño del compuesto **4** se consideraron todas las aproximaciones químico medicinal y por ello los resultados farmacológicos confirman lo acertado de las consideraciones farmacofóricas enmarcadas en las estrategias de hibridación y el concepto de pro-fármaco. El hecho de contener dentro del anillo indano el farmacóforo parcial es considerado como un pro-fármaco y, a partir de la hidroxilación aromática (27-30), generaría el farmacóforo total (m-OH-feniletilamino) que estaría interactuando sobre el sistema dopaminérgico central (Fig. 5) y así estar en concordancia con los resultados de la desnervación presináptica en ambos sitios (ICV e IE).

En resumen, el novedoso compuesto **4** diseñado a través de la estrategia químico medicinal, guardando las aproximaciones farmacofóricas de los profármacos y obtenido mediante las rutas clásicas y heterocíclicas contenidas en la síntesis orgánica, mostró tener actividad agonística a través de la activación de los mecanismos dopaminérgicos centrales cuando se evaluó farmacológicamente en las vías ICV e IE.

AGRADECIMIENTOS

El autor Jorge E. Angel G. dedica este manuscrito a la memoria del Profesor Dr. Eliodoro Palacios†. Este trabajo fue subvencionado por el proyecto Fonacit N° 2012000788.

REFERENCIAS

1. **Beaulieu J M, Gainetdinov R R.** The physiology, signaling, and pharmacology of

- Dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 2011; 63:182-217.
- Clark A, McCorvy J, Watts V, Nichols D.** Assessment of dopamine D₁ receptor affinity and efficacy of three tetracyclic conformationally-restricted analogs of SKF38393. *Bioorg Med Chem* 2011; 19: 5420-5431.
 - Sachar B, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P.** Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochem Pharm* 2004; 67(10): 1965-1974.
 - Zhang A, Neumeyer J, Baldessarini R.** Recent progress in development of Dopamine receptor subtype-selective agents: Potential therapeutics for neurological and psychiatric disorders. *Chem Rev* 2007; 1(28): 274-302.
 - Andujar S, Garibotto F, Migliore de Angel B, Angel-Guío J, Charris J, Enriz, R.** Molecular recognition and binding mechanism of N-aralkyl substituted 2 aminoindans to the dopamine D₂ receptor. A theoretical study. *J Argent Chem Soc* 2006; 94:1-11.
 - Kaiser C, Jain T.** Third SCI-RSC Medicinal Chemistry Symposium. Medicinal chemistry of peripherally acting Dopamine receptor agonists. Edited by R. W. Lamberd. The Royal Society of Chemistry. Great Britain 1985; 133-165.
 - Cannon J, Pérez Z, Long J, Ilhan M.** 1-(Aminomethyl)-6,7-dihydroxytetralin derivatives: synthesis and assessment of dopamine-like effects. *J Med Chem* 1983; 26(6): 813-816.
 - Angel J, Andujar S, Migliore de Angel B, Charris J, Israel A, Suárez-Roca H, López S, Garrido M, Cabrera E, Visbal G, Rosales C, Suvire F, Enriz R.** Synthesis, dopaminergic profile and molecular dynamics calculations of N-Aralkyl substituted 2-aminoindans. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 3233-3244.
 - Angel J, Santiago A, Rossi R, Migliore de Angel B, Barolo S, Andujar S, Hernández V, Rosales C, Charris J E, Suarez-Roca H, Israel A, Ramírez M M, Ortega J, Herrera Cano N, Enriz RD.** Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of methoxilated indoles with possible dopaminergic central action. *Lat Am J Pharm* 2011; 30 (10): 1934-1942.
 - Charris J, Pérez J, Domínguez J, Angel J, Duerto Z, Salazar M, Acosta H.** N-aralkyl substitution of 2-aminoindans. Synthesis and their inotropic and chronotropic activity in isolated guinea pig atria. *Drug Res* 1997; 47(11): 1208-1210.
 - Rapoport H, Tretter J.** 1-Ketolilolidine and some of its reactions. *J. Org. Chem* 1958; 23 (2): 248-251.
 - Ramírez M M, Migliore de Ángel B, Ángel Guío J E.** Avances en la síntesis de los sistemas 1-,2- y 3-benzazepinas y su aplicación en el diseño de nuevos compuestos con actividad farmacológica en el sistema nervioso central. *Revista de la Universidad del Zulia* 2011; 2 (3): 7-33.
 - Ramírez M M, Balza K, Acurero G, Ortega J, Rosales C, Rossi R, Santiago A, Basso S, Migliore de Angel B, Suarez-Roca H, Charris J E, Enriz R D, Angel Guio J E.** Síntesis de noveles compuestos: derivados de la quinolina, la lilolidina, y el adamantano con posible actividad dopaminérgica central. *Ciencia* 2012; 20: 32-42.
 - Ferrer R E, Urdaneta N C, Porta N, Rodríguez L Ch, Rosales C C, Espinoza G A, Angel L B, Balza K, Perdomo L E, Faria A R, Dabian A S, Zapata M V, Lineiro A R, Acurero G A, Israel A, Garrido M R, Suárez-Roca H, Migliore de Angel B, López S E, Charris J, Ramírez M M,**

- Angel J E. Novedosos agentes dopaminérgicos centrales derivados del 2-aminoindano- 4,7 disustituido atípico. Síntesis y perfil farmacológico central. *Invest Clin* 2015; 56(2): 137-154.
15. **Perdomo L E, Balza K, Acurero G A, Angel L B, Dabian A S, Faría A R, Linero A R, Zapata M V, Vera M, Migliore de Angel B, Suárez-Roca H, Israel A, Charris J, López S E, Ramírez M M, Angel J E.** Design, synthesis and preliminary pharmacologic evaluation of 2-aminoindane-quinoline analogs as dopaminergic agents. *Der Pharm Chem* 2015; 7(5): 130-135.
 16. **Angel L B, Balza K, Perdomo L E, Dabian A S, Faría A R, Linero A R, Migliore de Angel B, Suárez-Roca H, Charris J, Israel A, Ramírez de Bracho M M, Angel J E.** Síntesis y evaluación farmacológica preliminar de nuevos compuestos quinolínicos con actividad anti corea de huntington. *Revista de la Facultad de Farmacia* 2015; 78 (1-2): 94-100.
 17. **Francis-Turner L, Bergado A J, Bergado R J.** Efectos del factor de crecimiento nervioso (ngF) sobre la conducta en un modelo experimental de corea de huntington en ratas. *Rev Tumbaga* 2006; 1(1): 55-68.
 18. **Snedecord G, Cochnar W.** *Statistical Methods*. Seventh Ed. Iowa State University Press, Amer. 1982. Ser. Printing.
 19. **Seeger T F, Seymour P A, Schmidt A W, Zorn S H, Schulz D W, Lebel L A, McLean S, Guanowsky V, Howard H R, Lowe J A.** Ziprasidone (CP-88,059): A new antipsychotic with combined dopamine and serotonin receptor antagonist activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 101-13.
 20. **Rollema H.** 5HT_{1a} receptor activation contributes to Ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 229-237.
 21. **Costall B, Marsden C D, Naylor R J, Pycocock C J.** Stereotyped behavior patterns and hyperactivity induced by amphetamine and apomorphine after discrete 6-hydroxydopamine lesions of extrapyramidal and mesolimbic nucleus. *Brain Res* 1977; 123: 89-111.
 22. **Costall B, Naylor R J, Cannon J G, Lee T J.** Differentiation of the dopamine mechanisms mediating stereotyped behavior and hyperactivity in the nucleus accumbens and caudate-putamen. *J Pharm Pharmacol* 1977; 29(6): 337-342.
 23. **Kapur S, Roy P, Daskalakis J, Remington G, Zipursky R.** Increased dopamine D₂ receptor occupancy and elevated prolactin level associated with addition of haloperidol to clozapine. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 311-314.
 24. **Bardin L, Kleven M S, Barret-Grévoz C, Depoortere R, Newman-Tancredi A.** Antipsychotic-like vs. cataleptogenic actions in mice of novel antipsychotics having D₂ antagonist and 5-HT_{1a} agonist properties. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31(9): 1869-1879.
 25. **Murphy S.** Comparative assessment of efficacy and withdrawal symptoms after 6 and 12 weeks treatment with diazepam or buspirone. *Br J Psychiatry* 1985; 154: 529-534.
 26. **Florez F.** *Farmacología Humana*. Tercera Edición. España: Editorial Masson S.A; 1997, p 7.
 27. **Fuller R W, Hines C W.** Tissue levels of chloroamphetamines in rats and mice. *J Pharm Sci* 1967; 56(2): 302-303.
 28. **Fuller R W, Perry K W, Baker J C, Parli C J, Lee N, Day W A, Molloy B.** Comparison of the oxime and the hydroxylamine derivatives of 4-chloroamphetamine as depletors of brain 5-hydroxyindoles. *Bio-*

chem Pharmacol 1974; 23: 3267-3272.

29. **Fuller R W, Baker J C, Molloy B B.** Biological disposition of rigid analogs of amphetamine. J Pharm Sci 1977; 66: 271-272.
30. **Irino O, Tateishi M, Miura C, Fukawa K.** Studies on absorption, biotransformation and excretion of drug. II. Metabolism of 2-indanamine. Chem Pharm Bull 1972; 20(4): 734-740.