

Síntesis racional de inhibidores de la enzima HDAC6 para el tratamiento del Alzheimer.

Laura Carrascosa Sánchez^{1, 2, a}, Óscar Bautista Aguilera^{2, b}, Isabel Iriepa Canalda^{2, c}

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Grupo de investigación DISCOBAC, Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares.

a. laura.carrascosa@edu.uah.es b. oscar.bautista@uah.es c. isabel.iriapa@uah.es

Palabras clave: HDAC6; Alzheimer; ácidos tiohidroxámicos; ácidos hidroxámicos

Resumen

La enfermedad del Alzheimer es una patología neurodegenerativa cuya incidencia representa uno de los principales desafíos a los que se enfrenta la sociedad actual, particularmente debido a la ausencia de terapias efectivas y al progresivo envejecimiento de la población. En los últimos años, se ha puesto de manifiesto el papel crucial que desempeñan los microtúbulos y el citoesqueleto celular en la fisiopatología de esta enfermedad, en estrecha relación con la hipótesis del Alzheimer basada en la disfunción de la proteína Tau. En este contexto, la histona desacetilasa 6 (HDAC6), una enzima citoplasmática sobre expresada en los pacientes que padecen esta enfermedad, ha surgido como una diana terapéutica prometedora debido a su relevante implicación en la desacetilación de α -tubulina, afectando así directamente la dinámica y estabilidad de los microtúbulos. El presente trabajo propone el diseño racional y la síntesis de nuevos inhibidores selectivos de HDAC6, con el objetivo de desarrollar tratamientos más eficaces frente a la enfermedad de Alzheimer. Tradicionalmente, los inhibidores de esta enzima han empleado ácidos hidroxámicos como grupos funcionales principales. En este estudio se propone la sustitución de dichos grupos por ácidos tiohidroxámicos, partiendo de la hipótesis de que estos compuestos, debido a sus propiedades estructurales, podrían conferir una mayor eficacia inhibidora, así como una mejor selectividad hacia HDAC6, en comparación con sus análogos hidroxámicos.

Cita: Carrascosa Sánchez, Laura; Bautista Aguilera, Óscar; Iriepa Canalda, Isabel (2025) Síntesis racional de inhibidores de la enzima HDAC6 para el tratamiento del Alzheimer. *dianas* 14 (2): e202509fp01. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202509fp01 <https://dianas.web.uah.es/journal/e202509fp01>.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>. DOI <https://doi.org/10.37536/DIANAS>

Copyright: © Carrascosa-Sánchez L, Bautista-Aguilera, Iriepa-Canalda I. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La enfermedad del Alzheimer (EA) constituye la causa más común de demencia a nivel mundial y su prevalencia aumenta drásticamente con la edad [1]. Con el envejecimiento global de la población y ante la ausencia de una cura efectiva, se estima que el número de personas afectadas por esta enfermedad se disparará en las próximas décadas. Se prevé que los casos se dupliquen cada 20 años, afectando a 65.7 millones de personas en 2030 y 115.4 millones en 2050 de personas en el mundo, posicionando a esta patología como uno de los mayores desafíos de salud pública a nivel mundial [2].

A pesar de los avances, la etiología exacta de la EA sigue siendo desconocida, lo que dificulta la identificación de dianas terapéuticas eficaces para tratar la enfermedad. Actualmente no existen tratamientos que modifiquen significativamente la enfermedad, únicamente se dispone de fármacos que se centran meramente en la sintomatología de la enfermedad, con eficacia limitada y que no frenan sustancialmente la neurodegeneración [3].

La estrategia terapéutica predominante en el abordaje de la EA se ha centrado, principalmente, en la reducción de los depósitos extracelulares del péptido β -amiloide, considerado uno de los principales marcadores histopatológicos de la enfermedad. Los últimos fármacos aprobados por la FDA para la EA siguen esta estrategia y son anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido β -amiloide, como el lecanemab y el donanemab. No obstante, su eficacia clínica es limitada y su perfil de seguridad presenta riesgos elevados, lo que ha dificultado su aprobación en países europeos [4]. Ante esta situación, se exploran nuevas dianas terapéuticas, entre las cuales la proteína Tau ha emergido como una de las más prometedoras por su papel crucial en la fisiopatología de la EA. En condiciones fisiológicas, Tau es una fosfoproteína asociada a los microtúbulos, donde estabiliza las uniones entre subunidades de α - y β -tubulina manteniendo así la integridad estructural del citoesqueleto neuronal. En la EA, Tau sufre un proceso anómalo de hiperfosforilación que conduce a la disociación de los microtúbulos y su agregación en forma de ovillos neurofibrilares intracelulares. Esta disrupción compromete gravemente al citoesqueleto celular y al

transporte axonal, imposibilitando la formación de axones y dendritas, y contribuyendo significativamente al proceso neurodegenerativo observado en la EA [5].

La histona desacetilasa 6 (HDAC6) ha demostrado tener un papel determinante en diversas patologías neurodegenerativas, lo que la posiciona como una diana terapéutica de gran interés. En el caso de la EA, se ha documentado una sobreexpresión de esta enzima en el hipocampo de los pacientes, así como su relación con las dos hipótesis principales de la enfermedad, ya que disminuye la fosforilación de la proteína Tau y la agregación del péptido β -Amiloide [6-8]. La inhibición de HDAC6 aumenta la acetilación de la α tubulina, evento que favorece la estabilización de los microtúbulos neuronales, confiriéndoles mayor resistencia a la despolimerización y mejorando así su transporte axonal. Por otra parte, estudios recientes sugieren que la inhibición de esta enzima también podría reducir la neuroinflamación y favorecer la autofagia. En particular se ha observado una mejora en la formación de autofagosomas y su transporte, lo cual contribuye a una mayor eficiencia en la degradación de proteínas mal plegadas, favoreciendo así a una mejor actividad de la función cognitiva [9]. Cabe destacar que HDAC6 presenta una estructura única dentro de su familia al ser la única isoforma que posee dos dominios catalíticos y un dominio de unión al zinc. Esta singularidad la convierte en una diana perfecta ya que se puede conseguir una inhibición específica sin elevados efectos secundarios.

Hasta ahora, el grupo funcional principal presente en los inhibidores de HDAC 6 han sido los ácidos hidroxámicos como podemos observar en compuestos ampliamente estudiados como el Vorinostat (SAHA) o la Tricostatina A (TSA) [10]. Los ácidos hidroxámicos se unen específicamente al ion Zn^{2+} localizado en el sitio activo de la enzima. Sin embargo, estas moléculas carecen de la especificidad inicialmente esperada, lo que lleva a la aparición de múltiples efectos secundarios no deseados. Los ácidos hidroxámicos han demostrado una toxicidad considerable, dificultando mucho su aplicación en la práctica clínica [11]. Lo que se pretende con este trabajo es explorar alternativas funcionales que permitan una unión más eficaz y selectiva al ion zinc, y además que proporcione mayor seguridad. Por ello, se propone la sustitución de los ácidos hidroxámicos por los ácidos tiohidroxámicos, en el que el átomo de oxígeno carbonílico es reemplazado por un átomo de azufre, lo cual proponemos que puede ser clave en este proceso y puede mejorar la afinidad hacia HDAC6. Además, los tiohidroxámicos representan una alternativa más segura. Su mayor estabilidad química y la ausencia de subproductos tóxicos, como ocurre con los isocianatos en el caso de los ácidos hidroxámicos, los convierte en una alternativa prometedora para el diseño de sistemas más controlables y menos tóxicos [12, 13].

Desde el punto de vista teórico, el Zn^{2+} , puede actuar como un ácido de Lewis en la frontera entre duro y blando con una configuración electrónica $[Ar] 3d^{10}$, presenta una nube electrónica altamente polarizable o deformable. Según la teoría ácido-base duro-blando (HSAB), los ácidos blandos prefieren unirse a bases blandas y, los ácidos duros tienden a interactuar con bases duras. Por ello, el azufre, al ser una base blanda de Lewis con electrones de valencia más difusos y polarizables que los del oxígeno, el cual es más pequeño y presenta electrones más compactos (base de Lewis dura), establece una interacción más afín y probable. Esta interacción, que sería de naturaleza covalente, se basaría en un solapamiento de orbitales más eficiente, incluyendo los orbitales σ , que fortalecería la unión, en comparación con la que se forma con el oxígeno. En consecuencia, se espera que los ácidos tiohidroxámicos actúen como inhibidores más potentes y selectivos para HDAC6.

Bajo este enfoque, se propone en este proyecto la síntesis orgánica de una serie de moléculas compuesta por ácidos hidroxámicos y ácidos tiohidroxámicos que puedan ser comparables entre sí, **Figura 1**.

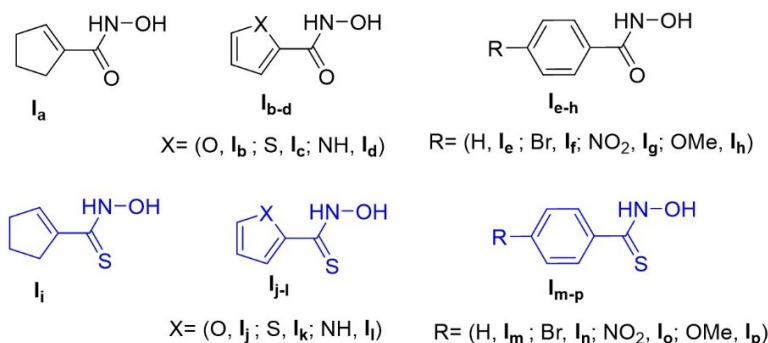


Figura 1.- Serie de compuestos propuesta para síntesis y evaluación biológica. Se incluyen ácidos hidroxámicos (I_{a-h} en negro) y ácidos tiohidroxámicos (I_{i-p} en azul).

En este trabajo también se analizarán las moléculas computacionalmente mediante un estudio de *docking*, así como estudios de complejación con el ion Zn^{2+} , con el objetivo de validar la hipótesis basada en la teoría HSAB previamente expuesta. Asimismo, se llevarán a cabo ensayos biológicos para evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos sobre la enzima HDAC6, lo que permitirá determinar si los resultados teóricos y químicos se traducen en una inhibición efectiva en un contexto enzimático real.

En caso de obtener resultados prometedores, futuras líneas de investigación contemplarán la evaluación de estos compuestos en modelos celulares neuronales. Además, se analizarán las posibles implicaciones sobre las propiedades nanomecánicas de las células, con el fin de estudiar su efecto sobre la estabilidad del citoesqueleto neuronal y el transporte axonal.

Materiales y métodos

Síntesis orgánica

En la mayoría de los casos se emplearon reactivos comerciales sin necesidad de purificación previa, o bien productos previamente purificados. La mayor parte del trabajo se llevó a cabo bajo atmósfera inerte de argón, utilizando disolventes anhidros previamente secados sobre tamiz molecular de 3 Å. Las reacciones realizadas en condiciones estándar de presión y temperatura se indican específicamente.

El seguimiento de las reacciones se efectuó mediante cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas ALUGRAM® SIL G/UV (Macherey-Nagel), visualizadas bajo lámpara UV de 254 nm.

Las purificaciones por cromatografía en columna se realizaron tanto manualmente como mediante el sistema Isolera One (Biotage), utilizando columnas preempaquetadas ExtraBond® Flash SLLN (Scharlau).

La caracterización de los compuestos se realizó mediante técnicas estándar:

- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , utilizando un espectrómetro Bruker de 400 MHz a 298 K. Los desplazamientos químicos se expresan en escala δ (ppm), usando como referencia interna las señales de los disolventes deuterados (CDCl_3 : 7,26 ppm para ^1H y 77,2 ppm para ^{13}C ; $\text{DMSO}-d_6$: 2,50 / 39,5 ppm; CD_3OD : 3,31 / 49,00 ppm). La multiplicidad de las señales en ^1H -RMN se indica como: s (single), d (doblete), t (triplete), y m (multiplete).
- Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), realizada en un equipo Bruker MAXIS II con analizador Q-TOF, acoplado a un sistema HPLC Agilent 1100 con detector de diodo array y UPLC Waters Acquity I Class.

En cuanto a los procesos experimentales, la síntesis de los ácidos hidroxámicos y de los ácidos tiohidroxámicos se llevó a cabo siguiendo los siguientes esquemas de síntesis:

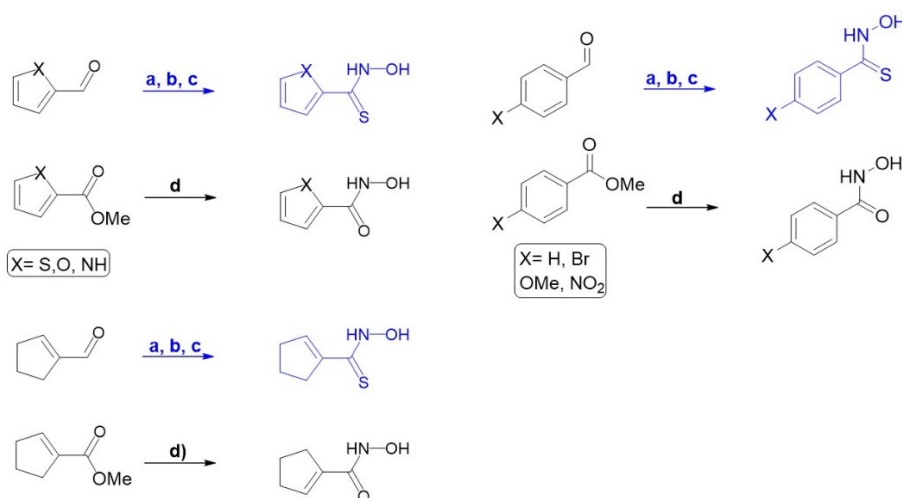


Figura 2.- Esquema de síntesis de la serie de compuestos **Ia-p**. Síntesis de ácidos tiohidroxámicos **Ia-p**, en azul a) Reacción de formación de la oxima, NH_2OH , NaOH , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, ta; b) Reacción de formación de la cloroxima, NCS , DMF , ta; c) Reacción de formación del ácido tiohidroxámico, $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, TEA , Et_2O , ta. Síntesis de los ácidos hidroxámicos **Ia-h**, en negro d) NH_2OH (Aq), NaOH , THF , ta.

Para la reacción de formación de oximas, reacción **a**) de la **Figura 2**, se disuelve 1 equivalente del aldehído en una mezcla de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:2, v/v), utilizando un volumen total de 10 mL de disolvente por gramo de compuesto. A continuación, se añade 1,2 equivalentes de $\text{H}_2\text{N}-\text{OH}$ y 1,2 equivalentes de NaOH y se deja en agitación durante 1 hora. Una vez completada la reacción (c.c.f.), se elimina el MeOH a vacío y luego se realiza una extracción con Et_2O . Las fases orgánicas se recogen y se secan sobre sulfato sódico, se filtran y se elimina el disolvente a vacío.

Para la reacción de formación de cloroximas, reacción **b**), la oxima resultante del procedimiento anterior, 1equivalente, se disuelve en la mínima cantidad de DMF . La reacción se lleva a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ en baño de acetona con nitrógeno líquido, y se añaden gota a gota 1,2 equivalentes de NCS que previamente habíamos dividido en viales y habíamos disuelto en la mínima cantidad de DMF . Los viales se cubren con papel albal ya que NCS es fotosensible. La reacción se deja en agitación durante 2h a temperatura ambiente y cubierta con papel albal. Una vez completada (c.c.f.), se extrae con Et_2O y H_2O , y la fase orgánica obtenida se seca con

Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a vacío. El producto obtenido se purifica por columna cromatográfica manual en gel de sílice con un gradiente ascendente de Hexano: EtOAc de 100:0-98:2-95:5 (v:v).

Por último, para la reacción final, **c)** de la **Figura 2**, 1 equivalente de la cloroxima obtenida, se disuelve en Et₂O, aproximadamente 85 mL por gramo de cloroxima. A continuación, se añade una disolución acuosa de Na₂S (6 equivalentes), aproximadamente 10 mL por cada gramo de reactivo. Seguidamente se añade 1 equivalente de TEA y se agita durante 2 horas. Una vez completada la reacción (c.c.f.), se realiza una extracción con Et₂O y H₂O. Las fases acuosas se recogen y se acidifican hasta pH 2. Se extrae una segunda vez con DCM y H₂O, y esta vez se recogen las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a vacío. El producto se purifica por columna automática en gel de sílice en gradiente DCM: MeOH de 100:0 a 98:2 (v:v) [14].

Por otro lado, la síntesis de los ácidos hidroxámicos se llevó a cabo siguiendo la ruta **d)** representada en la **Figura 2**. La reacción de formación de ácidos hidroxámicos se realiza en condiciones estándar, sin requerir atmósfera inerte, y puede iniciarse indistintamente a partir del éster metílico o etílico del ácido correspondiente. Se emplean 4 equivalentes de NaOH y 28 equivalentes de hidroxilamina acuosa (NH₂OH). Una vez disueltos completamente los reactivos, se adiciona lentamente el éster; en caso de ser sólido, este se disuelve previamente en la mínima cantidad de tetrahidrofurano (THF). La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación a temperatura ambiente durante 12–16 horas. Finalizado el tiempo de reacción, y tras confirmar la conversión completa mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.), se procede a la neutralización del medio con HCl 1 M. Posteriormente, se elimina el disolvente bajo presión reducida. El producto bruto se purifica mediante cromatografía automática en columna de gel de sílice, utilizando un gradiente de diclorometano/metanol (DCM:MeOH) desde 100:0 hasta 98:2 (v/v).

Ensayos de complejación

Con el objetivo de analizar la unión que se establecería entre los distintos inhibidores de HDAC6 y el Zn²⁺ del sitio activo de la enzima, se propone este ensayo basado en espectroscopía UV-Vis para evaluar la formación de complejos metal-ligando entre los inhibidores y el trifluorometanosulfonato de zinc. Las interacciones de unión se cuantificarán mediante la determinación de las constantes de complejación utilizando la ecuación de Benesi-Hildebrand, **Figura 3**. Además, se analizarán parámetros termodinámicos como entalpía, entropía y energía libre de Gibbs a distintas temperaturas, con el fin de evaluar la estabilidad de los complejos formados con Zn²⁺.

Para su realización, 10 µL de los inhibidores (**la-p**) se adicionarían a 6 disoluciones acuosas de triflato de zinc de concentraciones 0, 5, 10, 20, 100 y 200 µM, el volumen final de sistema se llevará a 1 mL con H₂O. Las soluciones se agitarán simultáneamente a 25 °C (298 K) durante 1 hora, una vez el sistema está equilibrado se mide la absorbancia. Se repetirá el procedimiento a 30, 35, 40, 45 y 50 °C.

$$a) \frac{1}{A-A_0} = \frac{1}{K_a \Delta \epsilon [Zn^{2+}]} + \frac{1}{\Delta \epsilon} \quad b) \ln K_a = \frac{\Delta S}{R} - \frac{1}{\Delta H RT}$$

Ecuación de Benesi-Hildebrand Ecuación de Van't Hoff

Figura 3.-Ecuaciones para el ensayo de complejación. a) Ecuación de Benesi- Hildebrand, cuyos componentes son: A, absorbancia del sistema en presencia de Zn²⁺; A₀, absorbancia del sistema sin Zn²⁺; K_a, constante de asociación; [Zn], concentración de ion metálico Zn²⁺; Δε, diferencia de absorbancia entre el complejo y el blanco. b) Ecuación de Vant'Hoff, cuyos componentes son: K_a, constante de asociación; ΔS entropía estándar del proceso para una temperatura; ΔH entalpía estándar para una temperatura; T, temperatura del sistema en kelvin; R, constante de los gases (8.314 J/mol·K).

Con los datos recogidos y la ecuación de Benesi-Hildebrand obtendremos para cada inhibidor 6 constantes de asociación a las diferentes temperaturas que hemos utilizado.

Para hallar los valores de los parámetros termodinámicos citados anteriormente utilizaremos la ecuación de Vant'Hoff, **Figura 3**, y analizaremos los datos obtenidos.

Se esperaría obtener valores más altos de K_a y más negativos de ΔG° para los ácidos tiohidroxámicos en comparación con los ácidos hidroxámicos, lo cual indicaría una interacción más fuerte, estable y termodinámicamente favorable con el Zn²⁺, posicionándolos como mejores candidatos funcionales.

Ensayos biológicos

Para el ensayo de la actividad inhibidora de las diferentes moléculas a sintetizar, se propone utilizar el kit de ensayo de fluorescencia para HDAC6 de BPS Bioscience (Número de catálogo: 50076). Los ensayos se realizarán siguiendo el protocolo del fabricante. Se obtendrán los datos de fluorescencia de cada molécula a distintas concentraciones 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM, y de los controles: un blanco, un control

positivo sin inhibidor y un control negativo con el inhibidor Tricostatina A (2 μ M). El ensayo se repetirá una segunda vez y se representarán los datos gráficamente y se hallarán las IC₅₀ de cada inhibidor. Se espera que las IC₅₀ de los ácidos tiohidroxámicos tengan valores más bajos que los ácidos hidroxámicos, lo que nos demostraría que inhibidores más potentes.

Docking

Para el estudio computacional, se empleó la estructura cristalina de HDAC6 (PDB ID: 5EDU) junto con los códigos SMILES de los distintos inhibidores generados con *ChemDraw*. La estructura de la enzima fue preparada para el acoplamiento molecular utilizando *ChimeraX*. Posteriormente, los compuestos se acoplaron al sitio activo de HDAC6 mediante el programa *SwissDock*. Con los resultados del *docking* se ha comparado cada pareja, el hidroxámico con su tiohidroxámico. Se han tenido en cuenta para la comparación, los datos de *AC Score* (*Attracting Cavities Score*), que nos indica la estabilidad del complejo y cuál es la mejor pose de la molécula dentro de la enzima; el *SwissParam Score*, que indica cuanto más afin es la molécula a la enzima. Ambos datos fueron obtenidos mediante *SwissDock*, y en ambos casos, cuanto menor sea el valor obtenido, mejor será el candidato. Las visualizaciones moleculares fueron generadas utilizando *ChimeraX* y también se obtuvieron las distancias entre los grupos funcionales y el zinc del sitio catalítico 2 de la enzima [15, 16].

Resultados y discusión

Síntesis orgánica

Para llegar a los esquemas de síntesis finales (**1a-p**) se exploraron previamente diversas condiciones de reacción, especialmente en el caso de los ácidos tiohidroxámicos, ya que, para los ácidos hidroxámicos se partió de condiciones previamente optimizadas por el grupo de la profesora Isabel Iriepa Canalda.

Para obtener los ácidos tiohidroxámicos, **1a-p**, primero se ensayó a partir de los ácidos hidroxámicos, el objetivo al principio fue sintetizarlos en una sola reacción, como se muestra en la **Figura 4**. Se añadió 1 eq. del ácido hidroxámico correspondiente a 150 °C disuelto en la mínima cantidad de tolueno, seguidamente se añadió el reactivo de Laweson y se dejó en agitación. También se probó sustituyendo el tolueno por THF y realizando la adición de Laweson poco a poco, pero ninguna de ellas funcionó. Se probó entonces a realizar la síntesis desde los ésteres correspondientes, tanto ésteres metílicos como etílicos (1 eq.), el reactivo de Laweson y la mínima cantidad de tolueno en el microondas, 1 hora agitando a 110 °C. Luego se extrajeron las fases orgánicas con EtOAc, se secaron y se eliminó el disolvente a vacío, pero no funcionó la reacción. Por último, se probó la misma reacción sin la utilización de microondas, pero sustituyendo el tolueno por éter etílico, y de nuevo no obtuvimos el resultado esperado. Es por ello por lo que se decidió sintetizar los ácidos tiohidroxámicos como se muestra en la **Figura 2**. Partiendo del aldehído se sintetiza la oxima, luego la cloroxima y por último ya la molécula final deseada.

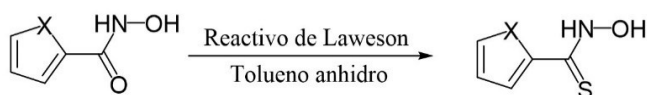


Figura 4.-Ensayo de formación de ácidos tiohidroxámicos.

Para la reacción de formación de la oxima, antes de llegar las a condiciones finales de la **Figura 2**, primero se ensayó con el aldehído de partida (1eq.), hidroxilamina (1,2 eq.) y piridina (2,4 eq.) en 6 ml de MeOH por cada 0,5 g de producto de partida. La reacción se agitó durante 1,5h. A continuación, se neutralizó la reacción con HCl 0,1 M y se extrajo con acetato de etilo. También se añadieron 8 equivalentes de Na₂SO₄, dado que se trata de una reacción de condensación y sería conveniente eliminar el agua generada para evitar la reversión de la reacción. Sin embargo, en ninguno de los dos casos se obtuvieron resultados satisfactorios. Teniendo en cuenta estos resultados, se utilizó trietilamina como sustituto de la piridina. Así, se hizo reaccionar la NH₂OH con la trietilamina durante media hora y luego se añadió el aldehído, la reacción se agitó durante 24 horas. Una vez completada (c.c.f.), se neutralizó con HCl 0.1M y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se recogió, se secó y se eliminó el disolvente a vacío. También se probó una variante por adición de 8 equivalentes de Na₂SO₄. Con ambas condiciones de reacción se consiguió obtener la oxima correspondiente. Por último, las oximas se purificaron por columna de sílice automática con un gradiente de Hexano: AcOEt 10%. La optimización de la reacción, siguiendo el protocolo de la **Figura 2**, nos permitió obtener los productos con un 100 % de rendimiento, sin necesidad de purificar y en solo 1 hora.

Una vez sintetizadas las oximas, resultó más sencillo optimizar la reacción de formación de cloroximas. Se ensayó el uso de acetonitrilo como disolvente en lugar de DMF, siguiendo el protocolo de la **Figura 2**, pero el rendimiento disminuyó. También se probó añadir la NCS sólida de forma gradual durante 10 minutos, manteniendo la mezcla en un baño de hielo a 0 °C. Sin embargo, el procedimiento más eficiente fue el

descrito en el apartado de Materiales y Métodos, en el cual, la NCS disuelta previamente en la mínima cantidad de DMF, se añade gota a gota en un baño de acetona a -20°C .

Por último, la reacción de formación del ácido tiohidroxámico presentó cierta dificultad. Inicialmente se intentó reproducir las condiciones reportadas por el grupo del Prof. Joshua G. Pierce de la Universidad de Carolina del Norte, pero no se lograba obtener el producto deseado [14]. Ante estos resultados, se optó por contactar con el investigador con el objetivo de conseguir recomendaciones que permitieran optimizar la reacción, lo que condujo a las condiciones recogidas en la **Figura 2**. Los principales ajustes consistieron en emplear 6 equivalentes de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en lugar de los 3 utilizados inicialmente, y en mejorar la agitación, ya que la reacción transcurre en un sistema bifásico, H_2O y éter etílico. Se observó que mantener una agitación intensa y constante, utilizando un matraz amplio, era clave para favorecer el contacto entre ambas fases. Aunque los rendimientos mejoraron tras implementar estas modificaciones, continuaron siendo inferiores a los esperados.

Una vez optimizadas las condiciones de reacción, se obtuvieron los ácidos tiohidroxámicos derivados del benceno (**Im**) y del tiofeno (**Ik**), cuyas caracterizaciones se presentan a continuación.

Im: Se obtuvo un aceite amarillo verdoso con un rendimiento del 36%. Se intentó cristalizar, pero para ello se debía solidificar primero, el producto resultante fue un sólido verdoso, disminuyó el rendimiento al 11% (54 mg).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8,89 (s, 2H, OH, NH), 7,68 (d, 2H, Ar), 7,48 (t, 1H, Ar), 7,42 (t, 2H, Ar); ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 123,66 (C=S), 119,90 (C Ar), 117,46 (CH Ar), 117,22 (CH Ar), 115,56 (CH Ar), 107,98 (CH Ar), 104,37 (CH Ar).

HRMS (ESI): calculado de $\text{C}_7\text{H}_7\text{NOS}$ $[\text{H}]^+$: 153,20; encontrado: 153,20.

Ik: Se obtuvo un aceite negro con un rendimiento del 38%, pero impuro, por ello se intentó solidificar con el objetivo de cristalizarlo posteriormente. Se obtuvo un sólido negro con un rendimiento del 1% que no está puro (10 mg).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,45 (d, 2H, Ar), 7,08 (t, 1H, Ar); ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 185,66 (C=S), 137,71 (C Ar), 127,79 (CH Ar), 124,66 (CH Ar), 118,77 (CH Ar).

HRMS (ESI): calculado de $\text{C}_5\text{H}_5\text{NOS}_2$ $[\text{H}]^+$: 159,22; encontrado: 159,22.

Para **Io** también se realizó la síntesis final y podría ser el ácido tiohidroxámico, porque, aunque en el espectro de RMN- ^1H no se observan las señales correspondientes a los protones del NH y del OH, las de los protones aromáticos se desplazan distinto con respecto a los de la cloroxima y la oxima. Se recrystalizará y se confirmará la obtención de producto deseado mediante un análisis de espectrometría de masas.

Io: Se obtuvo un sólido marrón con un rendimiento del 3% que no está puro (0,57 mg).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8,45 (d, 2H, Ar), 8,23 (d, 2H, Ar); ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 133,87 (C=S), 133,14 (C-NO₂), 132,87 (C Ar), 126,04 (CH Ar), 123,37 (CH Ar), 123,45 (CH Ar), 114,46 (CH Ar).

HRMS (ESI): calculado de $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{H}]^+$: 198,20; pendiente de realizarlo.

En el caso del resto de los ácidos tiohidroxámicos, no se completó la síntesis por falta de tiempo, aunque se aislaron y caracterizaron algunos intermedios avanzados. En concreto, se consiguieron sintetizar todas las cloroximas y falta la reacción final a para completar la síntesis, **Figura 2**. Sin embargo, para las moléculas **Ii** y **Il**, se obtuvo solamente la oxima y faltan dos reacciones para completar su síntesis. A continuación, se detallan las caracterizaciones de los intermedios que se obtuvieron.

Intermedio **Ii**: Se obtuvo la oxima como un sólido blanco un poco amarillento con un 80% de rendimiento (0,94 g).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 9,23 (s, 1H, OH), 7,96 (s, 1H, CH=NH), 6,09 (s, $J = 2.2$ Hz, 1H, CH=CH₂), 2,52 (t, $J = 9.7, 4.3, 2.2$ Hz, 2H, CH₂), 2,46 (m, $J = 7.5, 2.5$ Hz, 2H, CH₂), 1,96 (m, 2H, CH₂)

Intermedio **Ij**: Se obtuvo la cloroxima como un aceite viscoso amarillo con un rendimiento del 17% (1g).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 9,34 (s, 1H, OH), 7,41 (s, 1H, Ar), 7,29 (d, 1H, Ar), 6,32 (d, 1H, Ar); ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 144,73 (C=NH), 138,41 (C-O), 136,24 (CH-O Ar), 120,36 (CH Ar), 109,10 (CH Ar).

Intermedio **Il**: Se obtuvo la oxima como un sólido violeta con un rendimiento del 98%. Se caracterizó por RMN- ^1H . A continuación, se hizo reaccionar para obtener la cloroxima con toda la cantidad, no obteniéndose el resultado deseado.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 10,16 (s, 1H, OH), 8,01 (s, 1H, CH=N), 6,97 (d, 1H, Ar), 6,86 (d, 1H, Ar), 6,42 (t, 1H, Ar).

Intermedio I_n: Se obtuvo la cloroxima como un sólido blanco amarillento con un 57% de rendimiento (2,41g).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8,07 (s, 1H, OH), 7,71 (d, 2H, Ar), 7,54 (d, 2H, Ar); ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 139,57 (C=NH), 133,09 (CH, Ar), 132,94 (CH, Ar), 132,19 (C-Br, Ar), 130,51 (CH Ar), 130,18 (CH Ar), 129,07 (C Ar).

Intermedio I_p: Se obtuvo la cloroxima como un sólido blanquecino con un rendimiento del 11% (0,70g)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,47 (m, 2H, Ar), 6,95 (m, 2H, Ar), 3,85 (m, 3H, OCH₃); ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 161,63 (C=NH), 160,98 (C-O), 130,24 (CH Ar), 128,77 (C Ar) 129,76 (CH Ar), 114,50 (CH Ar), 113,88 (CH Ar), 55,42 (OCH₃).

Para las demás moléculas objetivo, los ácidos hidroxámicos, el grupo de investigación ya tenía sintetizados el I_a, I_b y I_c, se realizó la síntesis del I_e y I_r, cuyas caracterizaciones se muestran a continuación. El resto, I_d, I_g y I_h no se pudo realizar la síntesis por falta de tiempo y del producto de partida.

I_e: Se obtuvo un sólido blanco, pero falta purificarlo por columna ya que posee impurezas y las sales formadas por los reactivos.

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 7,94 (s, 1H, OH), 7,93 (s, 1H, NH) 7,75 (d, 2H, Ar), 7,52 (t, 1H, Ar), 7,45 (t, 2H, Ar); ¹³C RMN (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 167,01 (C=O), 131,92 (CH Ar), 131,55 (CH Ar), 128,93 (CH Ar), 128,35 (CH Ar), 127,61 (C Ar). 126,78 (CH Ar).

I_r: Se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento del 73% (1,46 g).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,64 (m, 4H, Ar); ¹³C RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 165,74 (C=O), 131,48 (CH Ar), 131,27 (CH Ar), 130,56 (C Ar) 128,53 (CH Ar), 125,75 (CH Ar).

HRMS (ESI): calculado para C₇H₇NOS [M+H]⁺: 216,03; se detectaron iones de m/z 200, correspondientes a la pérdida del grupo OH, debido a que el equipo fragmenta preferentemente en los enlaces más lábiles.

Aunque no se ha conseguido sintetizar toda la batería de moléculas objetivo, se ha optimizado la síntesis de los ácidos hidroxámicos y se han conseguido sintetizar numerosos intermedios.

Docking

A continuación, se reflejan los resultados del *docking*. Se observa siempre el ácido hidroxámico en violeta, el ácido tioxidroxámico en verde, el átomo de zinc en naranja y las distancias calculadas entre las moléculas y Zn²⁺ en amarillo.

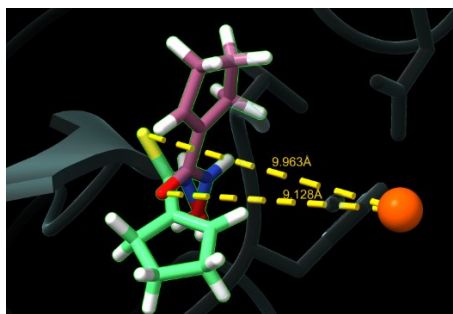


Figura 5.- Interacción de las moléculas I_a y I_i con el ión zinc del sitio catalítico 2 de la enzima HDAC6. I_a (ácido hidroxámico) se muestra en violeta; I_i (ácido tioxidroxámico) se muestra en verde.

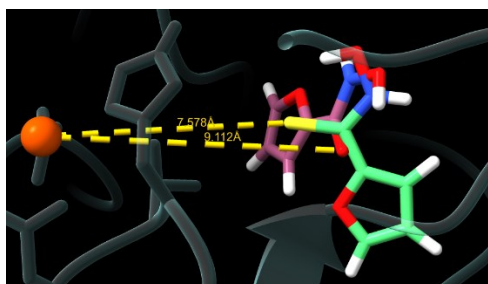


Figura 6.- Interacción de las moléculas I_b y I_j con el ión zinc del sitio catalítico 2 de la enzima HDAC6.

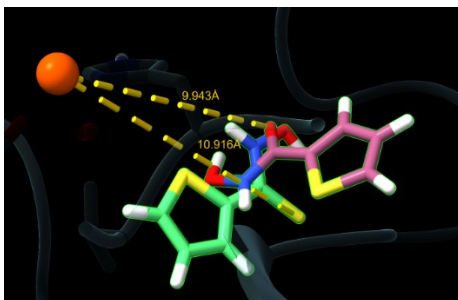


Figura 7.- Interacción de las moléculas **I_c** y **I_k** con el ión zinc del sitio catalítico 2 de la enzima HDAC6.

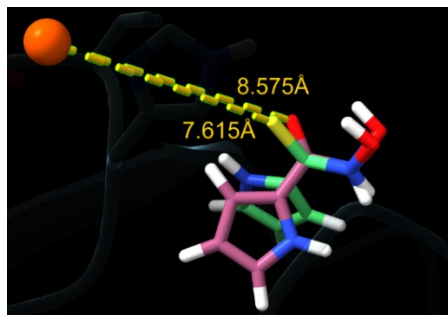


Figura 8.- Interacción de las moléculas **I_d** y **I_l** con el ión zinc del sitio catalítico 2 de la enzima HDAC6.

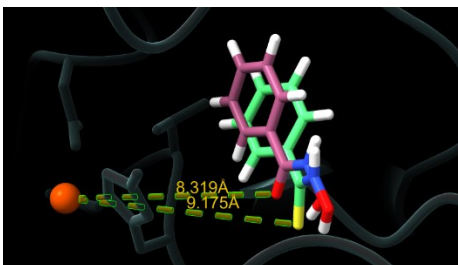


Figura 9.- Interacción de las moléculas **I_e** y **I_m** con el ión zinc del sitio catalítico 2 de la enzima HDAC6..

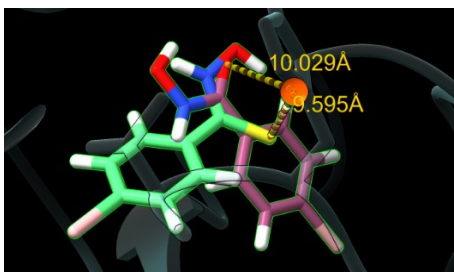


Figura 10.- Interacción de las moléculas **I_r** y **I_n** con el ión zinc del sitio catalítico 2 de la enzima HDAC6.

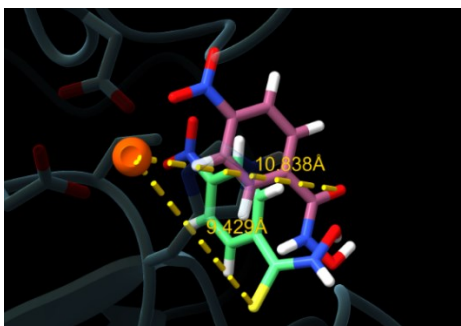


Figura 11.- Interacción de las moléculas **I_g** y **I_o** con el ión zinc del sitio catalítico 2 de la enzima HDAC6.

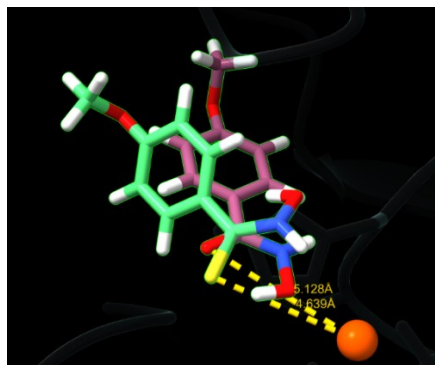


Figura 12.- Interacción de las moléculas **I_h** y **I_p** con el ión zinc del sitio catalítico 2 de la enzima HDAC6.

N.º Pareja	Moléculas	AC Score	AP Score	Resultado
1	I_a	-18,525	-6,983	HM
	I_i	1,388	-5,986	
2	I_b	-5,210	-7,024	HM
	I_j	11,853	-5,989	
3	I_c	-9,837	-6,975	HM
	I_k	7,957	-5,997	
4	I_d	-18,919	-6,793	HM
	I_l	-0,012	-5,869	
5	I_e	2,664	-7,032	HM
	I_m	17,995	-6,227	
6	I_f	2,098	-7,145	HM
	I_n	19,318	-6,122	
7	I_g	26,028	-7,141	HM
	I_o	38,692	-6,373	
8	I_h	3,392	-7,181	HM
	I_p	16,881	-6,713	

Tabla 1.- Tabla comparativa de los resultados obtenidos con *SwissDock*. Se compara el AC Score y el AP Score de cada molécula. HM si el mejor inhibidor de la pareja, ácido hidroxámico/tiohidroxámico, es el ácido hidroxámico **I_a-I_h**; y TM si lo es el ácido tiohidroxámico **I_i-I_p**, marcados en azul.

Como se observa en la **Tabla 1**, si comparamos la media de *AC Score* de los ácidos hidroxámicos, -2,29, y la de los ácidos tiohidroxámicos, 14,26, se puede observar una notable diferencia. Al contrario de lo que cabría esperar, parece que los ácidos hidroxámicos presentan una mayor estabilidad dentro de la enzima. Esta tendencia también se refleja en los datos del *AP Score*, cuya media para los ácidos hidroxámicos es -7,03, mientras que para los tiohidroxámicos es -6,16, lo que nos indica que los ácidos hidroxámicos son más afines por el Zn^{2+} y tienden a formar uniones más efectivas. Pese a que estos resultados no apoyan la hipótesis inicial, al menos desde el punto de vista del acoplamiento molecular simulado, parece que las moléculas con un ácido hidroxámico como grupo funcional son potencialmente inhibidores más efectivos que los ácidos tiohidroxámicos.

También se determinaron las distancias entre el ión zinc y los grupos funcionales (**Figuras 5-12**). Es necesario tener en cuenta que no se pueden comparar directamente, ya que la unión Zn-O es más iónica, tiene un carácter diferente a la unión Zn-S, que es más covalente. Sin embargo, sí nos revela información significativa ya que en todos los casos, menos en uno que analizaremos a continuación, se observan distancias que superan los 7 Å desde los grupos funcionales principales al Zn^{2+} . Lo cual nos indica, que la molécula se sitúa tan lejos que es muy improbable que se esté realizando la interacción, ya que las distancias normales suelen ser menores a 3,5 Å en ambos casos [17]. Es importante señalar, que al descargarse los archivos de *SwissDock*, se representa una media de todas las poses de la molécula. Por lo tanto, la pose resultante, la representada, es posible que no establezca una interacción directa con el Zinc.

En el caso de la pareja **I_h** y **I_p** se observan distancias con valores inferiores, 5,128 Å para Zn-O y 4,639 Å para Zn-S (**Figura 12**). Aunque sigue sin estar dentro de los valores esperables, puede ser que el sustituyente -OMe pueda estar desempeñando un papel favorable en la orientación y aproximación del ligando al sitio catalítico, posiblemente facilitando una interacción más eficiente con el ion metálico, aun sin formar un enlace coordinado directo.

Se observa que en los ácidos tiohidroxámicos **lj**, **lk**, **ln**, **lo** y **lp** la distancia Zn-S es menor que la distancia Zn-O de los correspondientes ácidos hidroxámicos **lb**, **lc**, **lf**, **lg** y **lh**.

Conclusiones

A pesar de que la síntesis de todas las moléculas aún no se ha completado y los resultados computacionales no han confirmado la hipótesis inicial, el proyecto ha aportado información relevante sobre la interacción de estos compuestos con la enzima. Se continuará trabajando en la síntesis y caracterización de las moléculas restantes para avanzar en la comprensión del potencial inhibitorio de los ácidos tiohidroxámicos frente a los hidroxámicos.

Referencias

1. Demencia. 2025 (31 marzo) En OMS, Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
2. Alzheimer. En Alzfae, Fundación de Alzheimer de España. <https://alzfae.org/el-alzheimer/>
3. Breijyeh, Z. and Karaman, R. 2020. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 25(24): 5789.
4. Terao, I. and Kodama, W. 2024. Comparative efficacy, tolerability and acceptability of donanemab, lecanemab, aducanumab and lithium on cognitive function in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A systematic review and network meta-analysis. *Ageing Research Reviews*. 94: 102203.
5. Li, Y., Sang, S., Ren, W., Pei, Y., Bian, Y., Chen, Y., and Sun, H. 2021. Inhibition of Histone Deacetylase 6 (HDAC6) as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: A review (2010–2020). *European Journal of Medicinal Chemistry*. 226: 113874.
6. Govindarajan, N., Rao, P., Burkhardt, S., Sananbenesi, F., Schlüter, O., Bradke, F., Lu, J., and Fischer, A. 2012. Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*. 5: 52-3.
7. Lee, Y., Lee, J., and Jo, D.G. 2023. Roles of HDAC6 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 19: e076368
8. Simões-Pires, C., Zwick, V., Nurisso, A., Schenker, E., Carrupt, P.A., and Cuendet, M. 2013. HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: what makes it different from the other HDACs? *Molecular Neurodegeneration*. 8 (7).
9. Chang, P., Li, H., Hu, H., Li, Y., and Wang, T. 2021. The role of HDAC6 in autophagy and NLRP3 inflammasome. *Frontiers in Immunology*. 12: 763831.
10. Dallavalle, S., Pisano, C., and Zunino, F. 2012. Development and therapeutic impact of HDAC6-selective inhibitors. *Biochemical pharmacology*. 84(6): 756-65.
11. Xiao, Y. and Zhang, X. 2020. Recent advances in small molecular modulators targeting histone deacetylase 6. *Future Drug Discovery*. 2(4): FDD53.
12. Jašíková, L., Hanikýřová, E., Škríba, A., Jašík, J., and Roithová, J. 2012. Metal-assisted lossen rearrangement. *The Journal of Organic Chemistry*. 77(6): 2829-36.
13. Naffaa, Y. 2023. Investigation of thiohydroxamic acid analogues as potential anti-cancer drugs. Pomona: California State Polytechnic University. 81.
14. Lemercier, B. C., and Pierce, J. G. 2014. Synthesis of thiohydroxamic acids and thiohydroxamic acid derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*. 79(5): 2321-30.
15. Bugnon, M., Röhrig, U.F., Goullieux, M., Perez, M.A.S., Daina, A., Michielin, O., and Zoete, V. 2024. SwissDock 2024: major enhancements for small-molecule docking with Attracting Cavities and AutoDock Vina. *Nucleic Acids Research*. 52 (1): 324- 32.
16. Zoete, V., Cuendet, M.A., Grosdidier, A., and Michielin, O. 2011. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of Computational Chemistry*. 32(11): 2359-68.
17. Tamames, B., Sousa, S. F., Tamames, J., Fernandes, P. A., and Ramos, M. J. 2007. Analysis of zinc-ligand bond lengths in metalloproteins: trends and patterns. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 69(3): 466-75.