

Universidad CEU Cardenal Herrera

Departamento de Farmacia



“Diseño, Síntesis y Evaluación de Nuevos Derivados de Sulfonamidas y Poliaminas de Acción Antiparasitaria y Antitumoral”

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Dña. Cristina Galiana Roselló

Dirigida por:

Dra. Dña. M^a Eugenia González Rosende

Dra. Dña. M^a Auxiliadora Dea Ayuela

Dra. Dña. Concepción Soriano Soto

VALENCIA

2017



Dra. Dña. M^a Eugenia González Rosende, profesora del Departamento de Farmacia de la Universidad CEU Cardenal Herrera, **Dra. Dña. M^a Auxiliadora Dea Ayuela**, profesora del Departamento de Farmacia de la Universidad CEU Cardenal Herrera, **Dra. Dña. Concepción Soriano Soto**, profesora del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN

Que la presente memoria, titulada “Diseño, Síntesis y Evaluación de Nuevos Derivados de Sulfonamidas y Poliaminas de Acción Antiparasitaria y Antitumoral”, ha sido realizada bajo su dirección en la Universidad CEU Cardenal Herrera por la licenciada **Dña. Cristina Galiana Roselló**, y reúne las condiciones formales para ser evaluada por el tribunal correspondiente, a fin de obtener el Grado de Doctora.

Y para que así conste, firman el presente en Moncada a 3 de mayo de 2017

Dra. Dña. M^a Eugenia González Rosende

Dra. Dña. M^a Auxiliadora Dea Ayuela

Dña. Dra. Concepción Soriano Soto

Dña. Cristina Galiana Roselló, Licenciada en Farmacia por la Universidad CEU Cardenal Herrera, presenta esta memoria con el título “Diseño, Síntesis y Evaluación de Nuevos Derivados de Sulfonamidas y Poliaminas de Acción Antiparasitaria y Antitumoral” en el marco del Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud (RD1393/2007) con el fin de optar al Grado de Doctora.

Y para que así conste, firma el presente en Moncada a 3 de mayo de 2017

Fdo. Dña. Cristina Galiana Roselló

El proyecto de tesis **“Diseño, Síntesis y Evaluación de Nuevos derivados de Sulfonamidas y Poliaminas de acción Antiparasitaria y Antitumoral”** ha sido financiado por diferentes proyectos de investigación:

- *“Supramolecular Chemistry Applied to the Design, Synthesis and Evaluation of Bioactive Compounds of Antiinflammatory, Antitumour or Antiparasitic Action”* CSD2010-00065. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad. CONSOLIDER INGENIO 2010.
- *“Evaluación de la actividad antiparasitaria frente a Leishmania spp. y Trypanosoma cruzi de nuevos derivados de poliaminas y sulfonamidas”* (AP-158/10). Financiado por la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana.
- *“Aplicación de la Química Supramolecular al diseño, síntesis y estudio de compuestos bioactivos de acción antiinflamatoria, antitumoral o antiparasitaria”*. Programa PROMETEO para grupos de Investigación de Excelencia de la Conselleria d’ Educació de la Generalitat Valenciana (CI11-208-01).
- *“Estudios in vivo e in vitro de sulfonamidas y poliaminas con potencial actividad frente a protozoos parásitos re-emergentes”* (AP 173/11). Financiado por la Conselleria de Sanidad de la Generalitat Valenciana.
- *“Aplicación de la Química Supramolecular al diseño, síntesis y estudio de compuestos bioactivos de acción antiinflamatoria, antitumoral o antiparasitaria”*. Programa PROMETEO II para grupos de Investigación de Excelencia Conselleria d’ Educació de la Generalitat Valenciana (PROMETEO II 2015/002).

Su realización ha sido posible gracias a la concesión de diferentes ayudas de formación predoctoral:

- Ayudas para contratos predoctorales de Formación de Profesorado Universitario (FPU) (FPU13/00036), concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.
- Ayudas para la contratación de personal investigador en formación de carácter predoctoral, programa Vali+d (ACIF/2013/204) de la Conselleria d’ Educació, Investigació, Cultura i Esports. Generalitat Valenciana.
- Ayudas de movilidad para estancias breves en otros centros a beneficiarios del subprograma de formación del profesorado universitario, concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (BOE-A-2014-13329).

Agradecimientos

Con estos agradecimientos quisiera reconocer la contribución de las personas que durante todos estos años me han ayudado de alguna manera en la consecución de este trabajo de Tesis Doctoral.

En primer lugar, quisiera expresar mis agradecimientos a mis tres directoras de tesis, a la Dra. M^a Eugenia González, a la Dra. M^a Auxiliadora Dea y a la Dra. Concepción Soriano por haber depositado en mí su confianza para la realización de esta Tesis Doctoral y, su disponibilidad y atención en cualquier momento.

Eugenia, empezó siendo mi profesora de Química Farmacéutica y consiguió despertar en mí el interés por la investigación. Esta tesis no hubiera sido posible sin su dedicación, disciplina de trabajo y ayuda constante. Sin lugar a dudas, ha sido una de las personas con las que más he aprendido, mi principal *mentora* durante estos años, desde aquellas primeras tardes sintetizando sulfonamidas, en la docencia, hasta las correcciones *punto por punto* de esta Tesis Doctoral.

Esta tesis no habría sido lo mismo sin una *destacada parasitóloga* como Maruxi. Su indiscutible contribución, su constancia en el trabajo e ilusión por la investigación, así como su enorme apoyo durante los momentos difíciles han sido indispensables. Seguramente, sin sus llamadas a cualquier hora del día, esta tesis no habría dado luz, a pesar de nuestras disputas por *cualquier cualquier* cosa.

A Conxa, por su apoyo durante todos estos años en el ICMol. Su interés, dedicación diaria a este trabajo, así como su optimismo, han sido fundamentales en la culminación de este trabajo.

Aunque no siendo directores de esta Tesis, me gustaría expresar mi agradecimiento al Dr. José Miguel Llinares y al Prof. Enrique García-España por darme la oportunidad de formar parte del Grupo de Química Supramolecular, sus consejos y su ayuda en la síntesis y, aunque no se hayan recogido en la presente memoria, en los diferentes estudios que he podido llevar a cabo.

A mis compañeros del ICMol, que me acogieron, me cedieron un hueco y ayudaron durante todos estos años: Estefanía, Javi, Mario, Lluís, Aida, Elena, Begoña, Mari Paz, Teresa, Salva, Iván, Dani, Isabel, Àlvar, Alberto y Alexis. Tampoco puedo olvidarme de una de las personas que más me ha apoyado durante estos años en el ICMol, que nada tiene que ver con el mundo de la investigación, pero sin embargo, su apoyo ha sido muy importante, gracias Mari Carmen.

Al Prof. Francisco Bolás y el Dr. Pablo Bilbao de la Universidad Complutense de Madrid, por todo el trabajo realizado en los estudios de actividad antiparasitaria de *Leishmania*; a las Dras. Celeste Vega y Miriam Rolón del Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica de Paraguay por los estudios de *Trypanosoma cruzi* y; a la Dra. Marta González por los estudios de actividad nucleasa.

A los colaboradores del proyecto CONSOLIDER y PROMETEO, especialmente al Dr. Priam Villalonga y la Dra. Silvia Fernández de Mattos por permitirme realizar una estancia en su grupo de Biología Molecular del Cáncer de la Universitat de les Illes Balears. A mis compañeros en Palma, Clara, Ruth, Guillem, Marga, Fernando y Elena, por darme una de las experiencias más gratificantes tanto a nivel personal como científico. Y por supuesto, esta estancia no habría sido lo mismo sin Sònia... *per a mi sempre seràs "supersonia"*.

A María Esther Chuquimia por transmitirme esa felicidad durante el año que convivimos juntas y en estos últimos tiempos desde Bolivia.

A Jorge, por toda su paciencia, apoyo y hacerme tan feliz durante estos años.

A la meua gent de Sueca, les meues amigues, que malgrat les meues absències són un suport fonamental a la meua vida.

Finalment, agrair a les persones més importants, partíips de manera indirecta d'aquesta Tesi Doctoral. A les meues germanes, Imma, Esther i Carol. A la meua mare, responsable d'aquesta noblesa que ens caracteritza, pel seu amor incondicional, i al meu pare, responsable de l' admiració, respecte i curiositat pel treball que sentim. Aquesta Tesi va dedicada a ell.

Al meu pare

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

A

Å, Ångström

ABB, tampón de unión de la anexina-V (*Annexin Binding Buffer*)

ADN, Ácido DesoxirriboNucleico

AdoMet-DC, S-Adenosilmetionina descarboxilasa (*S-AdenosylMethionine DeCarboxylase*)

AIF, factor inductor de apoptosis (*Apoptosis Induction Factor*)

AMP, monofosfato de adenosina (*Adenosine Monophosphate*)

Apaf-1, factor inductor de apoptosis 1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*)

APAO, Acetil PoliAmina Oxidasa

ARN, Ácido Ribonucleico.

ATM, Ataxia telangiectasia mutada (*Ataxia-Talangiectasia Mutated*)

ATP, trifosfato de adenosina (*Adenosine TriPhosphate*)

ATR, proteína relacionada con Rad3 y ATM (*ATM and Rad3-related protein*)

B

Bak, Proteína de muerte antagonista homóloga de Bcl-2 (*Bcl-2 antagonist/killer*)

Bax, proteína X asociada a Bcl-2 (*Bcl-2 Associated protein X*)

BBB, (*Blood-Brain Barrier*)

Bcl-2, linfoma 2 de células B (*B-cell lymphoma-2*)

Bcl-xL (*B-cell lymphoma extra-large*)

BH, dominio de homología a Bcl-2 (*Bcl-2 Homology*)

Bid, dominio de interacción con Bcl-2 (*Bcl-2 interacting domain*)

Bim, mediador de interacción de Bcl-2 de muerte celular (*Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*)

BrEt, Bromuro de Etidio

BSA, albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

C

CAD, desoxirribonucleasa activada por caspasas (*Caspase-Activated Deoxyribonuclease*)

CAK, quinasa activadora de CDKs (*Cyclin-dependent Activating kinase*)

CARD, dominio de reclutamiento de caspasas, (*Caspase Recruitment Domain*)

CASBAH, base de datos de sustratos de caspasas (*Caspase Substrate database Homepage*)

Caspasas, cisteinil-aspartato proteasas (*Cysteine-dependent Aspartate-directed proteASES*)

CBIs, (*Colchicine Binding Inhibitors*)

CBS, (*Colchicine Binding Site*)

CCF, Cromatografía en Capa Fina

CDC, (*Center for Disease Control*)

CDK, quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-Dependent Kinase*)

CDKI, inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*)

CIP, proteína de interacción con CDKs (*CDK Interacting Protein*)

ClogP, Coeficiente de reparto octanol/agua

CEA, Comité de Experimentación Animal

CPRG, (*ChloroPhenol Red β -D-Galactopyranoside*)

D

DC, Dicroísmo Circular

d, doblete

dd, doble doblete

ddd, doble doblete de dobles
DD, dominio de muerte (*Death Domain*)
DED, dominio efector de muerte (*Death-Effector Domain*)
DFMO, DiFluoroMetilOrnitina
DIABLO, Proteína de unión directa a IAP con bajo pI (*Direct IAP Associated Binding protein with Low PI*)
DMF, DiMetilFormamida
DISC, complejo inductor de muerte (*Death-Inducing Signaling Complex*)
DMEM, medio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
DMSO, DiMetilSulfÓxido
DNA-PKcs, subunidad catalítica de proteína quinasa dependiente de ADN (*DNA Protein Kinase catalytic subunit*)
DNA-SCARS, segmentos de cromatina alterada que refuerzan la senescencia (*DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence*)
DNDi, (*Drugs for Neglected Disease Initiative*)
Dpi, Días post-infección
DSB, rupturas de cadena doble (*Double Strand Breaks*)

E

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético (*EthyleneDiamineTetraAcetic acid*)
EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
EI, (*Electron Impact*)
EM-AR, Espectrometría de Masas de Alta Resolución
EndoG, endonucleasa G (*endonuclease G*)
ESI, (*ElectroSpray Ionization*)
Et₃N, trietilamina
EtOH, etanol

F

FAB, (*Fast Atom Bombardment*)

FACS, separador de células activadas por fluorescencia (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)
FADD, proteína con dominio de muerte asociado a Fas (*FAS-Associated protein with a DD*)
FasL, ligando de Fas (**Fas Ligand**)
FBS, suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*)
FITC, isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein IsoTioCyanate*)
FS, fosfatidilSerina

G

GI, (*Growth Inhibition*)
GLB1, gen de la galactosidasa beta-1 (*Galactosidase Beta 1*)

H

h, horas
HEPES, ácido 2-(4-(2-hidroxiethyl)-piperazin-1-il) etanosulfónico (*4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid*)
Hz, Hertzios
HIA, (*Human Intestinal Absorption*)
HtrA2, proteína A2 requerida para las altas temperaturas (*High temperature requirement protein A2*)

I

IAP, proteínas inhibidoras de apoptosis (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*)
IARC, Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*)
IC₅₀, concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular (*Inhibitory Concentration 50*)
ICE, enzima convertidora de interleucina-1 (*Interleukin-1 Converting Enzyme*)
IL, elemento de unión entre subunidades (*Intersubunit Linker*)
INK4, inhibidores de CDK4 (*INhibitors of cdK4*)

IP, Ioduro de Propidio

IUPAC, Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

J

J, constante de acoplamiento

JC-1, Ioduro de 5', 6, 6'-tetracloro-1,1', 3, 3'-tetra-etilbenzimidazolil-carbocianina

KIP, proteína inhibidora de quinasas (*kinase Inhibitory Protein*)

L

LC, Leishmaniosis Cutánea

LIT, (*Liver Infusion Tryptose*)

LMC, Leishmaniosis MucoCutánea

LSD1, histona demetilasa específica de lisina (*Lysine-Specific histone Demethylase 1*)

LV, Leishmaniosis Visceral

M

m, múltiplete

MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MAPs, (*Microtubule-Associated Proteins*)

Mcl-1, factor leucemia mielóide celular 1 (*Myeloid cell leukemia 1*)

MDR-1/P-gp, proteína de resistencia a múltiples fármacos /glicoproteína de permeabilidad (*MultiDrug Resistance Protein/Permeability glycoprotein*)

MeCN, acetonitrilo

MeOH, metanol

Milli-Q, agua desionizada

min, minutos

mL, mililitro

MOMP, permeabilización de la membrana externa mitocondrial (*Mitochondrial Outer Membrane pore Permeabilization*)

mTOR, diana de rapamicina en células de mamífero (*mammalian Target Of Rapamycin*)

µg, microgramo

µL, microlitro

N

NCCD, Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death*)

NCI, Instituto Nacional de Cáncer (*National Cancer Institute, USA*)

nHBAC, número de átomos aceptores

nHBDON, número de átomos dadores

NI, No inhibidor

nRotB, número de enlaces rotables

NS, No sustrato

O

°C, grado centígrado

ODC, ornitina descarboxilasa (*Ornithine DeCarboxylase*)

OMS, Organización Mundial de la Salud

P

p.f, punto de fusión

PABA, ácido para-aminobenzoico (*Para-AminoBenzoic Acid*)

PBS, tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PDB, (*Protein Data Bank*)

PE, (*Plating Efficiency*)

PIKKs, quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol-3-quinasa (*Phosphatidylinositol 3-Kinase-related Kinases*)

Pm, Peso molecular

PPi, pirofosfato inorgánico (*inorganic PyroPhosphate*)

pRb, proteína del retinoblastoma (*Retinoblastoma protein*)

pseudo-DDR, (*pseudo-DNA Damage Response*)

Puma, modulador de apoptosis regulado por p53 (*P53 upregulated modulator of apoptosis*)

Q

Q-TOF, (*Quadrupole Time-of-Flight*)

R

r.p.m., revoluciones por minuto

Rdto., Rendimiento

REA, Relación Estructura-Actividad

RIP1, proteína de interacción con el receptor
(*Receptor-Interacting Protein kinase1*)

RMN, Resonancia Magnética Nuclear

ROS, especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

RPIM, medio del Instituto Roswell Park Memorial
(*Roswell Park Memorial Institute Medium*)

S

SAHF, focos de heterocromatina asociados a senescencia
(*Senescence Associated Heterochromatin Foci*)

SASP, fenotipo secretor asociado a senescencia
(*Senescence-Associated Secretory Phenotype*)

SA- β -gal, actividad β -galactosidasa asociada a senescencia
(*Senescence-Associated β -galactosidase*)

SCSIE, Servicio Central de Soporte a la investigación Experimental

SDS-PAGE, (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Smac, Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria
(*Second mitochondrial-derived activator of caspase*)

SMO, espermina oxidasa (*Spermine Oxidase*)

SSAT, espermidina/espermina N^1 -acetiltransferasa
(*Spermidine/Spermine- N^1 -AcetylTransferase*)

T

t, triplete

TBA, *Tubulin Binding Agent*

tBib, Bid truncado (*truncated Bid*)

THF, TetraHidroFurano

TIS, senescencia inducida por terapia (*Therapy-Induced Senescence*)

TNFR, receptor del factor de necrosis tumoral
(*Tumor Necrosis Factor Receptor*)

TNF α , factor de necrosis tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α*)

TPP, (*Target Product Profile*)

TRADD, dominio de muerte asociado al receptor de TNF
(*TNFR-Associated DD*)

TRAIL, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
(*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*).

U

U, unidades

W

WTSI, (*Wellcome Trust Sanger Institute*)

Índice de Figuras

Figura 2.1. Formas parasitarias en <i>Leishmania</i> spp.	18
Figura 2.2. Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> spp.	20
Figura 2.3. Polimorfismo clínico de la leishmaniosis	22
Figura 2.4. Distribución mundial de la leishmaniosis.....	23
Figura 2.5. Formas parasitarias en <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
Figura 2.6. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 2.7. Signo de Romaña.....	32
Figura 2.8. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas	33
Figura 2.9. Características distintivas y complementarias de las neoplasias malignas.....	36
Figura 2.10. Progresión y regulación del ciclo celular en mamíferos	38
Figura 2.11. Características del fenotipo senescente.....	41
Figura 2.12. Estructura y activación de caspasas apoptóticas.....	44
Figura 2.13. Vía intrínseca o mitocondrial dependiente e independiente de caspasas.....	47
Figura 2.14. Vía extrínseca de activación de apoptosis.	48
Figura 2.15. Representación de la estructura de los microtúbulos.....	50
Figura 2.16. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos.....	51
Figura 2.17. Sitios de unión de compuestos antimitóticos en el dímero de tubulina.	53
Figura 2.18. Analogía estructural de la sulfanilamida con el PABA.	58
Figura 2.19. Sulfonamidas antibacterianas.	60
Figura 2.20. Farmacomodulación de la sulfanilamida	61
Figura 2.21. Estructura de la putrescina, espermidina y espermina, y los valores de <i>pKa</i>	73
Figura 2.22. Vías metabólicas de las poliaminas en mamíferos	78
Figura 2.23. Diversidad estructural de análogos poliamínicos con actividad antitumoral.....	79
Figura 4.1. Dominios de diversidad estructural D1 y D2.....	195
Figura 4.2. Estructura de los derivados de sulfonamidas de las series S1-S16	196
Figura 4.3. Estructura de los derivados de sulfonamidas de las series S17-S26	197
Figura 4.4. Estrategia sintética en la síntesis de las sulfonamidas S1-S26	198
Figura 4.5. Ampliaciones del espectro de RMN ¹ H del derivado S1a	200
Figura 4.6. Espectro de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C HSQC del derivado S1a	201
Figura 4.7. Ampliaciones del espectro de RMN ¹ H del derivado S1b	202
Figura 4.8. Espectro de RMN ¹ H del derivado S8f	211
Figura 4.9. Espectro de correlación homonuclear ¹ H- ¹ H COSY del derivado S8f	211
Figura 4.10. Espectro de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C HSQC del derivado S8f	212
Figura 4.11. Espectro de RMN ¹ H del derivado S9b	214
Figura 4.12. Espectro de correlación homonuclear ¹ H- ¹ H COSY del derivado S9b	215
Figura 4.13. Espectro de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C HSQC del derivado S9b	215
Figura 4.14. Espectro de RMN ¹ H del derivado S10c	218
Figura 4.15. Espectro de RMN ¹³ C del derivado S10c	218
Figura 4.16. Ampliaciones del espectro de RMN ¹ H del derivado S17c	221
Figura 4.17. Espectro de correlación homonuclear ¹ H- ¹ H COSY del derivado S17c	222
Figura 4.18. Espectro de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C HSQC del derivado S17c	222

Figura 4.19. Ampliación del espectro de RMN ¹ H del derivado S18e	225
Figura 4.20. Ampliación del espectro de RMN ¹ H y diagramas de acoplamiento de los hidrógenos metilénicos del derivado S18e	226
Figura 4.21. Espectro de correlación homonuclear ¹ H- ¹ H COSY del derivado S18e	226
Figura 4.22. Ampliación del espectro de RMN ¹ H del derivado S19f	228
Figura 4.23. Espectro de RMN ¹ H del derivado S21c	229
Figura 4.24. Espectro de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C HSQC del derivado S21c	230
Figura 4.25. Espectro de correlación homonuclear ¹ H- ¹ H COSY del derivado S22e	232
Figura 4.26. Ampliaciones del espectro de RMN ¹ H del derivado S23e	233
Figura 4.27. Espectro de correlación homonuclear ¹ H- ¹ H COSY del derivado S23e	233
Figura 4.28. Espectro de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C HSQC del derivado S23e	234
Figura 4.29. Espectro de RMN ¹ H del derivado S25c	235
Figura 4.30. Espectro de correlación homonuclear ¹ H- ¹ H COSY del derivado S25c	235
Figura 4.31. Espectro de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C HSQC del derivado S25c	236
Figura 4.32. Espectro de RMN ¹³ C del derivado S25c	236
Figura 4.33. Estructura de las sulfonamidas de las series S1-S5, S7, S10 y S21	238
Figura 4.34. Relación estructural de las sulfonamidas activas frente a epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (S2b, S3b y S7a) y los fármacos comerciales (Nifurtimox y Benznidazol) o en desarrollo clínico avanzado (Fexinidazol) para el tratamiento de la enfermedad de Chagas....	243
Figura 4.35. Alteraciones morfológicas en promastigotes de <i>L. infantum</i> en fase de crecimiento exponencial tratados con las sulfonamidas S2b, S3b y S4f	248
Figura 4.36. Alteraciones ultraestructurales en promastigotes de <i>L. infantum</i> , en fase logarítmica de crecimiento, inducidas por las sulfonamidas S2b, S3b y S4f	249
Figura 4.37. Conformaciones plasmídicas y su migración electroforética en geles de agarosa en los estudios de actividad nucleasa.....	254
Figura 4.38. Gel de agarosa representativo de la migración electroforética del plásmido pUC18 incubado con las sulfonamidas S3b, S4f y ácido ascórbico.....	255
Figura 4.39. Gel de agarosa representativo de la migración electroforética del plásmido pUC18 incubado con las sulfonamidas S3b, S4f , en presencia de CuCl ₂ (1:1) y ácido ascórbico en exceso.....	255
Figura 4.40. Gel de agarosa representativo de la migración electroforética del plásmido pUC18 incubado con las sulfonamidas S2b, S3b y S4f	257
Figura 4.41. Variaciones moleculares introducidas en los dominios de diversidad estructural de la sulfonamida S2b	260
Figura 4.42. Estructura de los nuevos derivados de sulfonamidas de las series S2-4, S6, S8, S10-16 y S24-26 evaluados en el segundo cribado de selección frente a formas extracelulares de <i>Leishmania</i> spp. y <i>T. cruzi</i>	263
Figura 4.43. Niveles de parasitemia post-infección y porcentaje de supervivencia post-tratamiento con las sulfonamidas S3b, S11c, S11d y S15e	271
Figura 4.44. Estructura de los microtúbulos en tripanosomátidos y cambios conformacionales en el sitio de unión de la Colchicina.....	273
Figura 4.45. Efecto de las sulfonamidas S25d y S10a sobre los microtúbulos de promastigotes en fase de crecimiento exponencial de <i>L. infantum</i>	275
Figura 4.46. Variaciones estructurales consideradas en el diseño de las sulfonamidas de las series S17-S23	278

Figura 4.47. Alcaloides isoquinoleínicos ancistrotanzanina B, ancistroealaina A y dioncofilina C junto con la sulfonamida estructuralmente relacionada S15e .	284
Figura 4.48. Resultados en la evaluación antiparasitaria de derivados de sulfonamidas.	287
Figura 4.49. Sulfonamidas seleccionadas en el primer <i>screening</i> de evaluación antitumoral.	290
Figura 4.50. Viabilidad celular de un panel de líneas de diferente origen tumoral tratadas con las sulfonamidas de las series S8, S10-11, S13, S17 y S20-21 .	292
Figura 4.51. Sulfonamidas evaluadas en un segundo <i>screening</i> frente a un panel de líneas celulares de diferente origen tumoral.	294
Figura 4.52. Análisis de la distribución del ciclo celular de un panel de líneas celulares tras el tratamiento con la sulfonamida S8e .	296
Figura 4.53. Análisis de la inducción de senescencia por la sulfonamida S8e en PC3.	298
Figura 4.54. Análisis de la actividad caspasa inducida en un panel representativo de líneas celulares tras 48 horas de tratamiento con la sulfonamida S8e a una concentración 10 μ M.	300
Figura 4.55. Análisis de la inducción de apoptosis por la sulfonamida S8e en LN229 y PC3.	302
Figura 4.56. Análisis de la inducción del daño al ADN por la sulfonamida S8e .	305
Figura 4.57. Estudios de interacción de la sulfonamida S8e con ctDNA.	307
Figura 4.58. Disposición microtubular y polimerización <i>in vitro</i> de la tubulina en un panel representativo de líneas celulares en presencia de la sulfonamida S8e .	311
Figura 4.59. Estudio de la reversibilidad de acción de la sulfonamida S8e .	313
Figura 4.60. Estudio de la motilidad celular en las líneas LN229 y MCF-7 tratadas con la sulfonamida S8e mediante el ensayo <i>Wound healing</i> .	315
Figura 4.61. Farmacomodulación de derivados de sulfonamidas antimitóticos.	317
Figura 4.62. Elementos farmacofóricos esenciales de la Colchicina y la sulfonamida ABT-751 en su unión a los dímeros de tubulina.	318
Figura 4.63. Estudios de <i>docking</i> de la sulfonamida S8e en el sitio de unión de la Colchicina.	320
Figura 4.64. Estructura de los derivados poliamínicos L1-L5 .	323
Figura 4.65. Dominios de diversidad estructural (D1/D2) en el diseño de los derivados poliamínicos L1-L5 .	324
Figura 4.66. Viabilidad celular tras el tratamiento con los derivados poliamínicos L1a, L1d y L1e .	331
Figura 4.67. Selección y modificación estructural de los derivados poliamínicos L1a, L1d y L1e .	332
Figura 4.68. <i>Screening</i> de la serie de derivados poliamínicos L1-L5 en líneas celulares de diferente origen tumoral.	333
Figura 4.69. Viabilidad celular de un panel representativo de líneas celulares de diferente origen tumoral tras el tratamiento con L1a y L4a .	334
Figura 4.70. Análisis de la distribución del ciclo celular en un panel de líneas celulares tras el tratamiento con los derivados poliamínicos L1a y L4a .	336
Figura 4.71. Análisis de la distribución del ciclo celular de LN229 y PC3 tras el tratamiento con los derivados L1a y L4a .	337
Figura 4.72. Cambios morfológicos en LN229 a diferentes tiempos de tratamiento con L1a a una concentración 10 μ M.	338
Figura 4.73. Cambios morfológicos en PC3 a diferentes tiempos de tratamiento con L4a a una concentración 10 μ M.	339

Figura 4.74. Análisis de la inducción de senescencia por L1a en LN229	340
Figura 4.75. Análisis de la inducción de senescencia por L4a en PC3.....	341
Figura 4.76. Porcentaje de células β -gal positivas tras el tratamiento con los derivados L1a y L4a en LN229 y PC3.....	341
Figura 4.77. Análisis de la actividad caspasa inducida en un panel representativo de líneas celulares con L1a y L4a	343
Figura 4.78. Distribución y detección de JC-1 en función de la MOMP	344
Figura 4.79. Monitorización de la despolarización de la membrana mitocondrial tras el tratamiento con L1a y L4a en LN229	345
Figura 4.80. Análisis de la inducción de apoptosis por los derivados L1a y L4a en LN229 y PC3.....	346
Figura 4.81. Análisis de la inducción de apoptosis por los derivados L1a y L4a en PC3 a las 72 horas de tratamiento	347
Figura 4.82. Análisis de la inducción de γ -H2AX por los derivados L1a y L4a	349
Figura 4.83. Clonogenicidad de los derivados L1a y L4a	350
Figura 4.84. Relación Estructura- Actividad de las poliaminas L1-L5	351

Índice de Tablas

Tabla 2.1. Clasificación taxonómica, basada en Cavalier-Smith, Honigberg, Vickerman, Kent, Doflein y Ross.	19
Tabla 2.2. Especies de <i>Leishmania</i> en humanos	21
Tabla 2.3. Pautas de tratamiento en la leishmaniosis y fármacos de elección.	24
Tabla 4.1. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C de los derivados de sulfonamidas S1a , S1b y S1c	204
Tabla 4.2. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C del derivado de sulfonamidas S2j	205
Tabla 4.3. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C de los derivados de sulfonamidas S2b , S2e , S2g , S2h	206
Tabla 4.4. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C del derivado de sulfonamida S3c	208
Tabla 4.5. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C de los heterociclos pentagonales de las 4-clorobencenosulfonamidas de las series S4 (tiazol), S5 y S6 (isoxazol) y la 4-nitrobencenosulfonamida de la serie S7 (pirazol).....	209
Tabla 4.6. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C del derivado S8f	213
Tabla 4.7. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C del derivado S9b	216
Tabla 4.8. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C de los derivados S10c , S11c y S13c	217
Tabla 4.9. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, <i>J</i>) de los derivados S15b y S16b	219
Tabla 4.10. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C del derivado S17c	223
Tabla 4.11. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C de los hidrógenos metilénicos y metínico del derivado S18e	227
Tabla 4.12. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C de los derivados S20c y S21c	230
Tabla 4.13. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, <i>J</i>) y ^{13}C del derivado S22e	231
Tabla 4.14. Susceptibilidad de las formas promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> frente a las sulfonamidas evaluadas de las series S1-S5 , S7 , S10 y S21	240
Tabla 4.15. Índices de selectividad de las sulfonamidas de las series S2-S5 , S7 , S10 y S21 con actividad leishmanicida y tripanocida <i>in vitro</i> frente a formas extracelulares de <i>Leishmania</i> spp. y <i>T. cruzi</i>	241
Tabla 4.16. Actividad <i>in vitro</i> frente a formas extra- e intracelulares de <i>L. infantum</i> e índices de selectividad.....	247
Tabla 4.17. Frecuencia de daño observada en promastigotes de <i>L. infantum</i> por microscopia electrónica de transmisión después de 48 horas de exposición a las sulfonamidas S2b , S3b y S4f	250
Tabla 4.18. Susceptibilidad de las formas promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> frente a las sulfonamidas evaluadas de las series S2 , S3 , S8 , S10 , S11 , S13 , S14 , S15 , S16 , S25 y S26	265

Tabla 4.19. Índices de selectividad de las sulfonamidas evaluadas de las serie S2, S3, S8, S10, S11, S13, S14, S15, S16, S25 y S26 con actividad leishmanicida y tripanocida <i>in vitro</i> frente a formas extracelulares de <i>Leishmania</i> spp. y <i>T. cruzi</i> .	266
Tabla 4.20. Actividad <i>in vitro</i> e índices de selectividad frente a formas intracelulares de <i>L. infantum, L. amazonensis</i> y <i>T. cruzi</i> .	267
Tabla 4.21. Actividad <i>in vivo</i> de las sulfonamidas S8a, S10a, S13a, S15e y S25d en un modelo murino de leishmaniosis visceral de <i>L. infantum</i> .	269
Tabla 4.22. Reducción de la parasitemia en un modelo <i>in vivo</i> de infección aguda de <i>T. cruzi</i> tras el tratamiento con las sulfonamidas S3b, S11c, S11d y S15e .	270
Tabla 4.23. Susceptibilidad de las formas promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> frente a las sulfonamidas evaluadas de las series S17-S23 .	279
Tabla 4.24. Índices de selectividad de las sulfonamidas de las series S17-S23 con actividad leishmanicida y tripanocida <i>in vitro</i> frente a formas extracelulares de <i>Leishmania</i> spp. y <i>T. cruzi</i> .	280
Tabla 4.25. Valores IC ₅₀ e índices de selectividad de las nitrobenzenosulfonamidas S2b, S3b, S18b, S19b, S20b, S22b y S23b frente a formas extracelulares de <i>Leishmania</i> spp. y <i>T. cruzi</i> .	281
Tabla 4.26. Biodisponibilidad oral y propiedades ADMET de los compuestos S2b, S3b, S10a y S15e .	286
Tabla 4.27. Susceptibilidad de las formas promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> frente a los derivados poliamínicos L1-L5 .	354
Tabla 4.28. Índices de selectividad de los derivados L1-L5 frente a formas extracelulares de <i>Leishmania</i> spp. y <i>T. cruzi</i> .	354
Tabla 4.29. Susceptibilidad de las formas intracelulares de <i>Leishmania</i> spp. y <i>T. cruzi</i> frente a las poliaminas evaluadas L1-L5 .	355

Índice de Esquemas

Esquema 2.1. Sulfonación de aminas a partir de cloruros de sulfonilo.....	55
Esquema 2.2. Síntesis de sulfonamidas a partir de tioles.....	56
Esquema 2.3. Reacción de aminosulfonación por reactivos de <i>Grignard</i>	56
Esquema 2.4. Síntesis de sulfonamidas a partir de ácidos sulfónicos.....	57
Esquema 2.5. Síntesis de sulfonamidas por reacciones de <i>N</i> -arilación catalizadas por metales y a partir de sulfonatos de pentafluorofenilo.....	57
Esquema 2.6. Síntesis de sulfonamidas en fase sólida.....	57
Esquema 2.7. Síntesis del <i>Prontosil Rubrum</i>	59
Esquema 2.8. Metabolización <i>in vivo</i> del <i>Prontosil</i>	59
Esquema 4.1. Activación de nitroderivados por nitrorreductasas tipo I (NTRI) y tipo II (NTRII).	244
Esquema 4.2. Metabolización hepática de las <i>para</i> -aminobenceno sulfonamidas antibacterianas.....	246
Esquema 4.3. Mecanismo de escisión hidrolítica de ADN.....	251
Esquema 4.4. Formación de ROS por reacciones redox a partir de complejos de Cu ^{II} , en presencia de un agente reductor, O ₂ y/o H ₂ O ₂	252
Esquema 4.5. Mecanismos oxidativos de escisión de ADN.....	253
Esquema 4.6. Mecanismo de escisión del ADN propuesto para las sulfonamidas S2b , S3b y S4f en presencia de Cu ^{II}	258
Esquema 4.7. Ruta sintética de la síntesis de los derivados poliamínicos L1-L5	325
Esquema 4.8. Reacción de protección de la amina precursora.....	325
Esquema 4.9. Reacción de <i>N</i> -alquilación/sulfonación de las diftalimidias L-ft	326
Esquema 4.10. Reacción de desprotección de las diftalimidias alquiladas.....	327
Esquema 4.11. Reacciones de funcionalización en la obtención de los derivados L1-L5	328

Publicaciones

Una parte de los resultados presentados en esta memoria han sido publicados en los siguientes artículos:

1. Bilbao-Ramos, P.; **Galiana-Roselló, C.**; Dea-Ayuela, M. A.; González-Álvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Pérez-Serrano, J.; Bolás-Fernández, F.; González-Rosende, M. E., **Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities.** *Parasitology international* 2012, *61* (4), 604-13.
2. **Galiana-Roselló, C.**; Bilbao-Ramos, P.; Dea-Ayuela, M. A.; Rolón, M.; Vega, C.; Bolás-Fernández, F.; García-España, E.; Alfonso, J.; Coronel, C.; González-Rosende, M. E., **In vitro and in vivo antileishmanial and trypanocidal studies of new N-benzene- and N-naphthalenesulfonamide derivatives.** *J Med Chem* 2013, *56* (22), 8984-98.
3. Aceves-Luquero, C.; **Galiana-Roselló, C.**; Ramis, G.; Villalonga-Planells, R.; García-España, E.; Fernández de Mattos, S.; Peláez, R.; Llinares, J. M.; González-Rosende, M. E.; Villalonga, P., **N-(2-methyl-indol-1H-5-yl)-1-naphthalenesulfonamide: A novel reversible antimitotic agent inhibiting cancer cell motility.** *Biochem Pharmacol* 2016, *115*, 28-42.

ÍNDICE

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XI
PUBLICACIONES.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
<hr/>	
1.1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.2. OBJETIVOS.....	9
1.3. BIBLIOGRAFÍA	11
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	15
<hr/>	
2.1. ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR PARÁSITOS KINETOPLÁSTIDOS	17
2.1.1. <i>Leishmania</i> y Leishmaniosis.....	17
2.1.1.1. El parásito	17
2.1.1.2. Encuadre taxonómico.....	18
2.1.1.3. Ciclo biológico.....	19
2.1.1.4. Formas clínicas de la leishmaniosis.....	21
2.1.1.5. Distribución y epidemiología.....	22
2.1.1.6. Tratamiento	23
2.1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> y Enfermedad de Chagas.....	29
2.1.2.1. El parásito	29
2.1.2.2. Ciclo biológico.....	30
2.1.2.3. Manifestaciones clínicas	31
2.1.2.4. Distribución y epidemiología.....	32
2.1.2.5. Tratamiento	33
2.2. CÁNCER.....	35
2.2.1. Definición y epidemiología.....	35
2.2.2. Biología del cáncer.....	35
2.2.3. Regulación y progresión del ciclo celular	37

2.2.3.1. Proteínas CDKs.....	38
2.2.3.2. Proteínas inhibidoras de CDKs (CDKIs).....	39
2.2.3.3. Puntos de control o <i>Checkpoints</i>	39
2.2.4. Senescencia.....	40
2.2.5. Muerte celular programada: Apoptosis.....	42
2.2.5.1. Efectores intracelulares: Caspasas.....	43
2.2.5.2. Vías de señalización del proceso apoptótico.....	45
2.2.6. Citoesqueleto celular: Microtúbulos.....	48
2.2.7. Tubulina como diana farmacológica en cáncer.....	51
2.2.8. Tratamiento oncológico.....	54
2.3. SULFONAMIDAS.....	55
2.3.1. Estrategias de síntesis.....	55
2.3.2. Reseña histórica.....	58
2.3.3. Diversidad de actividades farmacológicas.....	60
2.3.4. Sulfonamidas en el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.....	62
2.3.5. Sulfonamidas como agentes antitumorales.....	67
2.4. POLIAMINAS.....	73
2.4.1. “Estructuras privilegiadas” como <i>template</i> universal en el desarrollo de fármacos ..	73
2.4.2. Poliaminas en el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.....	74
2.4.3. Derivados poliamínicos como agentes antitumorales.....	77
2.5. BIBLIOGRAFÍA.....	81
3. PARTE EXPERIMENTAL	95
<hr/>	
3.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS.....	97
3.1.1. Reactivos y disolventes.....	97
3.1.2. Técnicas instrumentales.....	97
3.1.2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.....	97
3.1.2.2. Análisis elemental de C, H, N y S.....	98
3.1.2.3. Espectrometría de Masas.....	98
3.1.2.4. Punto de fusión.....	98
3.1.2.5. Cromatografías.....	98
3.1.3. Síntesis de las sulfonamidas S1-S26	99
3.1.4. Síntesis de las poliaminas L1-L5	147

3.1.4.1. Protección de la amina precursora (L).....	147
3.1.4.2. N-alquilación.....	148
3.1.4.3. Desprotección	150
3.1.4.4. Funcionalización por aminación reductiva	153
3.1.4.5. Formación de amidas	162
3.2. ENSAYOS DE EVALUACIÓN ANTIPARASITARIA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	164
3.2.1. Ensayos frente a <i>Leishmania</i> spp.	164
3.2.1.1. Cepas	164
3.2.1.2. Ensayos <i>in vitro</i> sobre promastigotes	164
3.2.1.3. Ensayos <i>in vitro</i> sobre amastigotes	165
3.2.1.4. Ensayos de citotoxicidad.....	166
3.2.1.5. Ensayo <i>in vivo</i> en un modelo murino de leishmaniosis visceral.....	167
3.2.2. Ensayos frente a <i>Trypanosoma cruzi</i>	167
3.2.2.1. Cepas.....	167
3.2.2.2. Ensayos <i>in vitro</i> sobre epimastigotes	168
3.2.2.3. Ensayos <i>in vitro</i> sobre amastigotes	168
3.2.2.4. Ensayos de citotoxicidad.....	169
3.2.2.5. Ensayo <i>in vivo</i> en un modelo murino de infección aguda.....	169
3.2.3. Microscopía electrónica de barrido	170
3.2.4. Microscopía electrónica de transmisión.....	170
3.2.3. Inmunocitoquímica	171
3.2.4. Análisis estadístico.....	171
3.3. ENSAYOS DE EVALUACIÓN ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i>	172
3.3.1. Cultivo celular.....	172
3.3.1.1. Líneas celulares.....	172
3.3.1.2. Mantenimiento de los cultivos	173
3.3.1.3. Subcultivo de células adherentes	174
3.3.1.4. Subcultivo de células en suspensión	174
3.3.1.5. Criopreservación	174
3.3.2. Preparación de las disoluciones <i>stock</i>	175
3.3.3. Ensayos de viabilidad celular.....	175
3.3.4. Determinación del valor IC ₅₀	176
3.3.5. Análisis de la distribución del ciclo celular	177
3.3.6. Ensayo de senescencia	177
3.3.7. Análisis de inducción de apoptosis	178
3.3.7.1. Ensayos de actividad caspasa.....	178
3.3.7.2. Determinación del potencial de membrana mitocondrial	179

3.3.7.3. Determinación del porcentaje de apoptosis	180
3.3.8. Análisis del daño al ADN	180
3.3.8.1. Detección de γ -H2AX.....	180
3.3.8.2. Ensayos clonogénicos	181
3.3.9. Ensayo <i>in vitro</i> de cierre de herida (<i>Wound Healing</i>).....	182
3.3.10. Análisis de la expresión de proteínas por <i>Western blot</i>	183
3.3.10.1. Obtención de extractos proteicos totales.....	183
3.3.10.2. Electroforesis y transferencia de proteínas	183
3.3.10.3. Inmunodetección.....	184
3.3.11. Ensayo <i>in vitro</i> de polimerización de tubulina.....	184
3.3.12. Inmunocitoquímica	185
3.3.13. Análisis estadístico.....	185
3.4. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON CTDNA	186
3.4.1. Espectroscopía UV-Vis: Desnaturalización térmica.....	186
3.4.2. Espectroscopía de emisión de fluorescencia	186
3.4.3. Discoísmo circular (DC).....	187
3.4.4. Estudios de actividad nucleasa.....	187
3.5. ESTUDIOS DE <i>DOCKING</i>	188
3.6. BIBLIOGRAFÍA	189

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 193

4.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS SULFONAMIDAS S1-S26	195
4.2. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE LAS SULFONAMIDAS S1-S26	237
4.2.1. Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de las sulfonamidas de la series S1-S5, S7, S10 y S21	239
4.2.1.1. Evaluación frente a promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. y epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	239
4.2.1.2. Evaluación frente a amastigotes de <i>Leishmania infantum</i>	246
4.2.1.3. Análisis morfológico y ultraestructural en promastigotes de <i>L. infantum</i> tras el tratamiento con las sulfonamidas S2b, S3b y S4f	247
4.2.1.4. Estudios de actividad nucleasa de las sulfonamidas S2b, S3b y S4f	250
4.2.2. Actividad antiparasitaria de las sulfonamidas de la series S2-4, S6, S8, S10-16 y S24-26	260

4.2.2.1. Evaluación frente a promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. y epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	264
4.2.2.2. Evaluación frente a amastigotes de <i>L. infantum</i> , <i>L. amazonensis</i> y <i>T. cruzi</i> ...	267
4.2.2.3. Evaluación <i>in vivo</i> en un modelo murino de leishmaniosis visceral.....	268
4.2.2.4. Evaluación <i>in vivo</i> en un modelo murino de infección aguda de <i>T. cruzi</i>	269
4.2.2.5. Efecto de las sulfonamidas S10a y S25d sobre los microtúbulos de promastigotes de <i>L. infantum</i>	272
4.2.3. Actividad antiparasitaria de las sulfonamidas de las series S17-S23	276
4.2.4. Relación Estructura-Actividad de las sulfonamidas S1-S26	283
4.2.5. Evaluación <i>in silico</i> de las propiedades farmacocinéticas de las sulfonamidas S2b , S3b , S10a y S15e	285
4.3. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LAS SULFONAMIDAS S8-S11 Y S13-S22	289
4.3.1. Actividad antiproliferativa de los derivados de las series S8-S11 y S13-S22	291
4.3.2. Estudio del mecanismo de acción a nivel celular de la sulfonamida S8e	295
4.3.2.1. Análisis de la distribución del ciclo celular	295
4.3.2.2. Senescencia.....	297
4.3.2.3. Inducción de apoptosis.....	298
A. Activación de caspasas ejecutoras -3 y -7	298
B. Determinación del porcentaje de apoptosis	300
4.3.2.4. Análisis del daño al ADN	303
A. Detección de γ -H2AX.....	303
B. Determinación de la capacidad clonogénica.....	304
C. Estudios de interacción con ctDNA.....	306
4.3.3. Estudio de la alteración microtubular por la sulfonamida S8e	308
4.3.4. Ensayo de polimerización de la tubulina <i>in vitro</i>	309
4.3.5. Determinación de la reversibilidad de acción de la sulfonamida S8e	312
4.3.6. Inhibición de la motilidad celular por la sulfonamida S8e	314
4.3.7. Análisis SAR y estudios de <i>docking</i>	315
4.4. SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS DE POLIAMINAS L1-L5	323
4.5. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> DE LAS POLIAMINAS L1-L5	331
4.5.1. Actividad antiproliferativa de los derivados poliamínicos L1-L5	333
4.5.2. Análisis de la distribución del ciclo celular	335
4.5.3. Análisis morfológico.....	338
4.5.4. Senescencia.....	339
4.5.5. Apoptosis	342

4.5.5.1. Activación de caspasas ejecutoras -3 y -7.....	342
4.5.5.2. Monitorización del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m).....	344
4.5.5.3. Determinación del porcentaje de apoptosis	345
4.5.6. Análisis de daño al ADN	348
4.5.6.1. Detección de γ -H2AX.....	348
4.5.6.2. Determinación de la capacidad clonogénica.....	349
4.5.7. Relación Estructura-Actividad (REA)	351
4.6. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA <i>IN VITRO</i> DE LOS DERIVADOS L1-L5	353
4.7. BIBLIOGRAFÍA	357
5. CONCLUSIONES	369
<hr/>	
6. ANEXOS	375
<hr/>	
ANEXO-1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LAS SULFONAMIDAS SELECCIONADAS DE LAS SERIES S8-S11 Y S13-S22 (<i>MATERIAL SUPLEMENTARIO</i>) ..	377
ANEXO-2. COLECCIÓN DE ESPECTROS DE RMN DE LAS POLIAMINAS L1-L5	381
ANEXO-3. PUBLICACIONES	413
ANEXO-4. COLECCIÓN DE ESPECTROS DE RMN DE LAS SULFONAMIDAS S1-S26 (<i>FORMATO DIGITAL</i>)	

1

Introducción y Objetivos

1.1. Introducción

A pesar de los enormes avances del conocimiento, la inversión en nuevas tecnologías y la enorme relevancia social del medicamento, el número de nuevos fármacos aprobados en la última década ha disminuido considerablemente.

Desde los años 90 los fármacos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2012, incluyéndose nuevas entidades moleculares (NEM) y fármacos biotecnológicos, se ha reducido en un 25%.¹ Una tendencia también observada en la EMA (*European Medicines Agency*) en los últimos 3 años, con la aprobación de 27 nuevos fármacos en 2016, frente a los 39 en 2015 y los 40 en 2014.²

Esta continua disminución, sin embargo, no se corresponde con el desarrollo de NEM. Desde la secuenciación del genoma humano y las posibilidades que ofrece en el diseño de fármacos dirigidos o farmacoterapias individualizadas, el número de NEM ha ascendido en un 62%, potenciado además por la duplicación en la inversión en I+D.¹

Aunque las causas de esta evidente divergencia, entre el desarrollo de fármacos y su posterior aprobación son muy variadas, los expertos la atribuyen principalmente al elevado coste de los ensayos clínicos, así como las exigencias en la efectividad y seguridad y el fallo terapéutico en las distintas fases de los mismos.³

La consecuencia más obvia de este nuevo contexto es la limitación en la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de enfermedades que, por su complejidad epidemiológica, clínica y fisiopatológica, son recurrentes y mortales, y que por lo tanto, requieren una continua búsqueda de fármacos de mayor eficacia y seguridad. Esta situación se agrava especialmente si afecta a entornos empobrecidos de climas tropicales que ofrecen pocos incentivos económicos a la industria farmacéutica, como son las enfermedades infecciosas, incluidas las parasitarias conocidas bajo la denominación de *Enfermedades Desatendidas* (ED).

Entre las ED más importantes se encuentran las producidas por tripanosomátidos hemoflagelados de transmisión clásicamente vectorial, como la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana.⁴

La leishmaniosis es una enfermedad causada por diferentes especies de protozoos parásitos del género *Leishmania*, cuya capacidad infectiva se manifiesta de forma muy variada. Su manifestación clínica más severa, la leishmaniosis visceral, causa alrededor de 50.000 muertes anuales, viéndose gravemente afectados los pacientes con VIH. Actualmente, constituye la tercera enfermedad humana más importante de entre las transmitidas por vectores, después de la malaria y las filariosis y la novena enfermedad infecciosa más grave a nivel mundial.⁵

La enfermedad de Chagas, producida por *Trypanosoma cruzi*, afecta a más de 6 millones de personas, en su mayoría niños, principalmente en América Latina. En la fase aguda, el 5% de los niños infectados mueren y en su forma crónica, desarrollada entre el 10-30% de las personas infectadas, produce graves afecciones de distintos órganos, principalmente el corazón, y muerte por arritmias cardíacas y fallo cardíaco congestivo.⁶

En ausencia de vacunas totalmente eficaces, la principal alternativa para el control de ambas parasitosis sigue siendo la quimioterapia. Sin embargo, los tratamientos disponibles son extremadamente limitados. Muchos de los fármacos, desarrollados durante la primera parte del siglo pasado, son altamente tóxicos, la administración suele ser por vía parenteral con largas posologías, son de elevado coste, presentan una eficacia variable y han desarrollado una creciente aparición de resistencias que limitan la cura parasitológica. Además, dichas enfermedades están apareciendo como emergentes o re-emergentes en áreas geográficas donde tradicionalmente se las ha considerado erradicadas o controladas.⁷

En respuesta a la urgente necesidad de nuevos fármacos, diversas empresas farmacéuticas sin fines de lucro y alianzas público-privadas han comenzado a abordar este grupo de enfermedades. Los esfuerzos se centran principalmente en las primeras etapas de desarrollo de fármacos. El reto es encontrar un fármaco realmente eficaz, de fácil síntesis, bajo coste y con alto índice terapéutico, preferentemente a partir de pequeñas series de compuestos cuya Relación Estructura-Actividad (REA) ya se conoce o puede ser fácilmente discernida y así reducir la diferencia entre la expansión de estas parasitosis y la obtención de nuevos prototipos.⁸

Con tal fin, se han adoptado dos estrategias en la búsqueda de fármacos, que junto a la síntesis de *novo*, permitan acelerar la investigación traslacional: 1) la reutilización o reposicionamiento de fármacos con indicaciones preestablecidas y de seguridad eficientemente probada en ensayos clínicos para el tratamiento de otras enfermedades y 2) el descubrimiento de nuevos fármacos a partir de la estrategia *piggy-back*, basada en la evaluación de librerías de compuestos frente a dianas del parásito que ya han sido validadas en otras enfermedades para identificar nuevos prototipos. Ambas estrategias tratan de explotar dos posibles conjuntos de dianas terapéuticas, aquellas que han sido validadas en otros organismos y enfermedades, y las que no han sido validadas pero se presentan como dianas potenciales en parásitos kinetoplástidos.⁸⁻⁹

Uno de los precedentes que ha motivado a adoptar este tipo de estrategias ha sido la efectividad demostrada de fármacos frente estos tripanosomátidos que, inicialmente fueron desarrollados para el tratamiento de enfermedades etiológicamente tan dispares como el cáncer. Un claro ejemplo, son la Miltefosina y la α -Difluorometilornitina (DFMO), activos frente a *Leishmania* y *Trypanosoma brucei gambiense* respectivamente.¹⁰

Precisamente, la búsqueda de fármacos con ambas actividades, antitumoral y antiparasitaria, ha sido una de las dualidades farmacológicas más estudiadas. En este sentido, diversos trabajos han demostrado que varios compuestos con actividad antitumoral son eficaces frente a estos tripanosomátidos y viceversa.¹¹ Considerando que la oncología es una de las áreas de investigación que más incentivos económicos recibe, el desarrollo de fármacos antitumorales con potencial aplicabilidad como agentes antiparasitarios constituye una estrategia que permite avanzar en el desarrollo de fármacos frente a estas parasitosis y además explorar la interfaz entre ambos ámbitos de conocimiento.

La efectividad de los agentes antitumorales frente a la leishmaniosis y la tripanosomiasis se fundamenta en las similitudes bioquímicas que presentan las células cancerígenas y estos protozoos parásitos causantes de dichas enfermedades, las cuales afectan a la vía de las proteínas quininas, las enzimas catabólicas del metabolismo de la glucosa y el metabolismo de poliaminas

entre otros.¹² Ambos tipos celulares comparten un potencial replicativo ilimitado con una alta tasa de proliferación autónoma, mecanismos de evasión a la respuesta inmune,¹³ capacidad de adaptación en el organismo hospedador y resistencia a la apoptosis.¹⁴

El cáncer es una de las enfermedades con mayor morbilidad y mortalidad en el mundo, asociada principalmente al envejecimiento y los hábitos conductuales y dietéticos de los países desarrollados. Debido a su elevada incidencia, la oncología es una de las áreas con mayor inversión en el desarrollo de fármacos y fruto de ello, los enormes avances en el campo de la investigación básica y clínica han dado lugar a tasas de curación más altas para una serie de tumores. A pesar de ello, actualmente sigue siendo la segunda causa principal de muerte en los países desarrollados.¹⁵ La continua aparición de resistencias junto a los graves efectos adversos de la quimioterapia, al igual que en las enfermedades parasitarias, limita la efectividad de los tratamientos disponibles.¹⁶

En los últimos años, con el desarrollo de la inmunoterapia y las terapias dirigidas, se han obtenido resultados prometedores que permiten subsanar, en parte, estos problemas. No obstante, su desarrollo implica grandes inversiones, tanto en su producción como en las diferentes fases de los ensayos clínicos, que limitan la competitividad de las diferentes compañías farmacéuticas en la búsqueda de nuevos fármacos anticancerígenos.¹⁷

Por otro lado, según la última nota descriptiva de la OMS, de los 8.8 millones de defunciones por cáncer registradas en 2015, el 70% corresponden a países de ingresos medios y bajos.¹⁸ Por lo que, los elevados costes de producción y desarrollo que encarecen el medicamento no satisfacen las necesidades de este nuevo escenario epidemiológico, sino que pueden llegar a limitar la accesibilidad a los mismos.¹⁹ Ante estas consideraciones se hace imperativo la necesidad de identificar, caracterizar y desarrollar nuevos agentes anticancerígenos más eficaces, seguros y accesibles.

Al igual que en las enfermedades antiparasitarias, el reposicionamiento de fármacos, o el desarrollo de agentes terapéuticos basados en fármacos ya aprobados para su uso clínico de perfil de seguridad conocido, es una de las estrategias adoptadas por determinadas compañías farmacéuticas.²⁰

Todos estos factores determinan que se considere una estrategia adecuada sintetizar y evaluar compuestos que puedan presentar ambos tipos de actividades.

Entre la amplia gama de compuestos estudiados como potenciales agentes anticancerígenos-antiparasitarios, las sulfonamidas constituyen una importante clase terapéutica con un amplio espectro de acción. El desarrollo secuencial de la terapéutica de las sulfonamidas comprende una gran variedad de actividades farmacológicas (antimicrobiana, antiviral, inhibidores de la anhidrasa carbónica, antihipertensiva, hipoglucemiante oral, etc.) con múltiples dianas celulares.²¹

Con el descubrimiento de la primera sulfonamida antitumoral (ABT-751) y el desarrollo de métodos de *screening* a gran escala, se han sintetizado y evaluado grandes librerías de sulfonamidas. A partir de éstas, los estudios de farmacomodulación han permitido desarrollar una gran variedad de sulfonamidas aromáticas/heterocíclicas con actividad antitumoral con diferentes mecanismos de acción. Estos abarcan desde la interrupción del ensamblaje de los microtúbulos,

la supresión funcional del activador transcripcional NF- κ B o la inhibición de la anhidrasa carbónica entre otros.²² Por la coincidencia de las dianas terapéuticas entre parásitos kinetoplástidos y células tumorales, a partir de la estrategia *piggy-back*, se ha demostrado la actividad antiparasitaria de derivados de sulfonamidas inhibidores de la anhidrasa carbónica con potencial antimalárico,²³ así como la actividad de diferentes derivados de sulfonamidas heterocíclicas, obtenidas por hibridación molecular con otros grupos farmacofóricos, en *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*.²⁴

La dualidad farmacológica antiparasitaria-antitumoral también se encuentra en el desarrollo de análogos estructurales poliamínicos, compuestos de interés en la búsqueda de nuevas terapias antineoplásicas desde hace varias décadas.

Las poliaminas fisiológicas como la espermidina, espermina y putrescina son moléculas estructuralmente sencillas que regulan múltiples procesos vitales para el mantenimiento de la homeostasis celular. Están implicadas en la tasa de crecimiento, en diversos procesos de diferenciación celular y muerte por apoptosis.²⁵

Las células tumorales, así como los protozoos del género *Leishmania* o *Trypanosoma*, son células con una tasa de proliferación elevada e ilimitada y presentan niveles de poliaminas fisiológicas anormalmente elevados. Ante esta asociación, proliferación-concentración de poliaminas, la regulación del metabolismo de estas moléculas ha sido uno de los objetivos principales en el desarrollo de derivados poliamínicos, tanto como agentes antitumorales como antiparasitarios.²⁶

En una primera aproximación, todos los esfuerzos se centraron en la obtención de inhibidores enzimáticos de sus rutas anabólicas. No obstante, la célula dispone de múltiples mecanismos compensatorios que son capaces de mantener la homeostasis celular, por lo que la utilidad de este tipo de compuestos está limitada y tan sólo el inhibidor α -difluorometilornitina (DFMO) ha alcanzado el mercado para el tratamiento de la tripanosomiasis americana.²⁷

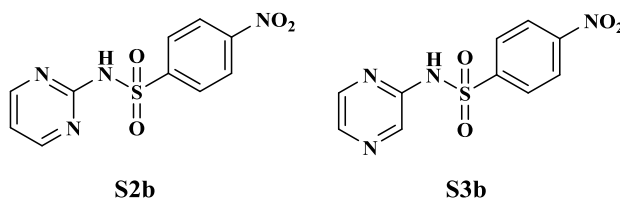
Actualmente, el desarrollo de inhibidores enzimáticos ha sido desplazado por compuestos que producen efectos celulares, ya sean dependientes o no, de las enzimas metabólicas. En este sentido, en la bibliografía aparecen descritas una gran variedad de compuestos basados en el *template* poliamínico, moléculas híbridas en las que la cadena poliamínica permite mejorar el transporte intracelular o su afinidad a la cromatina, tanto en su actividad antitumoral²⁸ como antiparasitaria.²⁹

Nuestro grupo de investigación “Diseño y Síntesis de compuestos con actividad terapéutica” de la Universidad CEU Cardenal Herrera centra sus estudios en la obtención de compuestos con actividades terapéuticas diversas.

De acuerdo al creciente interés en el desarrollo de compuestos frente a parásitos kinetoplástidos a partir de grupos farmacofóricos validados en otras enfermedades, una de las líneas de investigación desarrollada en los últimos años ha sido la obtención de nuevos derivados de sulfonamidas y su evaluación farmacológica y toxicológica como potenciales agentes antiprotozoarios, leishmanicidas y tripanocidas, y/o antitumoral.

Estudios preliminares realizados por nuestro grupo en la evaluación *in vitro* de derivados de sulfonamidas frente a *L. infantum* y *T. cruzi* permitieron identificar a las *p*-

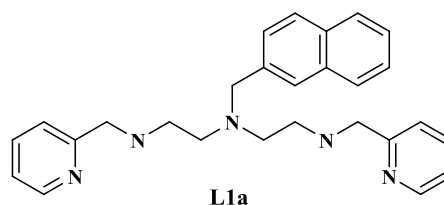
nitrobenzenosulfonamidas **S2b** y **S3b** como potenciales agentes antiparasitarios, cuya actividad leishmanicida se confirmó posteriormente en un modelo *in vivo* de Leishmaniosis visceral.³⁰ La efectividad *in vivo*, junto con la ausencia de toxicidad, indicaban que estas sulfonamidas podrían ser prototipos en el desarrollo de fármacos leishmanicidas.



Paralelamente, en colaboración con el Grupo de Investigación de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia (UV), se realizan estudios cuyo objetivo es la obtención de derivados poliamínicos de actividad leishmanicida, tripanocida y/o antitumoral.

El grupo de Química Supramolecular de la UV posee una amplia experiencia en el diseño y síntesis de compuestos orgánicos, principalmente polinitrogenados, tanto macrocíclicos como acíclicos. Su estudio como receptores moleculares de especies catiónicas y aniónicas de relevancia en sistemas biológicos ha permitido su desarrollo como inhibidores enzimáticos en su actividad antiparasitaria³¹ o compuestos de interacción con el ADN como potenciales agentes antitumorales.³²

Estudios iniciales de la capacidad antiproliferativa de una serie de este tipo de compuestos, permitieron identificar la poliamina **L1a** que, por sencillez estructural y capacidad antiproliferativa frente a un panel de líneas celulares de diferente origen tumoral, se postulaba como un derivado poliamínico de especial interés para estudiar su mecanismo de acción y comportamiento como receptor molecular en su actividad antiproliferativa, y su potencial aplicabilidad terapéutica como agente antitumoral.³³



1.2. Objetivos

En base a los resultados precedentes de las clases estructurales sulfonamidas y poliaminas respecto a la actividad de ambos grupos funcionales en parásitos protozoos y diferentes líneas tumorales, nos hemos propuesto como objetivo de esta Tesis Doctoral la búsqueda de nuevos derivados de sulfonamidas y poliaminas con actividad antiparasitaria y antitumoral. Los objetivos específicos se enumeran a continuación:

- 1- Diseño, síntesis y caracterización de una librería de derivados de bencenosulfonamidas y naftalenosulfonamidas de elevada diversidad estructural, a partir de la estrategia sintética previamente establecida por nuestro grupo de investigación.
- 2- Diseño, síntesis y caracterización de derivados poliamínicos o compuestos de tipo poliamina-poliamida con la optimización de rutas sintéticas previamente establecidas.
- 3- Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* de los derivados de sulfonamidas y poliaminas sintetizados frente a formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*, así como su citotoxicidad frente a macrófagos J774, fibroblastos NCTC929 y células Vero. Los compuestos con elevado índice terapéutico serán sometidos a una evaluación posterior en modelos *in vivo*.
- 4- Estudio de un posible mecanismo de acción de las sulfonamidas con actividad antiparasitaria.
- 5- Evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* de los derivados de sulfonamidas y poliaminas sintetizados frente a un panel de líneas celulares de diferente origen tumoral y, caracterización del mecanismo de acción a nivel celular y molecular de los compuestos seleccionados por su actividad y novedad estructural.
- 6- Análisis de la Relación Estructura-Actividad (REA) con el fin de profundizar en las características estructurales esenciales que permitan mantener unos niveles altos de actividad y sugerir modificaciones para diseñar nuevos compuestos.

De acuerdo a los objetivos anteriormente enumerados y la metodología de trabajo-síntesis-evaluación-modificación estructural-, los resultados de la evaluación farmacológica y toxicológica de todos los derivados se detallan según se han obtenido a lo largo de estos años.

En primer lugar se describe la síntesis y caracterización de los derivados de sulfonamidas sintetizadas. A continuación, se describe su evaluación antiparasitaria diferenciada en tres estudios consecutivos y, posteriormente, su evaluación antitumoral.

De la misma manera, se describe la síntesis y caracterización de los derivados poliamínicos sintetizados, seguida de su evaluación antitumoral como punto de partida de nuestra investigación y, posteriormente su actividad antiparasitaria.

1.3. Bibliografía

1. Hay, M.; Thomas, D. W.; Craighead, J. L.; Economides, C.; Rosenthal, J., Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotech* **2014**, *32* (1), 40-51.
2. Mullard, A., 2016 EMA drug approval recommendations. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (2), 77-77.
3. (a) Scannell, J. W.; Blanckley, A.; Boldon, H.; Warrington, B., Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat Rev Drug Discov* **2012**, *11* (3), 191-200; (b) DiMasi, J. A., Pharmaceutical R&D performance by firm size: approval success rates and economic returns. *American J Ther* **2014**, *21* (1), 26-34.
4. World Health Organization (WHO); Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* **2012**, (975), v-xii, 1-100.
5. (a) Ready, P. D., Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol* **2014**, *6*, 147-154; (b) Alvar, J.; Velez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M., Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* **2012**, *7* (5), e35671.
6. Iniciativa Medicamentos Enfermedades Olvidadas (DNDi). Enfermedad de Chagas. <http://www.dndial.org/es/enfermedades-olvidadas/enfermedad-de-chagas.html> (último acceso abril 2017).
7. (a) Ready, P. D., Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech* **2008**, *27* (2), 399-412; (b) Lara-Silva Fde, O.; Michalsky, E. M.; Fortes-Dias, C. L.; Fiuza Vde, O.; Pessanha, J. E.; Regina-Silva, S.; de Avelar, D. M.; Silva, M. A.; Lima, A. C.; da Costa, A. J.; Machado-Coelho, G. L.; Dias, E. S., Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop* **2015**, *148*, 128-136; (c) Urdaneta-Morales, S., Chagas' disease: an emergent urban zoonosis. The caracas valley (Venezuela) as an epidemiological model. *Front Public Health* **2014**, *2*, 265.
8. Andrews, K. T.; Fisher, G.; Skinner-Adams, T. S., Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol: Drugs Drug Resist* **2014**, *4* (2), 95-111.
9. Nwaka, S.; Hudson, A., Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (11), 941-955.
10. (a) Sindermann, H.; Croft, S. L.; Engel, K. R.; Bommer, W.; Eibl, H. J.; Unger, C.; Engel, J., Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* **2004**, *193* (4), 173-180; (b) Heby, O.; Persson, L.; Rentala, M., Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids* **2007**, *33* (2), 359-366.
11. (a) Fuertes, M. A.; Nguewa, P. A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Pérez, J. M., Anticancer compounds as leishmanicidal drugs: challenges in chemotherapy and future perspectives. *Curr Med Chem* **2008**, *15* (5), 433-439; (b) Klinkert, M. Q.; Heussler, V., The use of anticancer drugs in antiparasitic chemotherapy. *Mini Rev Med Chem* **2006**, *6* (2), 131-143.
12. Dorosti, Z.; Yousefi, M.; Sharafi, S. M.; Darani, H. Y., Mutual action of anticancer and antiparasitic drugs: are there any shared targets? *Future Oncol* **2014**, *10* (15), 2529-2539.
13. Ouaiissi, A.; Ouaiissi, M., Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. *Arch Immunol Ther Exp* **2005**, *53* (2), 102-114.
14. (a) Zangger, H.; Mottram, J. C.; Fasel, N., Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* **2002**, *9* (10), 1126-1139; (b) Oliveira, G., Cancer and parasitic infections: similarities and opportunities for the development of new control tools. *Rev Soc Bras Med Trop* **2014**, *47*, 1-2.
15. (a) Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **2015**, *136* (5), E359-86. (b) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* **2016**, *66* (1), 7-30.

16. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G., Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13* (10), 714-726.
17. Kinch, M. S., An analysis of FDA-approved drugs for oncology. *Drug Discov Today* **2014**, *19* (12), 1831-1835.
18. Organización Mundial de la Salud (OMS). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>, (último acceso mayo 2017).
19. International Network for Cancer Treatment and Research (INCTR). <http://www.inctr.org/about-inctr/cancer-in-developing-countries/>, (último acceso mayo 2017).
20. (a) Nasstrom, J., Breaking away from the norm: a new perspective on cancer therapeutics. *Drug Discov Today* **2014**, *19* (10), 1508-1509; (b) Wurth, R.; Thellung, S.; Bajetto, A.; Mazzanti, M.; Florio, T.; Barbieri, F., Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. *Drug Discov Today* **2016**, *21* (1), 190-199.
21. Jesman, C.; Mludzik, A.; Cybulska, M., History of antibiotics and sulphonamides discoveries. *Pol. Merkur. Lekarski* **2011**, *30* (179), 320-322.
22. (a) Casini, A.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, L. T., Sulfonamides and sulfonylated derivatives as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* **2002**, *2* (1), 55-75; (b) Supuran, C. T.; Casini, A.; Scozzafava, A., Protease inhibitors of the sulfonamide type: anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. *Med Res Rev* **2003**, *23* (5), 535-558.
23. Supuran, C. T., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7* (2), 168-181.
24. (a) Alafeefy, A. M.; Ceruso, M.; Al-Jaber, N. A.; Parkkila, S.; Vermelho, A. B.; Supuran, C. T., A new class of quinazoline-sulfonamides acting as efficient inhibitors against the alpha-carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2015**, *30* (4), 581-585; (b) da Silva, L. E.; Joussef, A. C.; Pacheco, L. K.; da Silva, D. G.; Steindel, M.; Rebelo, R. A.; Schmidt, B., Synthesis and *in vitro* evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15* (24), 7553-7560.
25. Tovar, A.; Sánchez-Capelo, A.; Cremades, A.; Penafiel, R., An evaluation of the role of polyamines in different models of kidney hypertrophy in mice. *Kidney Int* **1995**, *48* (3), 731-737.
26. (a) Birkholtz, L. M.; Williams, M.; Niemand, J.; Louw, A. I.; Persson, L.; Heby, O., Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. *Biochem J* **2011**, *438* (2), 229-244; (b) Nowotarski, S. L.; Woster, P. M.; Casero, R. A., Polyamines and cancer: Implications for chemoprevention and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med* **2013**, *15*, e3.
27. Casero, R. A.; Woster, P. M., Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *J Med Chem* **2009**, *52* (15), 4551-4573.
28. (a) Saab, N. H.; West, E. E.; Bieszk, N. C.; Preuss, C. V.; Mank, A. R.; Casero, R. A.; Woster, P. M., Synthesis and evaluation of unsymmetrically substituted polyamine analogs as modulators of human spermidine/spermine-*N*¹-acetyltransferase (SSAT) and as potential antitumor agents. *J Med Chem* **1993**, *36* (20), 2998-3004; (b) Reddy, V. K.; Valasinas, A.; Sarkar, A.; Basu, H. S.; Marton, L. J.; Frydman, B., Conformationally restricted analogues of ¹N,¹²N-bisethylspermine: synthesis and growth inhibitory effects on human tumor cell lines. *J Med Chem* **1998**, *41* (24), 4723-4732; (c) Szumilak, M.; Szulawska-Mroczek, A.; Koprowska, K.; Stasiak, M.; Lewgowd, W.; Stanczak, A.; Czyz, M., Synthesis and *in vitro* biological evaluation of new polyamine conjugates as potential anticancer drugs. *Eur J Med Chem* **2010**, *45* (12), 5744-5751.
29. (a) Loedige, M., Design and synthesis of novel antileishmanial compounds. *Int J Med Chem* **2015**, *2015*, 302723; (b) Giordani, R. B.; Araújo, D. P.; Duarte, M.; Zuanazzi, J. A.; Tasca, T.; De Almeida, M. V., Anti-protozoal activity of diamine derivatives. *Biomed Pharmacother* **2011**, *65* (1), 60-62; (c) Girault, S.; Grellier, P.; Berecibar, A.; Maes, L.; Mouray, E.; Lemiére, P.; Debreu, M. A.; Davioud-Charvet, E.; Sergheraert, C., Antimalarial, antitrypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): influence of the linker. *J Med Chem* **2000**, *43* (14), 2646-2654.
30. Dea-Ayuela, M. A.; Castillo, E.; González-Álvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Bolás-Fernández, F.; Borrás, J.; González-Rosende, M. E., *In vivo* and *in vitro* anti-leishmanial activities of 4-nitro-*N*-

- pyrimidin- and *N*-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and *N*²-(4-nitrophenyl)-*N*¹-propylglycinamide. *Bioorgan Med Chem* **2009**, *17* (21), 7449-7456.
31. Clares, M. P.; Blasco, S.; Soriano, C.; García-España, E.; Verdejo, B.; Inclán, M.; González, J.; Sánchez, M.; Marín, C.; Olmo, F, Scorpion-tail-like macrocyclic compounds and use thereof as antiparasitic agents. *PCT Int. Appl.*, **2013**, WO 2013087965 A1, 20130620.
 32. Inclán, M.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Serena, C.; Salat-Canela, C.; Díaz, M. L.; García-España, A.; García-España, E., Modulation of DNA binding by reversible metal-controlled molecular reorganizations of scorpion-like ligands. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (23), 9644-9656.
 33. Galiana-Roselló, C.; Aceves-Luquero, C.; Fernández de Mattos, S.; García-España, E.; González-Rosende, M.; Llinares, J.; Ramís, G.; Soriano, C.; Villalonga, P. "New polyamine-polyamide ligands as anticancer drugs". In "XXIIND International Symposium on Medicinal Chemistry EFMC/ISMC 2012", Berlín, 2-6 septiembre 2012; (EFMC), Ed. ChemMedChem. 2012; p 148.

Antecedentes Bibliográficos

2.1. Enfermedades producidas por parásitos kinetoplástidos

Los Kinetoplástidos son un grupo de protozoos flagelados que se caracterizan por la presencia de un orgánulo de valor taxonómico localizado en el extremo posterior de su larga mitocondria denominado kinetoplasto (ADN_k), ADN mitocondrial, único en su estructura, función y replicación que constituye, según la especie, hasta el 30% del material genómico de la célula¹.

Los diferentes kinetoplástidos patógenos presentan una organización genómica muy similar, con más de 6000 ortólogos en común y estructuras celulares comparables, presentando diferentes formas morfológicas a lo largo sus correspondientes ciclos biológicos. Sin embargo, causan patologías muy diferentes en el hombre y son transmitidos por distintos insectos vectores. Entre estos parásitos se encuentran *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas y *Leishmania* responsable de varias formas de leishmaniosis.²

2.1.1. *Leishmania* y Leishmaniosis

2.1.1.1. El parásito

Leishmania es un parásito polimórfico que presenta dos estadios o formas a lo largo de su ciclo biológico. Presentan un ciclo biológico indirecto con dos hospedadores. En el hospedador vertebrado, se presenta la forma intracelular o *amastigote* en las células del sistema retículoendotelial y en el vector invertebrado, en su estadio extracelular o *promastigote*.

Los amastigotes miden aproximadamente de 2-4 µm de diámetro, son ovoides e inmóviles. En su citoplasma, el kinetoplasto, de forma alargada, se sitúa adyacente a un núcleo central redondeado. En comparación al volumen reducido de su retículo endoplásmico y aparato de Golgi, se observa un orgánulo lisosomal voluminoso, equivalente a un fagosoma, denominado *mevasoma*. Y si bien esta forma carece de flagelo, su análisis ultraestructural revela un rudimento de flagelo en el interior de una bolsa flagelar en su extremo distal (*figura 2.1.A y B*).

Los promastigotes son alargados, con un tamaño variable, 15-20 µm de largo y 1-4 µm de ancho. Se encuentran en el tracto gastrointestinal del vector invertebrado. Presentan un núcleo central y un kinetoplasto terminal en la parte anterior del parásito, a partir del cual, se origina un flagelo de longitud similar al cuerpo del parásito que se extiende extracelularmente³ (*figura 2.1.A y C*).

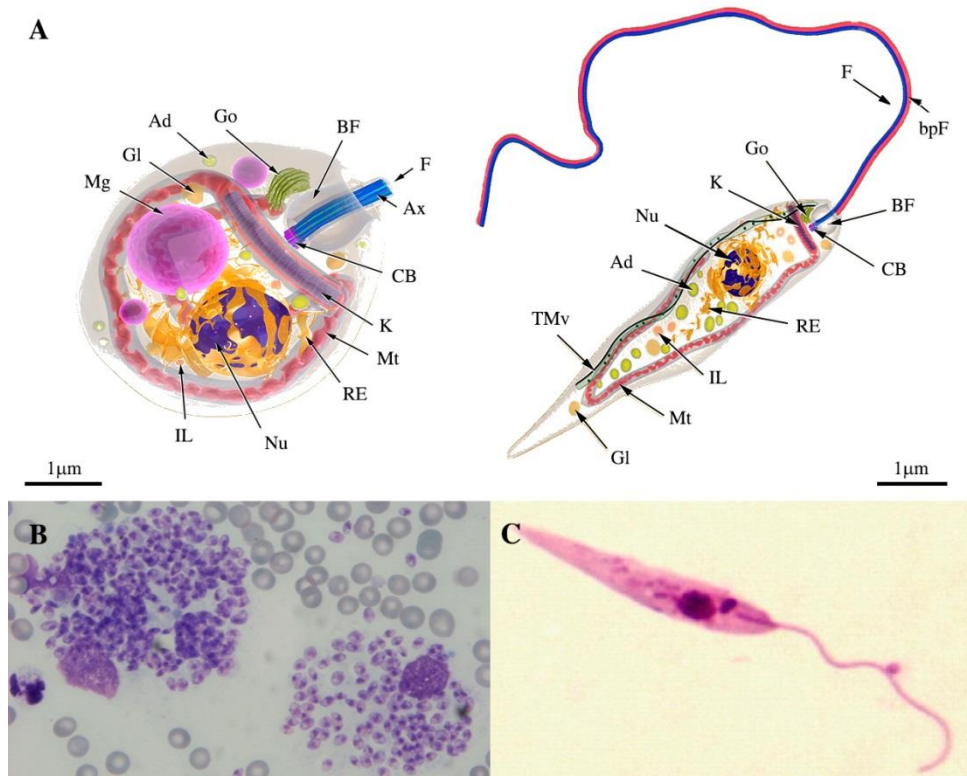


Figura 2.1. Formas parasitarias en *Leishmania* spp. **A.** Representación de las características ultraestructurales de las formas amastigote y promastigote. **Ad:** Acidocalcisoma; **Ax:** Axonema; **BF:** Bolsillo Flagelar; **bpF:** barra paraflagelar; **CB:** Cuerpo Basal; **F:** Flagelo; **Gl:** Glicosoma; **Go:** Golgi; **IL:** Inclusiones Lipídicas; **K:** Kinetoplasto; **Mg:** Megasoma; **Mt:** Mitocondria; **Nu:** Núcleo; **RE:** Retículo endoplásmico; **TMv:** Túbulo Multivesicular; Modificado de Teixeira y col.⁴ **B.** Formas amastigote en cultivo. Tinción con giemsa **C.** Promastigotes de *L. infantum chagasi*, imagen de Erfe y col.⁵

2.1.1.2. Encuadre taxonómico

La primera descripción que se hizo de *Leishmania* fue publicada por Leishman en 1903, quien observó en la tinción de una punción obtenida del bazo de un paciente la presencia de una serie de cuerpos ovales dentro de las células. Este paciente era un militar retirado que había estado destinado en la India y que había ingresado en el Hospital Netley, donde trabajaba Leishman, mostrando como síntomas, fiebre, anemia y aumento del tamaño del bazo. Paralelamente, Charles Donovan confirmó estos hallazgos en diversos pacientes en Madrás (India). Ese mismo año, Sir Ronald Ross (director del Instituto Británico de Enfermedades Tropicales), propuso el nombre de *Leishmania donovani* para este protozoo.⁶

La organización taxonómica se inició en 1916, basándose en criterios extrínsecos, como la ecobiología, la geografía, las manifestaciones clínicas, el vector, el cultivo *in vitro*, y el reservorio. Lainson y Shaw en 1979 propusieron la separación taxonómica sub-específica, de los subgéneros, basándose en la localización en el intestino del vector: *hipopilaria*, en la que el

parásito se desarrollarían en el intestino medio y posterior del vector (subgénero *sauroleishmania*), *peripilaria*, para aquellos que tienen una fase de reproducción en la parte anterior, media y posterior del intestino (subgénero *Viannia*) y *suprapilaria*, los que no llega al intestino posterior, pero se multiplican en el intestino medio antes de su migración al intestino anterior (subgénero *Leishmania*).⁷ Posteriormente, en la última década del siglo XX, la clasificación taxonómica se realizó mediante el uso de análisis isoenzimático, agrupando las especies en complejos con zimodemas idénticos.⁸

Actualmente, *Leishmania* está ubicado filogenéticamente como se indica en la *tabla 2.1*.

REINO	PROTOZOA (Cavalier-Smith 2002, 2003)	
SUBREINO	BICILIATA (Cavalier-Smith & Chao, 2003)	
INFRA-REINO	EXCAVATA (Cavalier-Smith 2002)	
SUPERFILO	DISCICRISTATA (Cavalier-Smith 1993)	
FILO	EUGLENOZOA (Cavalier-Smith, 1981)	
CLASE	KINETOPLASTEA (Honigberg, 1963 stat. nov. Margulis, 1974)	
ORDEN	TRYPANOSOMATINA (Kent, 1880 stat nov. Hollande, 1952)	
FAMILIA	TRYPANOSOMATIDAE (Doflein, 1901, Grobben, 1905)	
GÉNERO	<i>LEISHMANIA</i> (Ross, 1903)	
SUBGÉNERO	<i>LEISHMANIA</i>	<i>VIANNIA</i>
COMPLEJO	<i>donovani, tropica, major,</i> <i>aethiopica, mexicana</i>	<i>braziliensis, guyanensis,</i> <i>naffy, lainsoni</i>

Tabla 2.1. Clasificación taxonómica, basada en Cavalier-Smith, Honigberg, Vickerman, Kent, Doflein y Ross, adaptado de Bañuls y col. 2007.^{3a}

2.1.1.3. Ciclo biológico

La forma extracelular promastigote de *Leishmania* se desarrolla en diferentes regiones del epitelio intestinal, según el subgénero, de insectos dípteros de la familia Plebotominae. De las 70 especies descritas como posibles vectores de *Leishmania*, parece que solamente 30 especies de 2 géneros tienen importancia clínica, *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo.⁹

El ciclo se inicia con la picadura de las hembras hematófagas no infectadas al ingurgitar células circulantes infectadas con amastigotes del torrente sanguíneo (*figura 2.2, 1*). Estos se liberan en el estómago del vector y se adhieren a las microvellosidades de la pared luminal del

intestino (2). Después de un periodo aproximado de 24 horas se observan algunas formas promastigotes (3) que sufrirán un proceso de multiplicación a lo largo del intestino del mosquito (4) para finalmente madurar a promastigotes metacíclicos infectantes (*metacicloogénesis*), preferentemente en la hipofaringe y probóscide del mosquito, listos para infectar a un nuevo hospedador vertebrado.

El flebotomino infectado, cuando se alimenta de un nuevo hospedador, lesiona la epidermis, dermis y vasos capilares, produciendo un ligero hematoma en el mamífero. Posteriormente ingurgita sangre y regurgita desde la probóscide o intestino medio entre 10 y 1000 promastigotes metacíclicos (5).¹⁰

Una vez que el parásito se encuentra en los capilares cutáneos del hospedador vertebrado, se produce una fagocitosis, mediada por receptores por parte del macrófago (6), que lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo mediante una cascada de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), óxido nítrico y la liberación de lisozimas e hidrolasas lisosomales que serán vertidas en el interior de la vacuola.¹¹

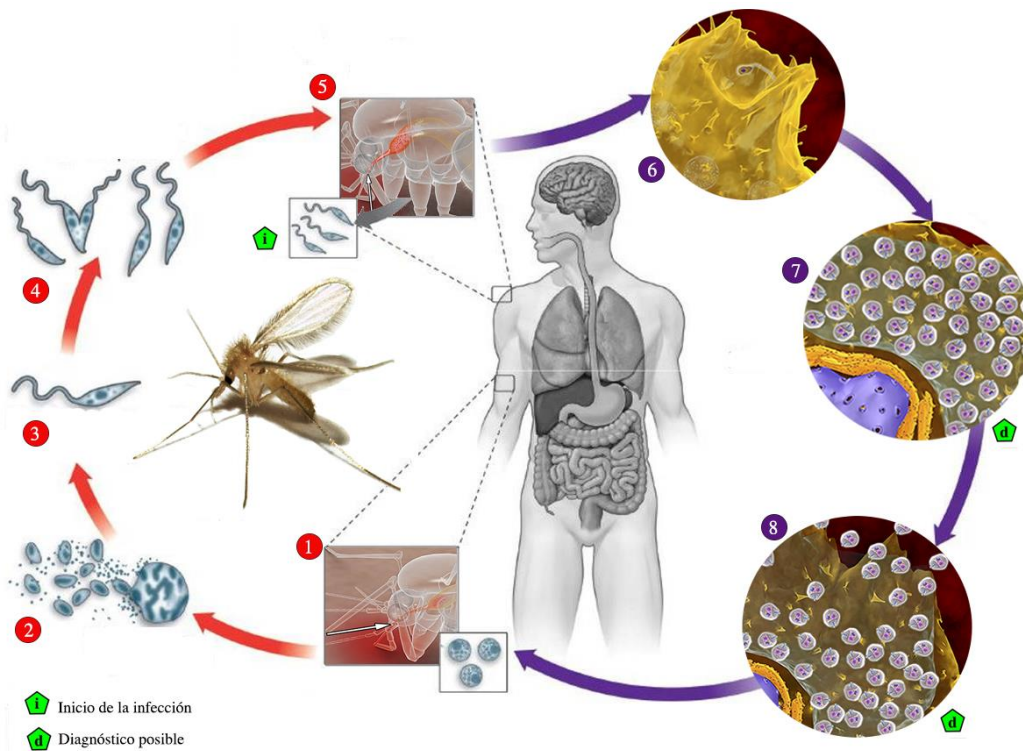


Figura 2.2. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Modificado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC).¹² Imágenes de Teixeira y col.⁴

Leishmania tiene la capacidad de evadir la acción inmunológica inespecífica del macrófago transformándose en amastigotes, los cuales se multiplican activamente, hasta ocupar la plena totalidad del mismo (7), con la consiguiente ruptura celular y su liberación al espacio

intercelular (8). Estos amastigotes presentan la capacidad de invasión de nuevas células del sistema reticuloendotelial que, en función de su localización, determinarán la patogenia y manifestación clínica de la infección.^{3b}

La transmisión vectorial puede ser antroponótica (entre humanos) o zoonótica (de un animal al hombre), distinguiéndose tres ciclos epidemiológicos: ciclo selvático zoonótico, ciclo rural o peridoméstico y ciclo urbano.¹³ No obstante, se ha demostrado la posibilidad de otras formas de transmisión, como accidentes de laboratorio,¹⁴ uso compartido de agujas en adictos a drogas por vía parenteral (ADVPs),¹⁵ transfusiones sanguíneas,¹⁶ o a través de otros vectores como *Rhipicephalus sanguineus*.¹⁷

2.1.1.4. Formas clínicas de la leishmaniosis

Se sabe que al menos 20 especies de *Leishmania* (tabla 2.2), son responsables de las diferentes formas clínicas que aparecen en el hombre. La patogenia se fundamenta en la destrucción celular provocada por la ruptura de los “nidios” de amastigotes, acompañándose de una reacción inflamatoria intensa.¹⁸ De acuerdo a la localización de las lesiones se clasifican en: *leishmaniosis cutánea* (LC, localizada o difusa), *leishmaniosis mucocutánea* (LMC) y *leishmaniosis visceral* (LV).¹⁸ Dichas manifestaciones vienen determinadas por diversos factores, tanto pertenecientes al hospedador (estado inmune¹⁹ y nutricional²⁰, edad²¹ y sexo²²), como por la virulencia y tropismo del parásito.

Subgénero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viana)</i>	<i>L. (Viana)</i>
Viejo Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>		
		<i>L. tropica</i>		
		<i>L. Killicki</i> ^a		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Nuevo Mundo	<i>L. chagasi</i>		<i>L. braziliensis</i>	
			<i>L. guyanensis</i>	
			<i>L. panamensis</i>	
			<i>L. shawi</i>	<i>L. braziliensis</i>
			<i>L. naïffi</i>	<i>L. panamensis</i>
			<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. pervuviana</i>	
	<i>L. colombiensis</i> ^b			
Tropismo principal	Viscerotrópico	Dermotrópico	Dermotrópico	Mucotrópico

Tabla 2.2. Especies de *Leishmania* en humanos (Control of Leishmaniasis, OMS, 2010). ^aEstado en discusión, ^bposición taxonómica en discusión.

En la **LC localizada**, la lesión primaria es una pápula eritematosa en el punto de infección, que aparece tras 2 ó 8 semanas de la picadura y crece progresivamente evolucionando a una lesión indurada o úlcera localizada (*figura 2.3.A*). Es la forma clínica menos severa. Las úlceras suelen curar espontáneamente, aunque se suelen formar grandes cicatrices. En la **LC difusa** aparecen numerosos nódulos de modo similar a la lepra lepromatosa, y no cura espontáneamente, llegando a establecerse un cuadro crónico por la baja eficacia de los tratamientos.

En la **LMC** se producen lesiones infiltrantes en la mucosa oronasal hasta la faringe, originando una destrucción tisular desfigurante e incapacitante que afecta a la deglución, respiración y al habla²³ (*figura 2.3.B*).

La **LV** es la más grave. Afecta de forma generalizada al sistema mononuclear fagocítico. Se caracteriza por episodios de fiebre, pérdida de peso, anemia y hepatoesplenomegalia (*figura 2.3.C*). La infección no tratada puede llegar a ser mortal y, en ocasiones, tras una recuperación, o de forma concomitante, puede desarrollarse leishmaniosis dérmica post-Kala-azar (forma cutánea crónica).²⁴



Figura 2.3. Polimorfismo clínico de la leishmaniosis. **A:** Leishmaniosis cutánea; **B:** Leishmaniosis mucocutánea; **C:** Leishmaniosis visceral. Imágenes de Chappuis y col.²⁴

2.1.1.5. Distribución y epidemiología

Según la OMS, la leishmaniosis es endémica en 98 países (*figura 2.4*), donde 12 millones de personas sufren la enfermedad y más de 350 millones se encuentran en riesgo. Se estima una incidencia anual de entre 900.000 y 1.3 millones de casos y, entre 20.000 y 30.000 defunciones.

Aunque es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial, afecta principalmente a las poblaciones más pobres, donde la malnutrición, las condiciones habitacionales y la falta de recursos, especialmente de antirretrovirales para el tratamiento de las co-infecciones en pacientes VIH, se asocian directamente a su incidencia, concentrándose más del 90% de los casos de leishmaniosis visceral en 7 de los 80 países afectados: Bangladesh, Brasil, India, Etiopía, Kenia, Nepal y Sudán.²⁵

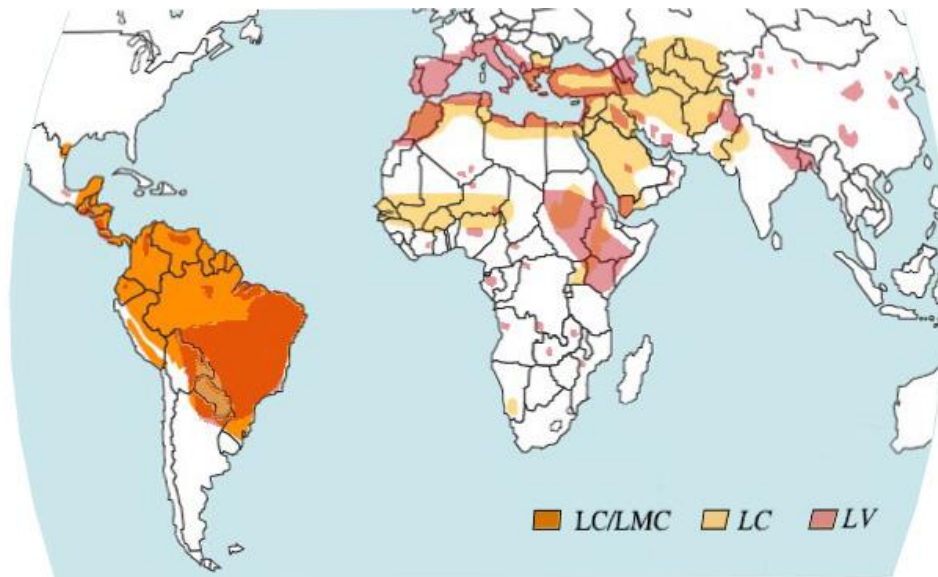


Figura 2.4. Distribución mundial de la leishmaniasis. Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi).²⁵

En Europa, la incidencia de **LV** y **LC** representa menos del 2% de la incidencia mundial de leishmaniasis. Sin embargo, se trata de un problema re-emergente, con un aumento constante de la prevalencia. Los casos de **LV**, producidos por *Leishmania infantum*, cuyo principal reservorio es el perro, afectan de forma endémica a la Cuenca Mediterránea.²⁶ Concretamente en España, la leishmaniasis es una zoonosis endémica en todo el territorio peninsular e Islas Baleares con diferentes patrones de presentación, un patrón endémico como enfermedad re-emergente, un patrón asociado a los casos de coinfección de VIH y un tercero debido a brotes epidémicos, como el registrado en la Comunidad de Madrid desde el año 2009 con la aparición de un nuevo reservorio, la liebre.²⁷

2.1.1.6. Tratamiento

A la complejidad clínica y epidemiológica de esta parasitosis se suma la ausencia de tratamientos totalmente eficaces. Los fármacos desarrollados en el siglo pasado, como los derivados orgánicos de antimonio pentavalentes, la Anfotericina B o la Pentamidina, siguen siendo los fármacos de elección. Si bien la introducción de nuevos fármacos como la Miltefosina, Paromomicina, diversos azoles y nuevas formulaciones de Anfotericina han conseguido subsanar en parte los efectos adversos de los tratamientos convencionales (*tabla 2.3*), la continua aparición de resistencias y/o fallos terapéuticos no permite alcanzar por completo la cura parasitológica.²⁸

Además, la respuesta a los diferentes tratamientos es heterogénea, dependiendo principalmente de la especie de *Leishmania*, localización geográfica y el perfil inmunogénico de los pacientes. Estas diferencias regionales en relación a los tratamientos son recogidas en guías

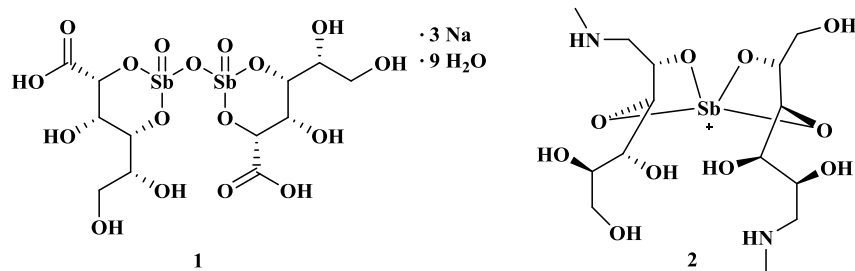
de recomendación por la OMS²⁹, y de acuerdo a sus estándares por instituciones u organizaciones competentes de la zona, como la OPS³⁰ en las Américas, o "Leishman" (*Leishmaniosis Management*)³¹ en Europa.

FORMA CLÍNICA	TERAPÉUTICA ANTIPARASITARIA	
Leishmaniosis Visceral	Fármacos de elección	Antimoniales pentavalentes
		Anfotericina B deoxicolato Anfotericina B liposomal ^a
	Tratamiento alternativo	Miltefosina
	Ensayos clínicos	Fexinidazol (fase II)
Leishmaniosis cutáneas	Fármacos de elección	Antimoniales Pentavalentes Miltefosina (<i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i>)
		Isetionato de pentamidina Ketoconazol (<i>L. mexicana</i> , <i>L. panamensis</i>)
	Tratamiento alternativo	Anfotericina B (FL) Anfotericina B deoxicolato
	Ensayos clínicos	Paromomicina (FT, acceso ampliado) ^c Pentoxifilina (fase III)

Tabla 2.3. Pautas de tratamiento en la leishmaniosis y fármacos de elección. **FL:** Formulación en Liposomas; **FT:** Formulación Tópica como gel de Paromomicina al 15% y Gentamicina al 0.5%.³²

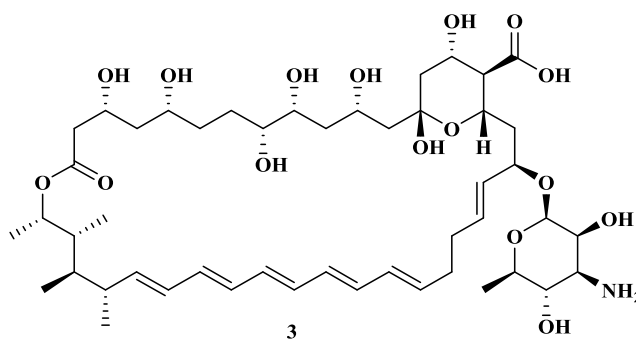
A continuación se describe brevemente el mecanismo de acción de los tratamientos y/o formulaciones disponibles actualmente.

Sales orgánicas de antimonio pentavalentes: El estibogluconato de sodio (**1**, Pentostam[®]) y antimoniato de meglumina (**2**, Glucantime[®]), aunque se emplean desde 1945, constituyen todavía la primera línea de tratamiento; sin embargo su uso está limitado por su eficacia variable y la aparición de resistencias en zonas endémicas.³³ Su mecanismo de acción no ha sido totalmente elucidado, pero algunos estudios han demostrado que actúan como profármacos siendo sólo activos después de la reducción *in vivo* a la forma trivalente [Sb (III)].³⁴ Entre los diferentes mecanismos de acción postulados, una de las hipótesis más consideradas es que interfieren con el metabolismo del tripanotión, promoviendo su salida, o por inhibición de la tripanotión reductasa, favoreciendo el estrés oxidativo en el parásito.³⁵ Por otro lado, como agentes multidiana, también se ha descrito que interfieren en el metabolismo de nucleótidos³⁶ o el metabolismo energético, por inhibición de la glucólisis, β -oxidación de ácidos grasos y la inhibición de la fosforilación de ADP.³⁷

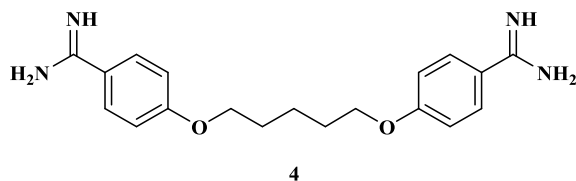


Anfotericina B (3): Antibiótico poliénico, ampliamente utilizado como fungicida, que actúa por inhibición de la síntesis del ergosterol en las membranas celulares. Constituye el tratamiento alternativo en los casos de resistencia a las sales de antimonio. Sin embargo, el uso de la forma comercial “Anfotericina Deoxicolato” (Fungizona®) está limitado por sus efectos adversos, como fiebre, escalofríos, tromboflebitis y nefrotoxicidad entre otros y la vía de administración (infusión parenteral durante 6-10 horas).

Se han desarrollado nuevas formulaciones en liposomas (AmBisome®), en complejos con fosfolípidos (Abelcet®) o en dispersión coloidal con sulfato sódico de colesterol (Amphocil®). Estas formulaciones permiten una mayor concentración en órganos diana durante largos períodos, reduciendo los efectos adversos y permitiendo la administración de dosis mayores en períodos más cortos, reduciéndose la toxicidad y mejorando por tanto el índice terapéutico de la Anfotericina B convencional. Sin embargo, son de elevado coste y su uso queda limitado en muchas áreas endémicas de países en vías desarrollo.³⁸

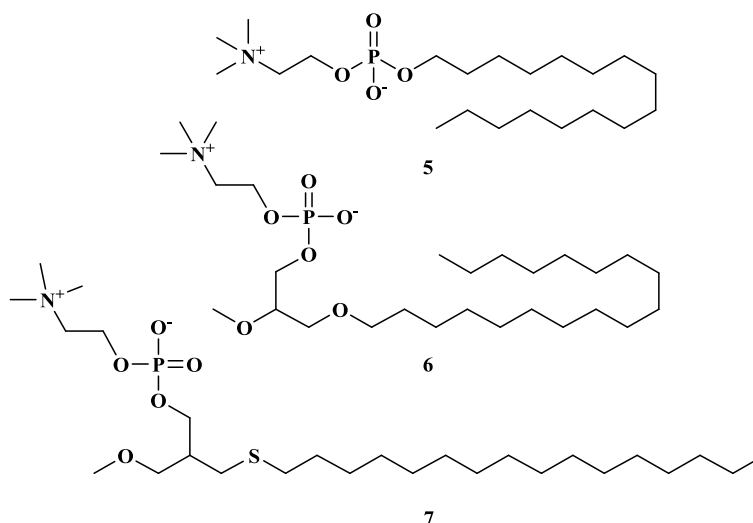


Pentamidina (4): Diamina no intercalante que se une de forma no covalente al surco menor del ADN. Al igual que la Anfotericina B constituye la segunda línea de tratamiento, siendo ampliamente prescrita en los casos de coinfección en pacientes VIH. No obstante, también es de administración parenteral y provoca graves efectos adversos, incluyendo diabetes *mellitus* irreversible, miocarditis o neurotoxicidad.³⁹

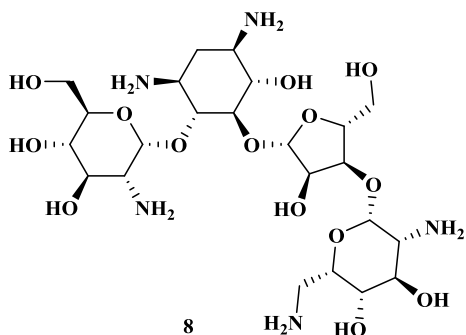


Miltefosina (5, Impavido®): Se trata de la hexadecilfosfocolina inicialmente desarrollada como anticancerígeno. Aunque el mecanismo de acción no está definido, se postula que es capaz de alterar el metabolismo de los lípidos de membrana y el metabolismo intermedio de la síntesis de la fosfatidilcolina necesaria para la formación de acil- y alquil-glicerofosfolípidos en los glicosomas del parásito.⁴⁰

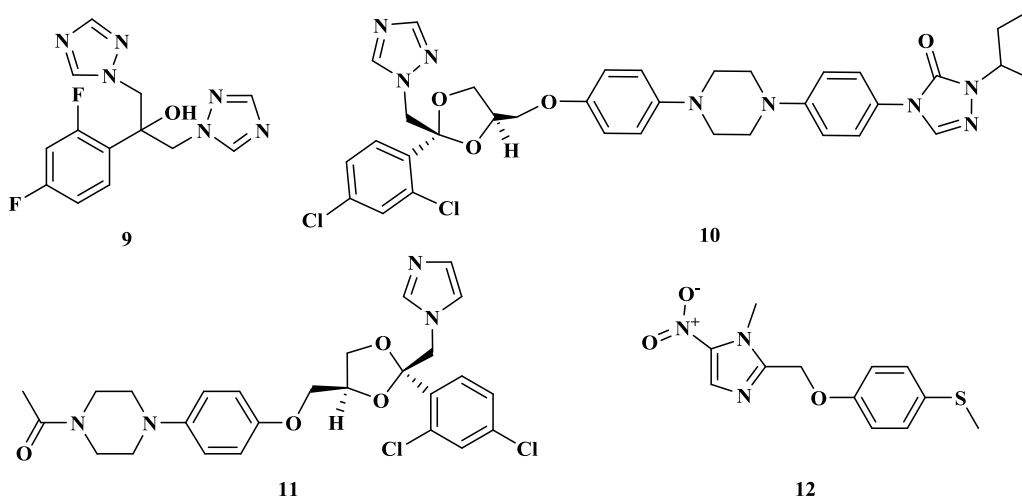
La Miltefosina es el único fármaco de administración oral para la LV y ha resultado eficaz en los casos de resistencia a antimoniales. Sin embargo, se han descrito casos de aparición de recaídas y se prevé la posible aparición de resistencias.⁴¹ Los efectos adversos son principalmente gastrointestinales y su uso está limitado en embarazadas por su teratogenicidad.⁴² También se han descrito otras fosfocolinas de administración oral, como la **Edelfosina (6, ET-18-OCH₃)** y la **Ilmofosina (7, BM41.1440)**.⁴³



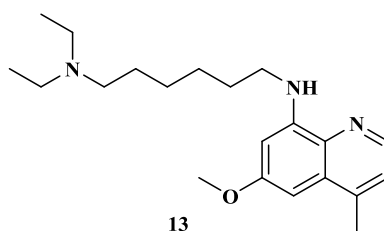
Paromomicina (8, Aminosidina): Antibiótico aminoglucósido de amplio espectro. Se aprobó para el tratamiento de la LV en el año 2006 y actualmente se encuentra en fase IV. Se dispone de formulaciones parenterales y tópicas para el tratamiento de la LV y de la LC respectivamente.⁴⁴



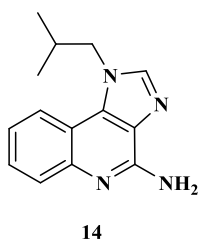
Derivados azólicos: Antifúngicos orales que inhiben la ruta biosintética del ergosterol. De entre los más estudiados en *Leishmania* destacan el **Fluconazol (9)**, **Itraconazol (10)** y **Ketoconazol (11)**, siendo este último el que ha mostrado, aunque de forma variable, una mayor eficacia clínica.⁴⁵ Recientemente, se ha descrito la efectividad del **Fexinidazol (12)** (fase II) para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea.⁴⁶



Sitamaquina (13, WR6026): derivado 8-aminoisoquinolina, usado tradicionalmente como agente antimalárico. Desde su descripción como potencial agente leishmanicida en 1979 se presentó como un prometedor tratamiento de administración oral. Sin embargo, tras completar los ensayos clínicos en fase II de GlaxoSmithKline en la India y Kenia, se ha suspendido su desarrollo clínico por sus efectos adversos, concretamente por su nefrotoxicidad.⁴⁷

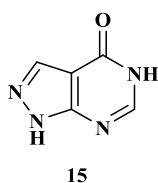


Imiquimod (14): Imidazoquinolina antiviral, aprobada para su uso tópico al 5% (Aldara®) en queratosis actínicas o en el carcinoma de células basales superficiales. Su probable mecanismo como leishmanicida se asocia a la liberación de citoquinas y óxido nítrico en macrófagos.⁴⁸



Actualmente, los diferentes estudios de tratamientos corresponden en su mayoría a ensayos clínicos de terapia combinada o coadministración entre estos fármacos ya establecidos como probados leishmanicidas o, su combinación con fármacos con otras indicaciones. Con esta estrategia terapéutica se pretende, además de aumentar la eficacia del tratamiento mediante la combinación de fármacos de actuación sinérgica o aditiva, reducir la dosis, período y costes de tratamiento, así como la aparición de efectos adversos y favorecer la adherencia al tratamiento por parte del paciente.⁴⁹

El **alopurinol (15):** Análogo nucleósido de purinas, utilizado para el tratamiento de la leishmaniosis canina, aun no siendo muy efectivo en humanos, aumenta la eficacia leishmanicida de los antimoniales Glucantime® o Pentostam®.⁴⁸



La combinación de antimoniales pentavalentes y paromomicina ha sido ampliamente utilizada en el sur de Sudán desde 2002 como terapia de primera línea para LV,⁵⁰ extendiéndose su estudio en otras regiones endémicas.⁵¹ También se ha descrito la combinación de los antimoniales con diferentes formulaciones de Anfotericina B, el inmunomodulador Imiquimod o la Miltefosina, y ésta última con Ketoconazol o Pentoxifilina.⁵²

2.1.2. *Trypanosoma cruzi* y Enfermedad de Chagas

2.1.2.1. El parásito

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado pleomórfico. En función del hospedador y su localización en el mismo, presenta hasta cuatro formas o estadios morfológicamente distinguibles, caracterizados por su curso intra- o extracelular, nacimiento del flagelo y posición relativa del kinetoplasto respecto del núcleo.⁵³

En el hospedador vertebrado se distinguen las formas *tripomastigote* sanguíneo y *amastigote* en macrófagos. Las formas *tripomastigotes* sanguíneos se caracterizan por adoptar una disposición característica en forma de “C” o “S”; son alargadas, de 10 a 25 μm de largo y de 1 a 5 μm de ancho, con un kinetoplasto grande a partir del cual nace un flagelo que forma una membrana ondulante (*figura 2.5.D*). Por el contrario, las formas replicativas o *amastigotes*, son ovoides de unos 4 μm de diámetro con un kinetoplasto compacto de forma bacilar (*figura 2.5.B*).

En el hospedador invertebrado también se diferencian dos estadios, la forma flagelada no replicativa *tripomastigote* y la *epimastigote*. Los *tripomastigotes* localizados en el extremo posterior del intestino en este hospedador son formas diferenciadas e infectivas, denominadas *tripomastigotes metacíclicos*, más alargados, con un kinetoplasto posterior al núcleo a partir del cual emerge una membrana ondulante. Las formas *epimastigotes* se encuentran en la luz intestinal del vector donde se reproducen extracelularmente por bipartición longitudinal (*figura 2.5.C*). Se caracterizan por ser de mayor tamaño que las formas *tripomastigotes*, con un kinetoplasto anterior al núcleo y una membrana ondulante corta.⁵⁴

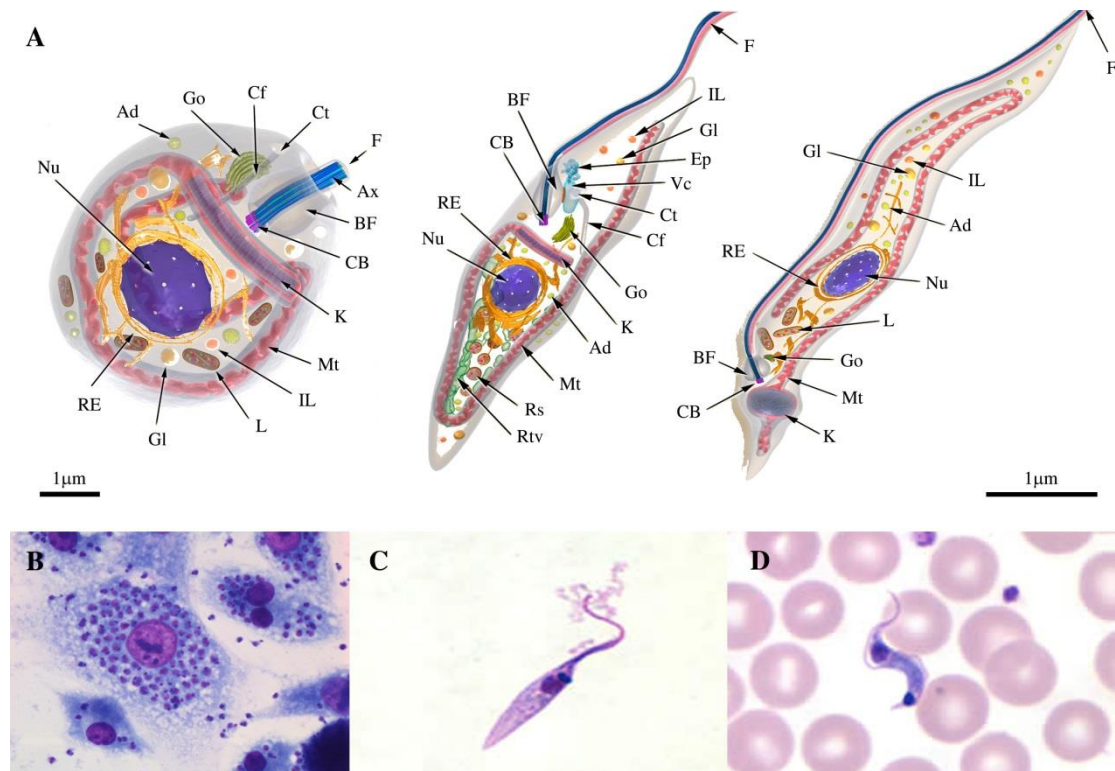


Figura 2.5. Formas parasitarias en *Trypanosoma cruzi*. **A.** Representación de las características ultraestructurales de las formas amastigote, epimastigote y tripomastigote. **Ad:** Acidocalcisoma; **Ax:** Axonema; **BF:** Bolsillo Flagelar; **CB:** Cuerpo Basal; **Cf:** Citofaringe; **Ct:** Citostoma; **Es:** Espongioma; **F:** Flagelo; **Gl:** Glicosoma; **Go:** Golgi; **IL:** Inclusiones Lipídicas; **K:** Kinetoplasto; **L:** Lisosoma; **Mt:** Mitocondria; **Nu:** Núcleo; **RE:** Reticulo endoplásmico; **Rs:** Reservosomas; **Rtv:** Red de túbulos y vesículas. **Vc:** Vacuola central; Modificado de Teixeira y col.⁵⁵ **B.** Amastigotes en macrófagos peritoneales de ratón, imagen de Cal y col.⁵⁶ **C.** Epimastigote en cultivo. **D.** Tripomastigote en un frotis de sangre periférica, tinción con giemsa. C y D de Centers for Disease Control and Prevention (CDC).⁵⁷

2.1.2.2. Ciclo biológico

El principal mecanismo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en zonas endémicas es a través de su vector natural, hemípteros hematófagos de la subfamilia triatominae como *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* entre otras especies.⁵⁸

El ciclo se inicia con la picadura de un triatmino infectado. Al alimentarse libera tripomastigotes metacíclicos, localizados en el extremo posterior de su intestino, a través de sus deyecciones (*figura 2.6, 1*). Estos alcanzan el torrente sanguíneo del hospedador a partir de cualquier pequeña solución de continuidad o por contacto con la conjuntiva. Los tripomastigotes circulantes son fagocitados por macrófagos del sistema fagocítico mononuclear (*2*), donde se transforman en amastigotes y se multiplican por simetrogonía en el interior de pseudoquistes de reproducción (*3*). Finalmente se transforman en tripomastigotes, que terminan por romper la célula infectada y liberarse al torrente sanguíneo (*4*). En su mayoría son tripomastigotes esbeltos, capaces de infectar una gran variedad de células y tejidos, preferentemente del sistema mononuclear fagocítico, de la musculatura estriada y del miocardio y células gliales.

Algunos tripomastigotes quedan en sangre, son los llamados tripomastigotes rechonchos, que van a quedar en espera de que un nuevo triatmino pique al hospedador para alimentarse (5). Las formas rechonchas pasan al intestino del insecto donde se transforman en epimastigotes (6). Después de multiplicarse por simetrogonia (7), los epimastigotes pasan al recto convirtiéndose allí en tripomastigotes (8) que se evacúan a través de las heces con el inicio de un nuevo ciclo.⁵⁹

Además de la transmisión a través de los triatominos, existen otros mecanismos, como la transmisión sanguínea en transfusiones y trasplantes de órganos, por transmisión vertical, o por ingestión de alimentos contaminados con heces de triatominos.⁶⁰

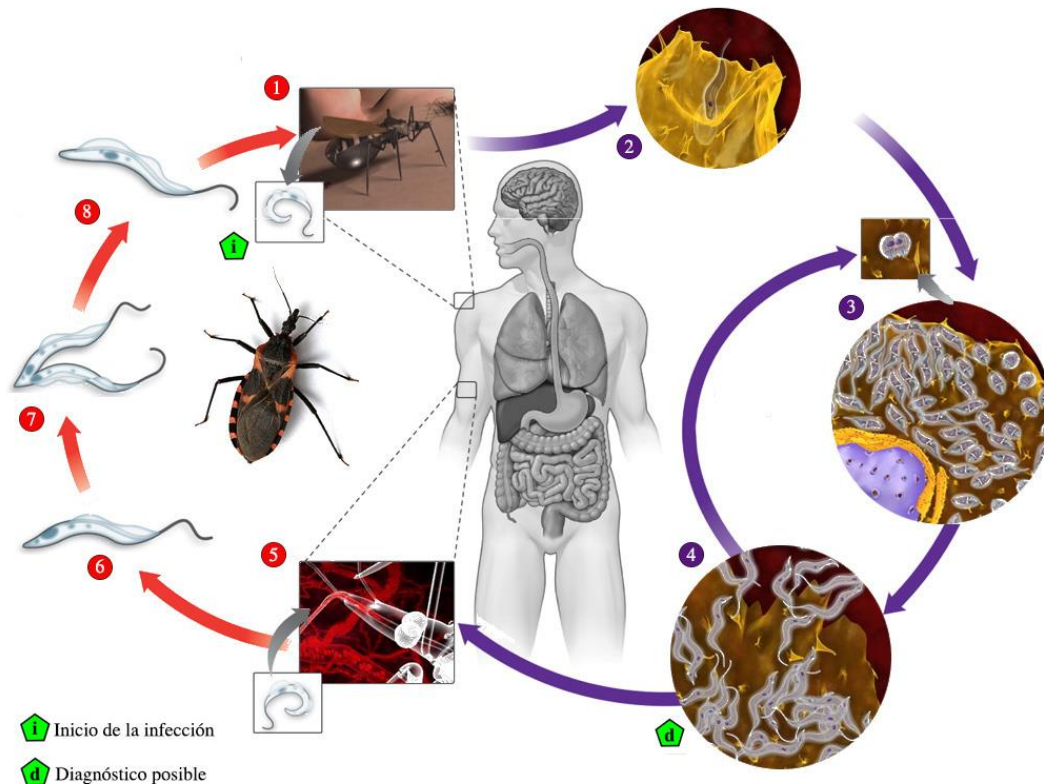


Figura 2.6. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Modificado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC).⁵⁷ Imágenes de Teixeira y col.⁵⁵

2.1.2.3. Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, descrita por primera vez por el médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas en 1909, es una parasitosis sistémica de pronóstico grave, que se da en la práctica totalidad del centro y sur del continente americano.⁶¹

La enfermedad cursa con dos fases clínicas, una aguda y otra crónica, tras un período de incubación de 3 a 12 días. La *fase aguda o temprana*, de mayor parasitemia, suele cursar de

manera asintomática, lo cual dificulta el diagnóstico y retarda el tratamiento. Sin embargo, en ocasiones, tras la primoinfección, se puede evidenciar la entrada del parásito por la aparición de una mácula local característica en el sitio de inoculación denominada *chagoma de inoculación*, que constituye un elemento diagnóstico de esta fase.

En un porcentaje menor de pacientes, la inoculación palpebral o a través de la conjuntiva provoca una inflamación periorbital unilateral conocida como *Signo de Romaña* (*figura 2.7*), acompañada de conjuntivitis y linfadenitis, manifestación también característica de la enfermedad.⁶²

A medida que el parásito se disemina desde del sitio de inoculación, el paciente presenta un cuadro clínico de sintomatología generalizada de intensidad y duración variable, como astenia, cefaleas e irritabilidad, hipertermia e inflamación de los ganglios linfáticos, y en ocasiones, hepato- y esplenomegalia.

Una vez superada la etapa aguda, si el individuo infectado no ha sido tratado, la infección cronifica a un estado asintomático durante décadas o de por vida (*fase indeterminada* de la infección). Se observa aproximadamente en el 50–70% de la población infectada, de los cuales un 30–50% evolucionarán a las formas sintomáticas, transcurridos 20, 30 ó más años. Las alteraciones que se presentan pueden ser de diferente grado y se agrupan según los órganos o sistemas afectados: formas cardíacas (miocardiopatía dilatada con bloqueo parcial o completo de rama derecha, que ocasiona arritmias e insuficiencia cardíaca), formas digestivas (megaesófago y megacolon) y formas neurológicas. La enfermedad cardíaca es, por lo general, la causa de la muerte del paciente.⁶³



Figura 2.7. Signo de Romaña
Centers for Disease Control
and Prevention (CDC)⁶⁴

2.1.2.4. Distribución y epidemiología

La tripanosomiasis americana es endémica en 21 países de América Latina, donde constituye la principal causa de defunción entre las enfermedades producidas por parásitos, incluida la malaria. Aunque es una enfermedad confinada principalmente en esta región por la presencia de su principal vector natural, en los últimos años se han producido notables cambios epidemiológicos (*figura 2.8*). Se ha registrado un creciente número de casos en países no endémicos como Estados Unidos, Canadá, muchos países europeos, entre ellos España, y algunos del Pacífico Occidental, asociado principalmente a los movimientos migratorios y en menor medida, a la transmisión congénita, a las transfusiones sanguíneas o a trasplantes de órganos de donantes infectados.⁶⁵

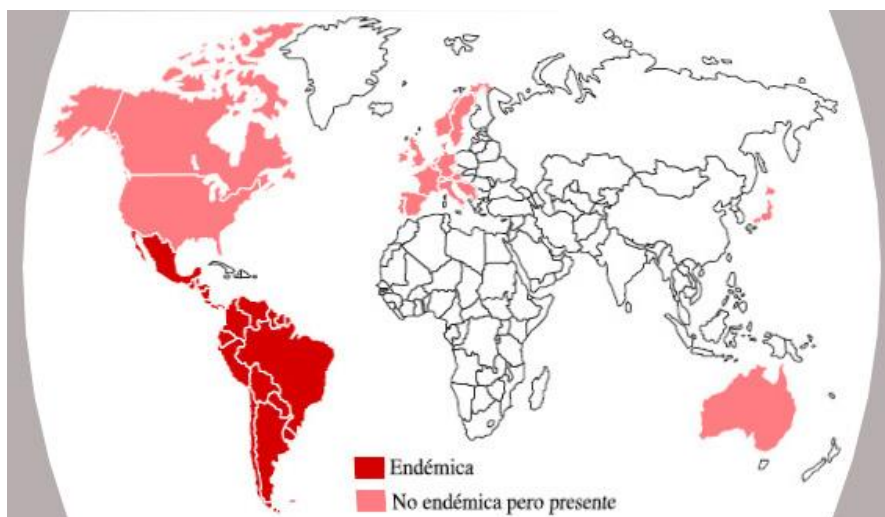
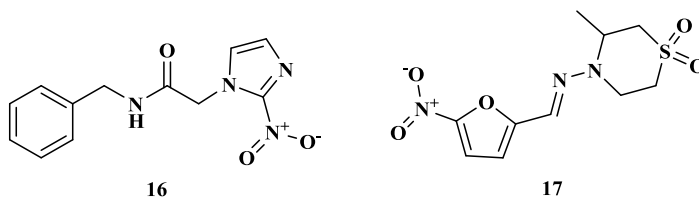


Figura 2.8. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas. Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi).^{65b}

2.1.2.5. Tratamiento

Muchos han sido los compuestos sometidos a estudios frente a *Trypanosoma cruzi*, sin embargo, sólo dos han demostrado ser eficaces, el **Benznidazol (16)**, un nitroimidazol comercializado desde 1966 y el **Nifurtimox (17)**, un nitrofurano comercializado desde 1970.⁶⁶

En ambos fármacos la acción tripanocida reside en la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos, al ser reducido el grupo nitro por la citocromo P450 y nitrorreductasas relacionadas de *T. cruzi*. La reducción del Nifurtimox genera radicales libres como aniones superóxido y peróxido de hidrógeno y metabolitos electrofílicos responsables del daño a macromoléculas intracelulares. Por el contrario, la acción tripanocida del Benznidazol no es debida a la formación de radicales libres, sino a metabolitos electrofílicos que se unen covalentemente a dichas macromoléculas.⁶⁷



Los dos fármacos han demostrado ser activos frente a formas tripomastigotes y amastigotes, pero presentan una eficacia limitada, tanto en la fase aguda como crónica. Además, provocan efectos adversos graves, como neutropenia, anorexia, pérdida de peso y otros más severos que requieren la suspensión de tratamiento.⁶⁸

Numerosos compuestos naturales y nuevos derivados de síntesis se encuentran en estudios preclínicos y clínicos, incluyendo el alopurinol y sus análogos, imidazoles antifúngicos, inhibidores de metabolismo del tripanotión, de diferentes proteasas como cisteína-proteasas y metilcboxipeptidasas, así como, inhibidores del metabolismo de pirofosfato.⁶⁹

2.2. CÁNCER

2.2.1. Definición y epidemiología

El cáncer es una de las enfermedades ligadas al progreso humano. Está considerada junto a las enfermedades cardiovasculares, diabetes e infecciones respiratorias crónicas, la enfermedad del siglo XXI por ser una de las principales causas de morbilidad y mortalidad.⁷⁰

El término cáncer es la denominación genérica de un conjunto de enfermedades derivadas células transformadas con capacidad proliferativa anormal e incontrolada y de invasión progresiva a órganos colindantes u órganos y tejidos más distantes por vía linfática o hematológica (metástasis).⁷¹ Estas enfermedades neoplásicas malignas pueden clasificarse en función de su localización, o de forma sintética a partir del tejido o tipo celular del cual derivan. Según esta última clasificación, se diferencian principalmente cuatro grupos: carcinomas (células epiteliales), como son el cáncer de pulmón, mama, colón, o próstata entre otros; sarcomas (células mesenquimales), como osteosarcomas y retinoblastomas; leucemias y linfomas (precursores hematopoyéticos), donde se incluyen diferentes tipos de leucemias, mieloma múltiple, linfomas no Hodgkin (LNH) y linfomas Hodgkin (LH); o tumores neuroectodermo (células del sistema nervioso central y periférico), que abarca los glioblastomas o neuroblastomas entre otros.⁷²

Según la OMS, los cánceres que causan un mayor número anual de muertes son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. El 70% de estas muertes se produce en África, Asia, América Central y Sudamérica, regiones donde además se registran el 60% de los nuevos casos por cáncer a nivel mundial. Una morbilidad que va en aumento, asociada al crecimiento y envejecimiento de la población y que, según el último informe publicado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), GLOBOCAN 2012, se prevé un aumento de 14 millones registrados en ese año a 22 millones en las próximas dos décadas.⁷³

2.2.2. Biología del cáncer

El origen del cáncer se sitúa en la acumulación gradual de alteraciones genéticas y epigenéticas responsables del fenotipo transformante. Estas alteraciones abarcan desde mutaciones puntuales hasta grandes aberraciones cromosómicas que dan lugar a la activación de determinados oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores⁷⁴ y alteración de la expresión de microARNs (mARNs), pequeñas secuencias de ARN no codificante que pueden actuar tanto como oncogenes como genes supresores de tumores.⁷⁵

El efecto de estas alteraciones como parte de un proceso micro-evolutivo determina las características distintivas y complementarias por las que se define el cáncer. Descritas por Hanahan y Weinberg, en uno de sus artículos más citados en los últimos años, con objeto de

establecer una racionalización conceptual de sus fundamentos fisiopatológicos y a partir de los cuales se fundamente la estrategia terapéutica (figura 2.9).



.....
Figura 2.9. Características distintivas y complementarias de las neoplasias malignas.
 Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011.⁷⁶

Las principales características de las neoplasias son la **autonomía de la señalización proliferativa** y la **evasión de las señales inhibitorias de crecimiento** que permiten su continua progresión a través del ciclo celular. Esta desregulación mitógena podría subsanarse a través de la inducción de los mecanismos homeostáticos del organismo, como son la senescencia o la muerte celular programada o apoptosis, sin embargo, también es capaz de evadirlos. La capacidad de **evasión de procesos homeostáticos**, junto con las dos características anteriores, proporcionan a la célula un **potencial replicativo ilimitado**, sustentado además por la **inestabilidad genómica** que caracteriza a las neoplasias.

Con la progresión tumoral, las capacidades funcionales que se adquieren derivan del microambiente tumoral, entendiéndose como tejido compuesto por múltiples tipos celulares. Su cooperación con el parénquima o estroma permite la **inducción de angiogénesis**, que junto a la **reprogramación del metabolismo energético** conocido como “efecto Warburg” o glicólisis anaerobia, permiten al tumor el aporte de nutrientes y oxígeno necesarios para sustentar su capacidad proliferativa. Además, este microambiente aporta una dimensión de mayor complejidad, proporcionando un **estado inflamatorio crónico** y la **capacidad de evadir la**

respuesta inmune que acrecentarán a modo de retroalimentación positiva el desarrollo del tumor, y en definitiva su capacidad de **invasión y metástasis**.⁷⁶

2.2.3. Regulación y progresión del ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto ordenado de eventos que conducen a la división celular. Es un proceso altamente conservado y estrictamente regulado a nivel génico para asegurar una duplicación del material genético y su posterior segregación en dos células hijas.

Los diferentes acontecimientos del proceso se agrupan en dos fases definidas: la interfase, periodo comprendido entre divisiones celulares, y la fase mitótica o fase M. En la interfase a su vez se distinguen tres fases, la fase G1, la fase S o fase de síntesis, y la fase G2. Las fases G1 y G2 (*phase gap*) son fases preparativas que le permiten a la célula crecer y comprobar que los eventos de la fase anterior se han producido adecuadamente, en cuyo caso se permite la transición G1/S y la G2/M. En determinadas condiciones, en la misma interfase se distingue una cuarta fase, conocida como fase G0 o de quiescencia, un estado post-mitótico que implica la salida del ciclo durante un periodo determinado hasta ser revertido por la señalización celular para su reentrada en el mismo.

La fase M o de mitosis comprende dos acontecimientos principales: la división del material genético nuclear (mitosis o división nuclear), por medio de las cuatro fases conocidas como profase, metafase, anafase y telofase, y la división celular propiamente dicha (citocinesis).

Muchos de los mecanismos de control en el ciclo celular tienen una naturaleza intrínseca, son constitutivos y están operacionales a lo largo del ciclo celular asegurando el correcto orden de las diferentes fases.

La progresión a lo largo del ciclo está controlada principalmente por tres grupos de proteínas: proteínas quinasas dependientes de ciclina (CDK, *Cyclin-Dependent Kinase protein*), ciclinas e inhibidores de las CDK (CDKI, *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*). La interacción cíclica entre estas proteínas, junto a procesos de fosforilación/desfosforilación, resulta en las funciones bioquímicas específicas de las fases individuales del ciclo celular (*figura 2.10*).

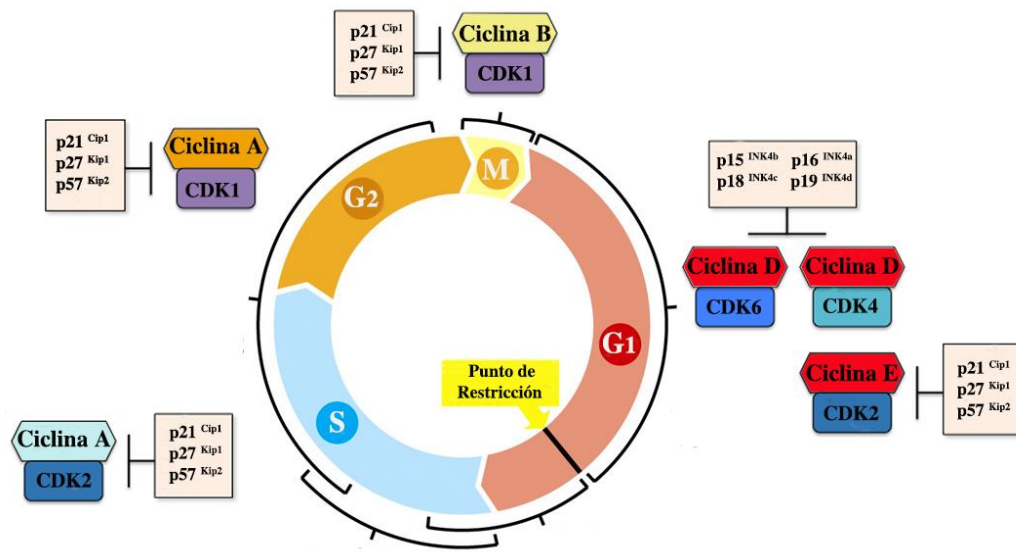


Figura 2.10. Progresión y regulación del ciclo celular en mamíferos. CDKs: 1, 2, 4 y 6; Ciclinas: A, B, D y E; CDKIs: p21^{CIP1/Waf1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}. Modificado de Weinberg, 2007.⁷²

2.2.3.1. Proteínas CDKs

Las proteínas CDKs constituyen el centro de regulación del ciclo celular. Son una familia de proteínas quinasas específicas de serina/treonina de entre 34-40 kDa, representadas en mamíferos por las CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6.

La capacidad de fosforilación específica de sustrato de estas quinasas viene determinada por su unión no covalente a proteínas activadoras tipo ciclina. Las CDKs activas, son por tanto, proteínas heterodiméricas consistentes en una subunidad catalítica y una subunidad reguladora o activante de tipo ciclina.

Las proteínas de tipo ciclina, denominadas así por su expresión cíclica a lo largo del ciclo celular, interaccionan con las CDKs a través de un dominio conservado de unos 100 aminoácidos, conocido como *cyclin box*. Los ciclos de síntesis y degradación a los que someten las ciclinas hacen que la actividad de las CDKs, pese a mantener su nivel de expresión constante, fluctúe a lo largo del ciclo celular.

Las diferentes ciclinas en mamíferos se dividen en cuatro clases, en función de su actividad en las diferentes fases del ciclo celular:

- Ciclinas G1: ciclinas D (D1, D2, D3), en particular la ciclina D1 por su expresión en todos los tipos celulares, que se asocia a CDK4 y CDK6 durante G1.
- Ciclinas G1/S: ciclinas E (E1, E2), que se asocian a CDK2 en G1 quedando la célula destinada a iniciar un nuevo ciclo.

- Ciclinas S: ciclinas A (A1, A2), que se asocian a CDK2 y CDK1. Éstas permiten estimular la duplicación de los cromosomas permaneciendo sus niveles elevados hasta la mitosis.
- Ciclinas M: ciclinas A (A1 y A2) y B (B1, B2). La ciclina A disminuye sus niveles tras superar la fase S, y la CDK1 libre rápidamente se asocia a la ciclina B. Ambas ciclinas mitóticas son necesarias para la entrada en mitosis.

2.2.3.2. Proteínas inhibidoras de CDKs (CDKIs)

Las CDKIs constituyen una familia heterogénea de proteínas que actúan como control negativo de las CDKs. Asociadas con las CDKs o con el complejo CDK-ciclina inhiben la actividad quinasa celular en respuesta a señales intrínsecas y/o extrínsecas al propio ciclo, como las relacionadas con procesos de senescencia, inhibición por contacto o señales antiproliferativas entre otros.⁷⁷

En mamíferos se distinguen dos familias de CDKIs en función de su homología de secuencia. La familia CIP/KIP (*CDK Interacting protein/Kinase Inhibitor Protein*) que incluye a p21^{CIP1/Waf1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}, y la familia INK4 (*INhibitors of cdK4*) que antagonizan específicamente a los complejos CDK4-D y CDK6-D, comprendida por p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}.⁷⁸

2.2.3.3. Puntos de control o *Checkpoints*

El principal punto de control del ciclo celular es el denominado **punto de restricción** en la transición G1/S. Tras la salida de mitosis las células pueden entrar en un estado quiescente G0 o continuar en G1 ante la presencia de señales mitógenas como hormonas de crecimiento. Esta señalización aumenta los niveles de las ciclinas D y E, y la formación de los complejos ciclina D-CDK4/6 y E-CDK2 que estimulan el metabolismo y el crecimiento de la célula, permitiendo el paso de este punto control, punto a partir del cual se produce la progresión del ciclo celular de manera autónoma, sin necesidad de señalización mitógena.

Sin embargo, existen otros controles no activos durante el ciclo, que son inducidos únicamente cuando se detectan defectos en los eventos centrales del mismo. Estos mecanismos de control, conocidos como *checkpoints*, son vías de señalización que aseguran la estabilidad, la correcta replicación y la distribución del material genético en las células. Los principales *checkpoints* descritos en células de mamíferos son los de daño al ADN⁷⁹ y los de las transiciones G2/M y metafase/anafase.⁸⁰

2.2.4. Senescencia

La senescencia celular se define como un estadio de parada permanente del ciclo celular. Las células senescentes, a diferencia de las células quiescentes o diferenciadas (aquellas que no se dividen), pierden la capacidad proliferativa en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos o de estrés, pero mantienen la viabilidad celular y actividad metabólica.⁸¹

El término senescencia celular fue acuñado por Leonard Hayflick y Paul Moorhead, quienes observaron que los fibroblastos humanos en cultivo presentaban una capacidad de proliferación limitada⁸². Actualmente, se define como un tipo de senescencia denominada “*senescencia replicativa*”, producida por el acortamiento gradual de las secuencias teloméricas en cada replicación celular en ausencia de actividad telomerasa endógena, diferenciándose de aquella producida por otros estímulos denominada *senescencia prematura o acelerada*.⁸³

Los diferentes estímulos que inducen senescencia prematura o acelerada comprenden: daño directo al ADN, aumento de la señalización constitutiva oncogénica⁸⁴, estrés oxidativo por acumulación ROS⁸⁵ o perturbación del estado de la cromatina.⁸⁶

El proceso de senescencia se extiende de manera fisiológica desde la remodelación de los tejidos en el desarrollo embrionario hasta la regeneración y reparación en el tejido adulto. Constituye una barrera natural frente al cáncer en términos de eliminación de células dañadas o superfluas detectable en la etapa benigna de la tumorigénesis.⁸⁷

La señalización oncogénica aumenta progresivamente durante las primeras etapas de la tumorigénesis hasta llegar a un umbral donde se activan diversos inhibidores del ciclo celular, como p16 o p15, que compensan la señalización oncogénica entrando en senescencia. Estas células senescentes secretan citosinas, quimiocinas y determinadas proteasas dando lugar al denominado fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*). A través del SASP, el sistema inmune puede reconocer las células senescentes y actuar como sistema de eliminación de células pre-cancerosas⁸⁸. Sin embargo, el proceso puede verse alterado por una combinación de factores, particularmente por el estado inflamatorio generado por el mismo SASP con la secreción de factores tumorigénicos, que dañan a las células circundantes⁸⁹.

Además de favorecer la progresión tumoral, la senescencia también se ha asociado a diferentes enfermedades, como el aneurisma cerebral y cardíaco, el glaucoma, el Alzheimer y el Parkinson, la fibrosis o la osteoartritis.⁹⁰ Como resultado de esta dualidad, la senescencia es considerada como un ejemplo de “pleiotropía antagónica”⁹¹.

Las células senescentes pueden diferenciarse de las células quiescentes por diferentes marcadores bioquímicos y cambios morfológicos. Estos últimos son fácilmente discernibles en cultivo, sin embargo, no se observan *in vivo*, donde las células senescentes mantienen la morfología normal dictada por la arquitectura del tejido.

La característica morfológica más evidente del estado senescente, ya descrita por Hayflick, es la hipertrofia celular⁸², alcanzándose un aumento del tamaño celular que puede llegar a ser el doble de las no senescentes. Se observan además como células aplanadas, con un aumento de la granulosidad citoplasmática, y en ocasiones, como células multinucleadas.

Se distinguen diferentes marcadores bioquímicos, entre los que se incluye el fenotipo secretor SASP mencionado anteriormente (*figura 2.11*). Aunque ninguno de estos marcadores es por sí mismo específico o universal de todos los tipos de senescencia, las células senescentes expresan muchos de ellos.

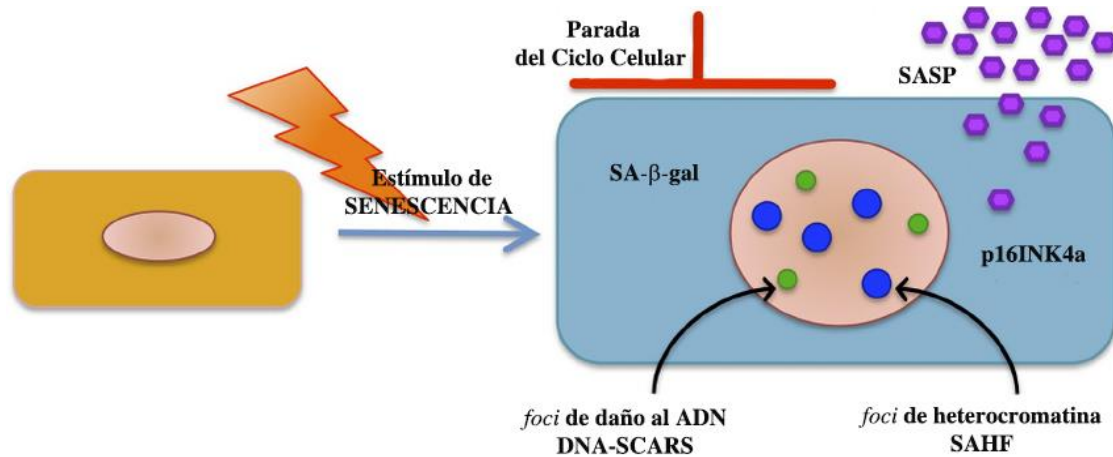


Figura 2.11. Características del fenotipo senescente. **DNA-SCARS:** *DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence*; **SAHF:** *Senescence Associated Heterochromatin Foci*. Modificado de Rodier & Campisi, 2011.⁸³

1. Actividad β -galactosidasa. Mediante tinción citoquímica puede detectarse la actividad de la β -galactosidasa, más comúnmente conocida como SA- β -gal (*Senescence-Associated β -galactosidase*). La enzima β -galactosidasa es una enzima hidrolasa lisosomal cuya función es la de cortar los extremos β -glicosídicos de una gran variedad de sustratos como gangliósidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos. Esta enzima, coincidiendo con su localización en un orgánulo ácido, presenta mayor actividad a pH 4. Sin embargo, y por lo que se considera un marcador de senescencia, debido al aumento de la masa lisosomal⁹² y el aumento de los niveles de expresión del gen *GLB1* (*Galactosidase Beta 1*)⁹³ en el estado senescente, puede detectarse a un pH subóptimo (pH = 6).

2. Expresión de genes supresores de tumores e inhibidores del ciclo celular. La parada del ciclo celular, ya sea en la fase G1 o G2/M, es mantenido en parte debido al aumento de la expresión de inhibidores de CDKs (p16^{INK4}, p21^{Waf1/CIP1} y p27^{Kip1}) donde convergen los diferentes estímulos de inducción de senescencia ya sea dependiente o no de p53.⁹⁴

3. Formación de núcleos de heterocromatina o de daño al ADN. Las células que entran en senescencia, debido a una señalización persistente de daño al ADN, forman *foci* nucleares denominados DNA-SCARS (*DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence*), constituidos de proteínas de señalización de daño al ADN y sus sustratos⁹⁵

Por otro lado, en algunas células se forman regiones citológicamente detectables de heterocromatina denominados SAHF (*Senescence Associated Heterochromatin Foci*), que reprimen la transcripción de genes esenciales para la proliferación celular, como los genes diana del factor de transcripción E2F.⁹⁶

2.2.5. Muerte celular programada: Apoptosis

El término *apoptosis* fue introducido por Kerr y Wyllie para definir una muerte celular regulada, fundamentada en meras observaciones de los cambios morfológicos que sufrían las células, y que a diferencia de la necrosis, no se producía la liberación del contenido citoplasmático al exterior.⁹⁷

La apoptosis es un proceso altamente regulado a nivel genético resultando en la eliminación ordenada y eficiente de células superfluas, dañadas o anómalas ante la ineficacia de la respuesta adaptativa a un determinado estrés, el cual determinará la finalidad última del proceso apoptótico.

Durante la etapa embrionaria, la apoptosis permite una correcta morfogénesis contribuyendo al correcto desarrollo embrionario, y en la edad adulta mantiene la homeostasis de los tejidos y del sistema inmune. Su desregulación está asociada tanto a la iniciación y progresión de la tumorigénesis, como al desarrollo de enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas o cardiovasculares.⁹⁸ Concretamente, por su desregulación en el desarrollo tumorigénico, en ocasiones asociada a la resistencia de los tratamientos, conlleva a que conceptualmente, al igual que la senescencia, pueda considerarse como una barrera natural al desarrollo de cáncer, por lo que resulta imperativo el estudio de sus vías de señalización como potenciales dianas para subsanar la ineficacia de determinados tratamientos.⁹⁹

La regulación del proceso apoptótico viene definida por la participación de numerosas familias génicas, como son la familia de las caspasas, Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*), receptores de muerte TNF (*Tumor Necrosis Factor*), determinados oncogenes y protooncogenes,¹⁰⁰ y los descritos en los últimos años, microRNAs (mRNAs)¹⁰¹ y esfingolípidos en varios tipos de cáncer.¹⁰²

Durante muchos años, el concepto de muerte celular programada como respuesta a quimioterapia se asoció directamente a la apoptosis. Sin embargo, diferentes estudios demostraron la falta de correlación entre el índice apoptótico y el estado funcional de la proteína supresora de tumores p53 y los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas. Por tanto, contrariamente a lo que se creía, éstos no son predictivos de la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, y no hay un único proceso de muerte, sino que la célula selecciona entre distintas vías de muerte dependiendo del tipo celular, el genotipo de la célula, el daño al cual la célula se expone y la dosis de fármaco.¹⁰³

La clasificación más actualizada de los distintos tipos de muerte celular programada publicada en 2012 por el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD, *Nomenclature Committee on Cell Death*), basándose tanto en características morfológicas como bioquímicas, diferencia hasta 13 tipos de muerte. De entre éstas, son tres los tipos de muerte celular programa

mejor estudiados en respuesta a agentes antitumorales: apoptosis o muerte celular programada tipo I, autofagia o muerte celular programada tipo II, y necroptosis o muerte celular programada tipo III. La célula puede morir por cualquiera de estas vías o por una combinación de las mismas, bien actuando de manera paralela, antagónica o exclusiva.¹⁰⁴

2.2.5.1. Efectores intracelulares: Caspasas

Las caspasas son una familia de peptidasas que comparten la especificidad de proteólisis de sus sustratos después de un residuo de aspartato, actuando como nucleófilo catalítico una cisteína. Son por tanto, cisteína-proteasas específicas de ácido aspártico, y de cuya especificidad deriva su denominación en proteínas caspasas (*Cystein-dependent Aspartate-directed proteASES*).

Se trata de una familia de enzimas muy conservadas en la evolución. Se conocen hasta 14 caspasas en mamíferos, que constituyen la familia C14 de peptidasas clan CD en la base de datos MEROPS,¹⁰⁵ de las cuales 11 se expresan en humanos.

Su análisis filogenético ha permitido diferenciarlas en dos subfamilias según realicen su función en un proceso inflamatorio o apoptótico. En la subfamilia perteneciente al grupo inflamatorio se encuentran la caspasa-1, primera caspasa descrita como ICE (*Interleukin-1 β Converting Enzyme*) y las caspasas-4 y -5. En el grupo apoptótico se agrupan aquellas relacionadas con el gen *ced-3* que se corresponden con las caspasas -2, -3, -6, -7, -8, -9 y -10. La caspasa-14 aparece como una enzima especializada que se expresa preferentemente en el epitelio cornificado, implicada en la diferenciación de los queratinocitos en la epidermis. Por lo que, si bien son ampliamente descritas en el proceso de apoptosis, su función se extiende a procesos de proliferación celular, supervivencia, inflamación, diferenciación y migración celular.¹⁰⁶

Las caspasas se expresan en forma de zimógenos (enzimas inactivas o pro-caspasas), monómeros donde se distinguen tres dominios: un prodominio N-terminal muy variable tanto en secuencia como longitud con funciones de regulación y activación, y una unidad catalítica que comprende una subunidad grande (17-20 kDa) y una subunidad pequeña (10-12 kDa) unidas por una secuencia de unión (IL, *Intersubunit Linker*).

La activación de cada caspasa requiere un mínimo de dos roturas proteolíticas: una en la que se separa el prodominio del resto de la molécula, y otra ruptura entre las subunidades grande y pequeña. Estos cortes, en los que están implicados residuos de ácido aspártico, se producen de un modo ordenado y van seguidos de la asociación de dos de cada una de las subunidades o protómeros para formar una estructura tetramérica, un único dominio conocido como plegamiento hemoglobinas con dos centros activos y una especificidad absoluta de corte detrás de un residuo de aspártico¹⁰⁷ (*Figura 2.12*).

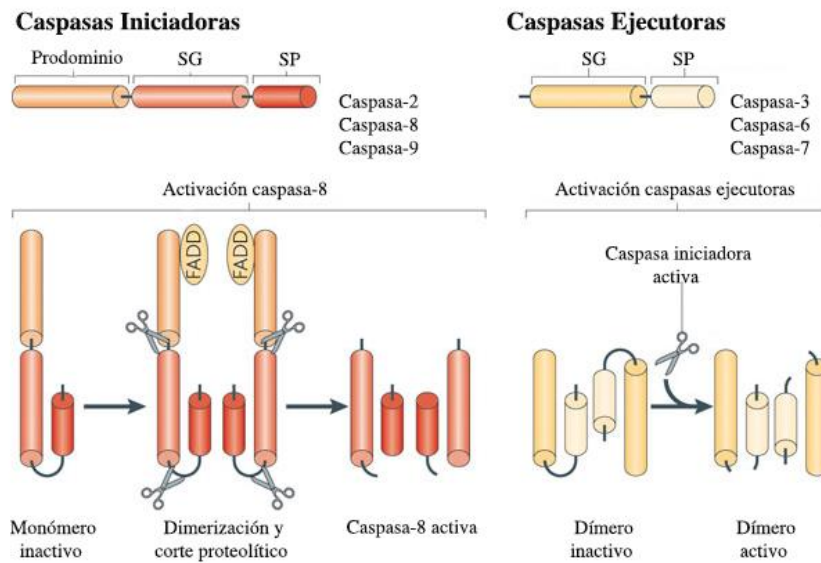


Figura 2.12. Estructura y activación de caspasas apoptóticas. SG: Subunidad Grande; SP: Subunidad Pequeña. Modificado de Tait & Green, 2010.¹⁰⁸

Las diferencias en la longitud de sus prodominios, el modo de activación y su localización en la vía de señalización apoptótica, permiten una subclasificación adicional de las caspasas apoptóticas, en iniciadoras o ejecutoras. Las caspasas iniciadoras (-8, -9, y -10) presentan un prodominio más largo en la región N-terminal, que varía entre 119 y 229 aminoácidos. Es en esta región donde se localizan secuencias especializadas, el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD, *Caspase Recruitment Domain*) y dominios DED (*Death-Effector Domain*), a través de los cuales pueden ensamblarse con proteínas adaptadoras y reguladoras en complejos comúnmente denominados *plataformas de activación*, y donde adquieren su forma activa por autoproteólisis y/o cambio conformacional.¹⁰⁹

Las caspasas efectoras o ejecutoras, caspasas -3 y -7, se caracterizan por un pro-dominio corto donde están ausentes las secuencias de reclutamiento. Éstas serán activadas por proteólisis a partir de las caspasas iniciadoras, resultando en un proceso de amplificación de la señal apoptótica.¹¹⁰

Una vez activadas, las caspasas ejercen su actividad proteolítica sobre un amplio número de sustratos, los cuales se encuentran descritos en la base de datos CASBAH (*Caspase Substrate dataBase*).¹¹¹ La preferencia por determinados sustratos viene determinada por el reconocimiento de diferentes motivos tetrapeptídicos, lo que a su vez permiten clasificarlas en: grupo I (caspasa-1, -4, -5 y -14) de preferencia por W/LEHD, grupo II (caspasas-2, -3, -7) por DEXD y grupo III (caspasas-6, -8, -9 y -10) por L/VEXD.^{107b}

Los diferentes eventos proteolíticos de estos sustratos, principalmente por las caspasas efectoras -3 y -7, desencadenan los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis^{107a}: disminución del volumen y retracción de la célula en los estadios tempranos; distribución de los fosfolípidos de la membrana formándose protrusiones o invaginaciones

(*bebbling*), así como la translocación de la fosfatidilserina (FS); fragmentación nuclear; y fragmentación en escalera resultante de la escisión de la cromatina en sus regiones internucleosomales por las endonucleasas CAD (*Caspase-Activated DNase*).

2.2.5.2. Vías de señalización del proceso apoptótico

Según el estímulo apoptótico, su regulación se realiza a través de dos vías de señalización diferenciadas, pero no excluyentes, la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca derivada de la activación de receptores de superficie. Ambas vías convergen en la activación de las enzimas proteolíticas denominadas *caspasas* que median rápidamente el desmantelamiento de la estructura celular ¹¹²

Vía intrínseca o vía mitocondrial

La vía intrínseca o mitocondrial responde a cualquier tipo de estrés intracelular, como irradiaciones, fármacos, niveles altos de ROS, infecciones virales, activación de oncogenes, deficiencia de factores de crecimiento, citoquinas o ciertos tipos de hormonas. ¹¹³

La NCCD define esta vía como un proceso de muerte celular mediada por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane Pore Permeabilization*), asociado a una disipación generalizada e irreversible del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) e inhibición de la cadena respiratoria, acompañada de la liberación de proteínas del espacio intermembrana al citosol y su relocalización en otros compartimentos subcelulares. ¹⁰⁴

La familia de las proteínas *Bcl-2*

Las proteínas de la familia *Bcl-2* (*B-Cell Lymphoma 2*) son los efectores intracelulares directos de la MOMP. La característica estructural común entre las proteínas de esta familia y por la que se definen, es la presencia de regiones homólogas a *Bcl-2* denominadas BH (*Bcl-2 Homology*), distinguiéndose hasta 4 dominios diferentes (BH1-BH4). Los dominios BH determinan la capacidad de interactuar entre ellas formando homo o heterodímeros o con otras proteínas no relacionadas.

Atendiéndose a diferencias funcionales en el proceso de apoptosis se distinguen entre proteínas anti-apoptóticas o pro-apoptóticas. Las proteínas anti-apoptóticas, entre las que se incluye *Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *Bcl-w*, *Bcl-b*, o *Mcl-1*, presentan de tres a cuatro dominios BH, mientras que las pro-apoptóticas pueden dividirse en dos subfamilias en función de la composición de sus dominios: proteínas pro-apoptóticas multidominio (*Bax* y *Bak*), las cuales incorporan BH1, 2 y 3, y las pro-apoptóticas, que tan solo presentan en su secuencia un dominio BH3 (*Bim*, *Puma*, *Noxa*, etc.). ¹¹⁴

Ante un estímulo apoptótico, se produce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) y la oligomerización de Bax y Bak. El potencial de membrana mitocondrial disminuye asociado a un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico, con una disminución de la síntesis de ATP y la liberación desde el espacio intermembrana al citosol de factores apoptogénicos. De entre estos, el citocromo c se une a Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*) y (d)ATP en el citosol, provocando la oligomerización de Apaf-1 en una estructura heptamérica, el *apoptosoma*. Éste constituye la plataforma de activación de la caspasa-9, a través de un modelo de conformación inducida, y la consiguiente activación de la caspasa-3.

Tras la MOMP, junto al citocromo c, también son liberados el factor inductor de apoptosis (AIF, *Apoptosis-Inducing Factor*), Smac/ DIABLO, EndoG y Omi/HtrA2, los cuales inhiben la función antiapoptótica de diferentes miembros de la familia IAP (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) y contrarrestan la inhibición de las caspasas. Además, AIF, EndoG y Omi/HtrA2 pueden activar la apoptosis independientemente de las caspasas, AIF y EndoG por su translocación al núcleo y mediación de la fragmentación del ADN y, Omi/HtrA2, por su actividad serina proteasa^{108, 115} (*figura 2.13*).

Vía extrínseca

El término apoptosis extrínseca es utilizado para definir la muerte celular apoptótica inducida por señales de estrés extracelular que son detectadas y propagadas por receptores transmembrana específicos. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor TNF (TNFR, *Tumor Necrosis Factor Receptor*), con un dominio común extracelular rico en cisteínas y la presencia de un dominio intra-citoplasmático de transducción de la señal desde el receptor con el resto de la maquinaria apoptótica.

La activación de la vía extrínseca se inicia con la interacción de citoquinas pro-apoptóticas y pro-inflamatorias como FasL/CD95, TNF α , o TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*), con sus respectivos receptores, Fas (CD95), TNFR1 y TRAILR1 respectivamente.¹¹⁶

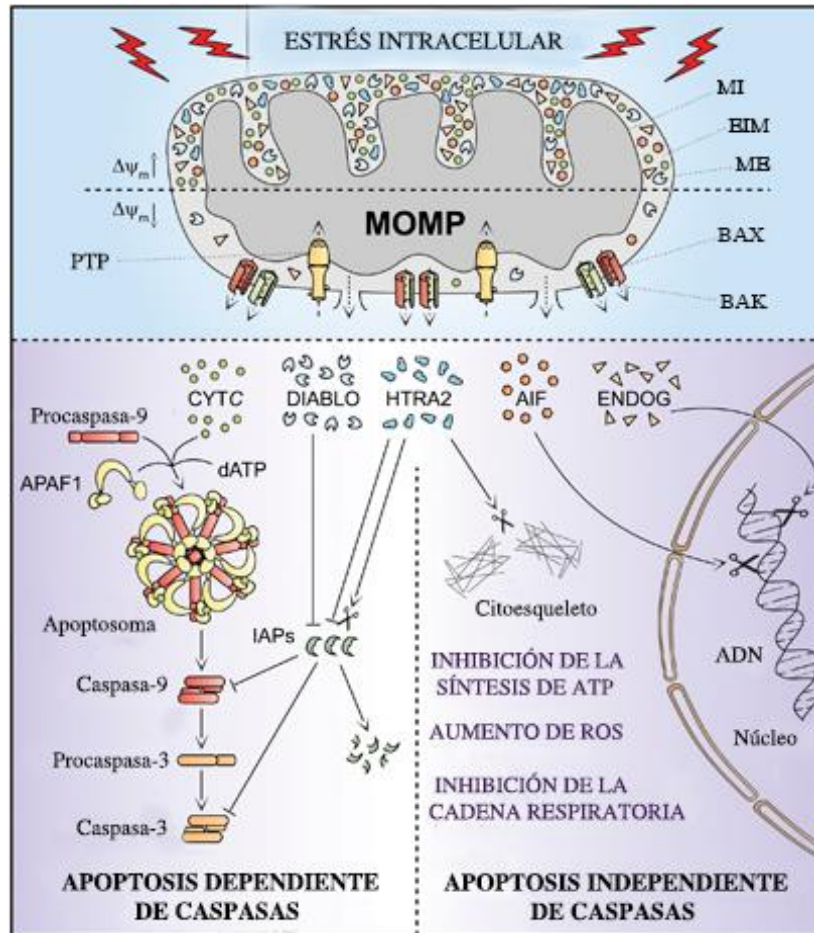


Figura 2.13. Vía intrínseca o mitocondrial dependiente e independiente de caspasas. MI: Membrana interna; EIM: Espacio intermembrana; ME: Membrana externa; MOMP: Permeabilización de la membrana externa mitocondrial; PTP: Poro de transición de permeabilidad. Modificado de Galluzzi *et al*, 2012.¹⁰⁴

Tras la unión del ligando al receptor, previa homotrimerización espontánea, se induce un cambio conformacional que permite la accesibilidad de su dominios DD (*Death Domain*) en la parte citosólica, a través del cual se unirán mediante interacciones homofílicas diferentes proteínas adaptadoras formando un complejo multiproteico dinámico. Entre las proteínas adaptadoras se encuentran RIP1 (*Receptor-Interacting Protein kinase-1*), FADD (*FAS-Associated Protein with a DD*) y TRADD (*TNFR-Associated DD*). La diferente participación de estas proteínas adaptadoras en las vías de señalización de los receptores de muerte permite diferenciarlos en subgrupos con propiedades de señalización específicas.¹¹⁷

Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte DED capaces de interactuar homofílicamente con las caspasas -8 y -10. Así, se forma un complejo de señalización de inducción de muerte (DISC, *Death-Inducing Signaling Complex*), en el que las caspasas se activan siguiendo un modelo de activación inducido por proximidad. Finalmente, la activación de las caspasas iniciadoras -8 y -10, provoca la activación por proteólisis de las caspasas ejecutoras -3 y -7¹¹⁸ (Figura 2.14).

En determinados tipos celulares, la baja expresión del DISC y la menor actividad de las caspasas iniciadoras hacen necesaria la cooperación con las mitocondrias para inducir apoptosis. En estas condiciones, las caspasas iniciadoras activan a la proteína Bid por corte proteolítico, lo que permite a la proteína truncada (tBid) activar a Bax/Bak e inducir la formación de MOMP, conectando de esta forma la vía extrínseca de la apoptosis con la mitocondrial.¹¹⁹

El NCCD considera adicionalmente una tercera vía de activación de la apoptosis extrínseca a través de “receptores de dependencia”, los cuales solo ejercen su función letal cuando la concentración de ligando disminuye por debajo de ciertos límites críticos.¹²⁰

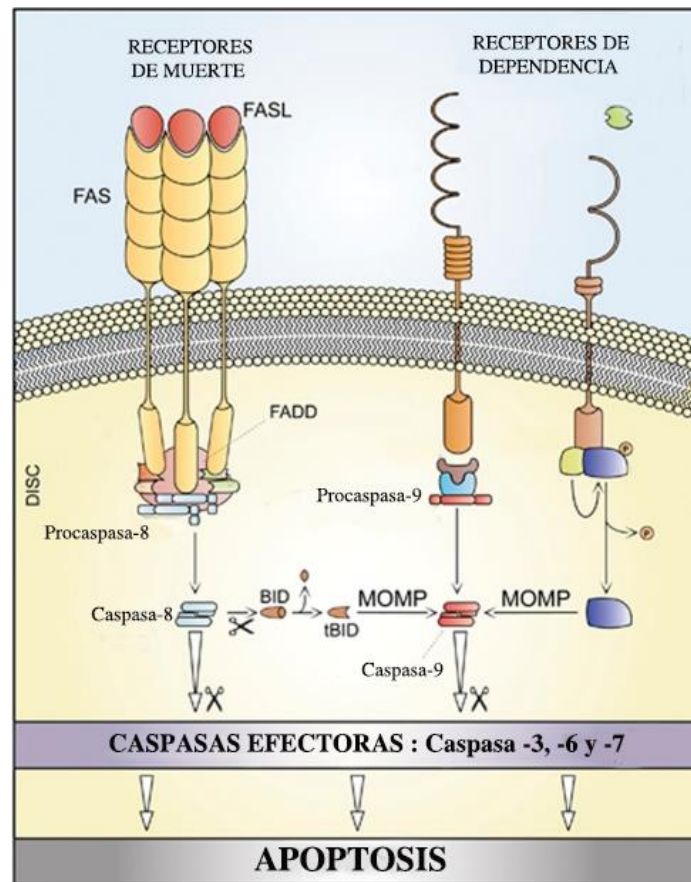


Figura 2.14. Vía extrínseca de activación de apoptosis. Modificado de Galluzzi *et al*, 2012.¹⁰⁴

2.2.6. Citoesqueleto celular: Microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros proteicos de forma tubular que constituyen, junto con los filamentos de actina y los filamentos intermedios, el citoesqueleto dinámico de células eucariotas. Son proteínas multifuncionales que contribuyen al mantenimiento de la forma celular, participan en procesos de transporte intracelular, de vesículas y orgánulos y permiten la

segregación de las cromátidas hermanas durante la profase-metafase con la formación del huso mitótico.

Los microtúbulos se describen estructuralmente como fibras huecas de unos 25 nm de diámetro formadas a partir de una envoltura helicoidal por la unión no covalente de heterodímeros de tubulina.

La molécula de tubulina está compuesta por dos isómeros o isoformas: la subunidad α y la subunidad β (de dimensiones 4 nm x 5 nm x 8 nm y 10.000 Da en masa). Estos monómeros comparten el 40% de identidad de secuencia que define una estructura terciaria muy similar para ambos. Están formados por dos láminas β , de 6 cadenas para la subunidad α y, 4 cadenas para la subunidad β , flanqueadas por 12 hélices alfa (*figura 2.15.A*).

La unión progresiva de los heterodímeros de tubulina, a modo de “cabeza con cola”, define la estructura del microtúbulo en 11-16 protofilamentos ordenados longitudinalmente. Se trata de una polimerización no covalente, por condensación nucleada, en una orientación definida. Esta direccionalidad es un factor significativo en las diferentes funciones que llevan a cabo y está determinada por diferentes velocidades de disociación en cada uno de sus extremos: extremo (+) o distal de baja constante de disociación y alta polimerización y, extremo (-) o proximal, de elevada constante de disociación y baja polimerización (*figura 2.15.B*).¹²¹

En el proceso de polimerización se describen tres fases o etapas diferenciadas. Inicialmente se define una fase de nucleación por asociación de los dímeros de tubulina. Éstos forman un oligómero metaestable dependiente de una concentración crítica. A partir de unos seis o siete dímeros se produce la elongación, por la adición de otros dímeros de tubulina, evitando así la hidrólisis a sus componentes iniciales, hasta alcanzar finalmente un estado estacionario.

No obstante, los microtúbulos presentan una dinámica de polimerización compleja, esencial para sus funciones celulares. Se trata de un proceso estrictamente regulado, tanto espacial como temporalmente, caracterizado por un comportamiento cooperativo de los monómeros de tubulina, dependiente de la concentración de tubulina citosólica y ejecutable por la hidrólisis de GTP.¹²²

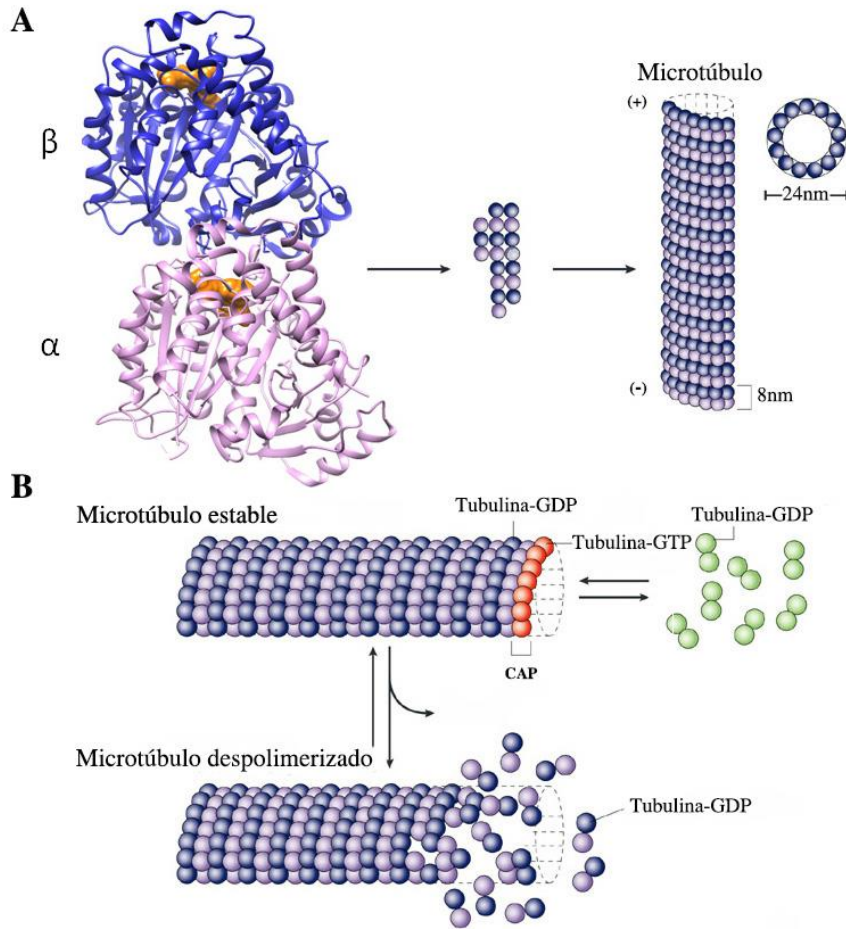


Figura 2.15. Representación de la estructura de los microtúbulos. **A.** Dímero de α - β tubulina (PDB.1TUB), interacción lineal de los mismos representados como esferas. **B.** Dinámica de polimerización. Modificado de Jordan & Wilson, 2004.¹²³

Cada subunidad de tubulina presenta un sitio de unión de nucleótido de GTP, unido de manera irreversible en la subunidad α , e hidrolizable en la subunidad β , por su exclusiva actividad GTPasa. En el proceso de nucleación, tras la unión del dímero, el GTP de la subunidad β se hidroliza a GDP y Pi, induciendo un cambio conformacional en el dímero que disminuye su afinidad por otros heterodímeros de tubulina. Puesto que la incorporación de GTP-tubulina es más rápida que la hidrólisis, se origina una “caperuza” de protección de GTP-tubulina que impide su rápida disociación. Esta estructura hace más estable el extremo positivo y bajo estas condiciones el microtúbulo crecerá en longitud. Sin embargo, las unidades de tubulina que contienen GDP en los extremos libres de caperuza se disociarán rápidamente. Estos dos procesos se encuentran en equilibrio, de modo que la longitud de los microtúbulos permanece constante a pesar de la reconstrucción en sus extremos. Se trata de un mecanismo de tapiz rodante o “*treadmilling*”: adición neta de dímeros de tubulina en el extremo positivo acoplado con una disociación neta en el extremo negativo, produciendo un flujo de subunidades de un extremo del microtúbulo a otro sin cambiar significativamente la longitud media de los microtúbulos.¹²⁴

La polimerización de los microtúbulos también se rige por otro “estado de no equilibrio”, denominado “inestabilidad dinámica”, en el cual el microtúbulo alterna procesos de alta polimerización, periodos de alargamiento lento y, breves periodos de acortamiento rápido en su extremo positivo, más rápidamente que en su extremo negativo. Dicho comportamiento se caracteriza principalmente por cuatro variables: la relación de crecimiento, la de acortamiento, la frecuencia de transición entre el crecimiento o el estado estable al acortamiento (catástrofe) y la frecuencia de la transición opuesta (rescate) (*figura 2.16*).¹²⁵ El resultado es un cambio en la longitud del polímero.

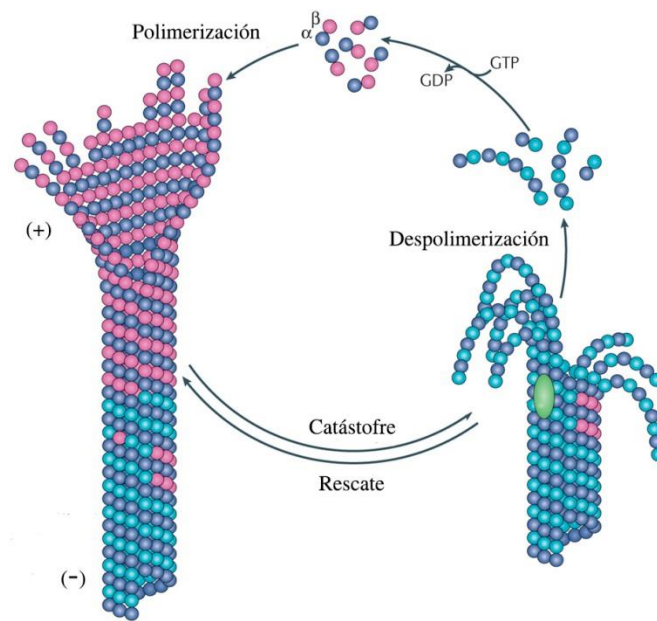


Figura 2.16. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. Modificado de Akhmanova & Steinmetz, 2015.¹²⁶

2.2.7. Tubulina como diana farmacológica en cáncer

Los microtúbulos son dianas de un grupo químicamente divergente de fármacos antimitóticos, conocidos como agentes de unión a la tubulina (TBA, *tubulin binding agents*). Éstos interfieren en la dinámica microtubular, bien por su unión a la tubulina soluble, o directamente a la superficie de los microtúbulos, favoreciendo o inhibiendo su polimerización. La supresión de la dinámica microtubular resulta en el bloqueo de mitosis en la transición metafase-anafase e inducción de muerte celular por apoptosis.¹²⁷

Se han caracterizado cuatro sitios de unión a través de los cuales interaccionan los TBAs, determinados mediante el análisis de las estructuras cristalinas de la proteína con los distintos fármacos: (1) sitio de unión al Taxol, (2) dominio de la Vinca, (3) de la Colchicina y (4) de Laulimalida (*figura 2.17*); y más recientemente, se ha descrito otro sitio de interacción para la Maitansina.¹²⁸

1). Sitio de unión al Taxol. Los taxanos son un grupo de agentes antineoplásicos que promueven la polimerización de la tubulina. Son por ello conocidos como agentes estabilizantes. Los principales representantes de este grupo son el Paclitaxel (Taxol[®]), alcaloide aislado del *Taxus brevifolia* y, el Docetaxel (Taxorete[®]), análogo semisintético extraído de las hojas del *Taxus baccata*. Ambos fármacos son ampliamente utilizados en la clínica para el tratamiento de diferentes tumores sólidos (mama, ovario, próstata o pulmón).¹²⁹

Los taxanos se unen débilmente a la tubulina soluble, sin embargo, son capaces de interactuar directamente a lo largo de la longitud del microtúbulo con gran afinidad. Su sitio de unión se localiza en la superficie interior de los microtúbulos, en un bolsillo hidrofóbico de la subunidad β . Tras su unión, inducen un cambio conformacional de la tubulina que incrementa la afinidad de moléculas de tubulina vecinas. A elevadas concentraciones de fármaco, favorecen la polimerización, incrementando la masa del polímero, mientras que a bajas concentraciones, interfieren en la polimerización de los microtúbulos inhibiendo su inestabilidad dinámica.¹³⁰

2) Sitio de unión a la Laulimalida. Al igual que los taxanos, la Laulimalida es un potente estabilizador de los microtúbulos. Presenta una actividad antiproliferativa *in vitro* con valores de IC₅₀ del rango nM en un amplia variedad de líneas celulares de diferente origen tumoral, incluso en líneas celulares resistentes a Paclitaxel por sobreexpresión de P-gp.¹³¹ Sin embargo, su eficacia *in vivo* ha demostrado ser muy limitada. Su efecto sobre el crecimiento tumoral es mínimo y produce graves efectos adversos.¹³²

3) Derivados de la Vinca: Los alcaloides de la Vinca, Vinblastina y Vincristina, aislados de la planta herbácea *Catharanthus roseus* (L.), se unen en la interfase entre los dímeros α - β , cerca de la posición intercambiable de GTP de la subunidad β -tubulina.¹³³ A elevadas concentraciones despolimerizan los microtúbulos y destruyen el huso mitótico, bloqueando la célula en mitosis. Sin embargo, a bajas concentraciones, clínicamente deseables, no despolimeriza el huso microtubular, sino que suprimen la dinámica microtubular al formar el complejo heterodímero-alcaloide que no copolimeriza.¹³⁴ Al igual que los taxanos, los derivados de la Vinca constituyen uno de los tratamientos de primera línea en la terapia antineoplásica.¹³⁵

4) Sitio de unión a la Colchicina. La Colchicina, alcaloide aislado del cólchico (*Colchicum autumnale*) se une de manera irreversible en la interfaz de las dos subunidades de un mismo heterodímero α - β tubulina, en un bolsillo hidrofóbico de la subunidad β . Su unión produce un cambio conformacional que impide el establecimiento de las interacciones laterales con otros heterodímeros para formar el microtúbulo.¹³⁶ Como resultado de esta estabilización, los compuestos que se unen al sitio de unión de la Colchicina, al igual que los derivados de la Vinca, suprimen la polimerización a altas concentraciones y, la dinámica de los microtúbulos a concentraciones más bajas.¹³⁷

A diferencia de los taxanos y los derivados de la Vinca, la Colchicina no está indicada como antineoplásico por su elevada toxicidad. Sin embargo, el diseño de nuevos agentes antimitóticos que interactúan en su motivo de unión es uno de los campos más extendidos en el diseño de nuevos TBAs.

Se ha demostrado que la eficacia de los compuestos de unión al sitio de la Colchicina, a diferencia de los derivados del Taxol o la Vinca, no está supeditada a las resistencias innatas y adquiridas de las neoplasias, como la sobreexpresión de genes MRD1 (*Multidrug Resistance Protein 1*) o la expresión de determinadas isoformas de tubulina. Por lo general, son compuestos

de bajo peso molecular, de fácil farmacomodulación y por tanto, adecuados para obtener análogos estructurales más eficaces o con mejor perfil farmacocinético.¹³⁸

Entre la amplia variedad de compuestos de nueva síntesis que se unen a la tubulina a través de este motivo de unión, como se detallará en los próximos apartados, las sulfonamidas son una de las clases estructurales que mayor relevancia ha adquirido en los últimos años.

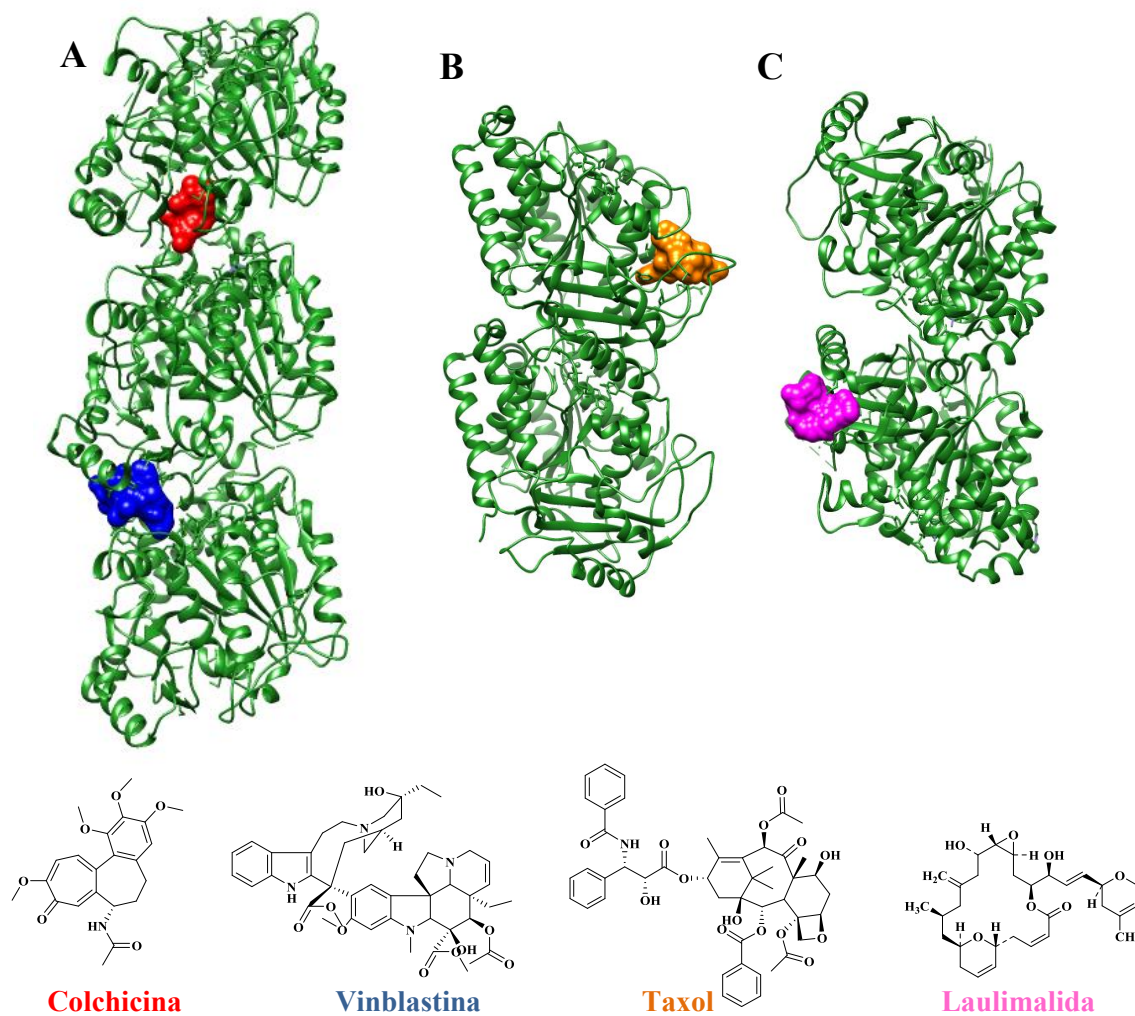


Figura 2.17. Sitios de unión de compuestos antimitóticos en el dímero de tubulina. **A.** Colchicina (rojo), Vinblastina (azul); **B.** Taxol (naranja); **C.** Laulimalida (violeta). PDB1Z2B: Monómero superior (β), monómero inferior (α).

2.2.8. Tratamiento oncológico

Actualmente el arsenal terapéutico de los distintos tipos de cáncer abarca desde los tratamientos convencionales, como la cirugía, radioterapia, y quimioterapia, hasta la terapia dirigida con los llamados fármacos biológicos que incluyen la terapia hormonal o la inmunoterapia. La elección de entre los diferentes tratamientos dependerá de factores del propio tumor, como tipo, localización, estadificación, así como del estado del paciente. El tratamiento más prescrito sigue siendo el tratamiento convencional, cirugía y radioterapia, quimioterapia y radioterapia, sólo quimioterapia (poliquimioterapia combinada o secuencial), o la combinación de los tres como programa de tratamiento multimodal.¹³⁹

La quimioterapia, entendiéndose como “tratamiento sistémico por excelencia” comprende más de 50 fármacos antineoplásicos que pueden clasificarse según su mecanismo de acción en agentes alquilantes, derivados de platino, anti-metabolitos, inhibidores de topoisomerasas, antibióticos o agentes antimetabólicos de interacción con los microtúbulos. Por su propio mecanismo de acción son fármacos de afectación o citotoxicidad generalizada a células de división activa que deriva en los efectos adversos más comunes observados en los pacientes oncológicos.

Ante la falta de especificidad de la quimioterapia convencional surgen los denominados fármacos biológicos o diana-específicos, que como su propio nombre indica actúan directamente sobre las proteínas o los mecanismos implicados en la proliferación y crecimiento de las células tumorales. Entre ellos se distinguen anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasas, inhibidores de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), fármacos antiangiogénicos, agentes inmunomoduladores, y nuevos agentes hormonales.¹⁴⁰

Aunque en los últimos años estas nuevas terapias han demostrado provocar efectos adversos menos graves y prolongar la vida de los pacientes, la calidad de vida en muchos casos es cuestionable. A este agravante se suma la aparición de resistencias tanto en el caso de la quimioterapia como a fármacos biológicos, especialmente en cánceres avanzados donde la adquisición del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos o fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*) imposibilita la curación completa.¹⁴¹ Esta resistencia, intrínseca o adquirida, puede ser atribuida a una multitud de factores, como la heterogeneidad intratumoral, la extrusión de fármacos a partir de MDR-1/P-gp (*Multidrug Resistance Protein/ Permeability glycoprotein*), o a partir de las alteraciones genéticas o epigenéticas inducidas por el estrés metabólico y el microambiente tumoral tras la exposición al fármaco. Es especialmente la capacidad de adaptación de las células cancerosas a este nuevo microambiente tumoral la causa fundamental de resistencia.¹⁴²

La elevada incidencia del cáncer, los graves efectos adversos y la continua aparición de resistencias subrayan claramente la necesidad de identificar, caracterizar y desarrollar nuevos agentes anticancerígenos más eficaces y seguros, que permitan mejorar tanto la esperanza como la calidad de vida de los pacientes.

2.3. SULFONAMIDAS

2.3.1. Estrategias de síntesis

Debido a la amplia variedad de aplicaciones farmacológicas de las sulfonamidas, y a su utilidad como intermediarios de otros productos farmacéuticos, se han desarrollado diferentes procedimientos sintéticos, en función de su estructura y precursores comercialmente disponibles. A continuación se detallan y ejemplifican algunos de los métodos comúnmente utilizados o descritos en los últimos años.¹⁴³

La estrategia sintética más habitual para la obtención de arilsulfonamidas es a partir de los de cloruros de arilsulfonilo correspondientes por reacción con aminas primarias o secundarias en una sola etapa (*esquema 2.1*).



Esquema 2.1. Sulfonación de aminas a partir de cloruros de sulfonilo.

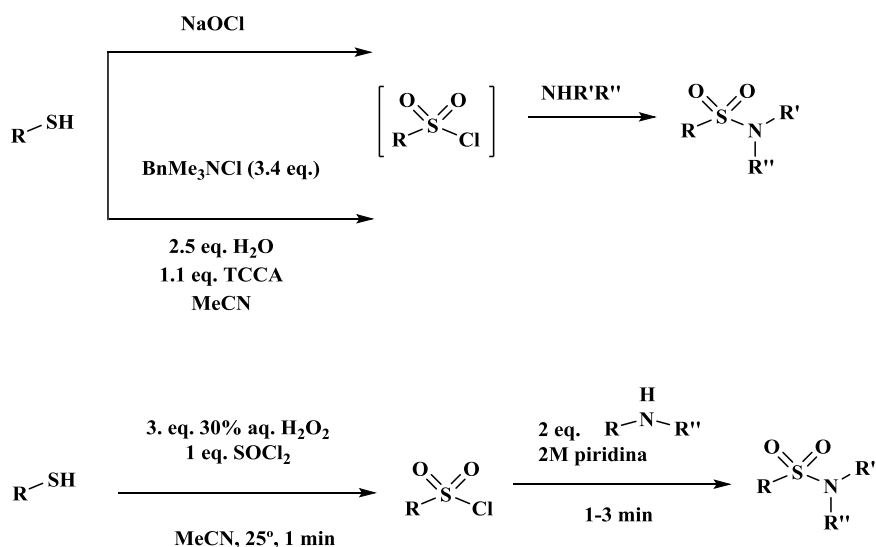
Siguiendo esta procedimiento sintético, se han establecido diferentes condiciones de reacción, en cuanto a sus solventes (tanto próticos como polares apróticos) y/o catalizadores empleados, tiempo de reacción y temperatura. La reacción utilizando etanol como solvente ha sido descrita a 0 °C y 25 °C¹⁴⁴ y con piridina anhidra a 0 °C¹⁴⁵, 25 °C¹⁴⁶ y 60 °C¹⁴⁷. Otros solventes utilizados son el tetrahidrofurano (THF)¹⁴⁸ y la dimetilformamida (DMF) así como trietilamina (Et₃N).¹⁴⁹

En determinadas ocasiones se requiere un proceso intermedio para la obtención del cloruro de sulfonilo, tradicionalmente obtenido por reacción del ácido sulfónico/sulfínico correspondiente, con pentacloruro de fósforo (PCl₅), oxiclорuro de fosforo (POCl₃) o cloruro de tionilo (SOCl₂), con calentamiento de la mezcla. Sin embargo, este procedimiento requiere de un exceso de oxidante y condiciones ácidas, condiciones de reacción no compatibles con determinados sustratos.

Como estrategia alternativa se ha descrito la síntesis del cloruro de sulfonilo *in situ* a partir de tioles mediante cloración alcalina. La oxidación del tiol con hipoclorito sódico (NaClO) o la combinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y cloruro de tionilo (SOCl₂) y posterior reacción con la arilamina correspondiente permite la obtención de derivados de arilsulfonamidas con elevados rendimientos (*esquema 2.2*).¹⁵⁰

Bonk y col. describen la síntesis de sulfonamidas en una reacción *one-pot* del cloruro de sulfonilo a partir de tioles por reacción con ácido triclorocianúrico y cloruro de

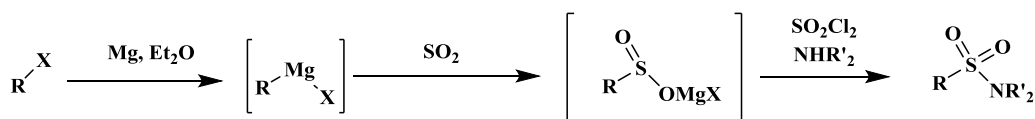
benciltrimetilamonio en agua para generar una cantidad controlada de cloruro en un solvente aprótico como el acetonitrilo (*esquema 2.2*).¹⁵¹



Esquema 2.2. Síntesis de sulfonamidas a partir de tioles. TCCA: Ácido triclorocianúrico; **BnMe₃NCl**: cloruro de benciltrimetilamonio.

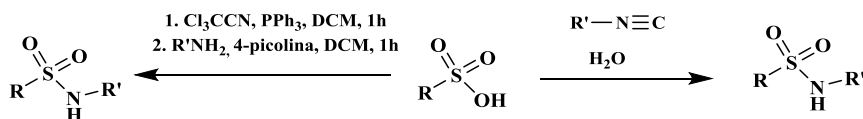
Otra de las estrategias descrita es la síntesis de sulfonamidas con el uso de reactivos de *Grignard* (*esquema 2.3*). Por reacción de un haluro de alquilo y magnesio se obtiene el reactivo organometálico que, posteriormente, reaccionará con dióxido de azufre para formar la correspondiente sal del ácido sulfínico.

Este procedimiento se presenta como una alternativa a las reacciones anteriores para aumentar la diversidad estructural. Sin embargo, uno de los inconvenientes que limita su aplicabilidad es la generación de un exceso de agentes clorinados tóxicos y la incompatibilidad de los reactivos de *Grignard* con determinados grupos funcionales (-OH, -SH, -COOH).¹⁵²



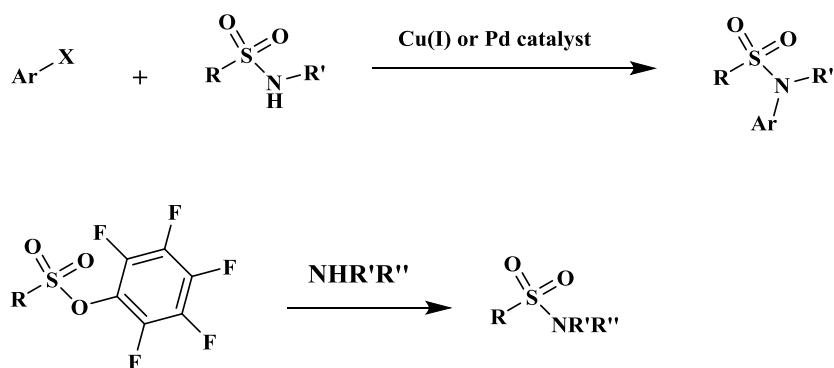
Esquema 2.3. Reacción de aminosulfonación por reactivos de *Grignard*

En la bibliografía también se describe la síntesis de sulfonamidas a partir de ácidos sulfónicos en disolventes orgánicos por reacción con tricloroacetonitrilo y trifenilfosfina, o en agua por reacción con nitrilos (*esquema 2.4*).¹⁵³



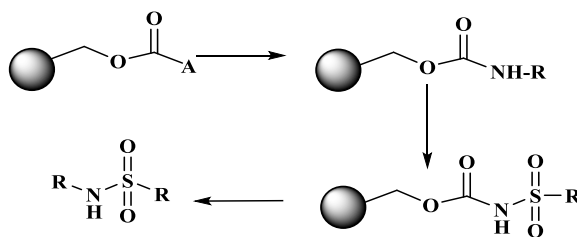
Esquema 2.4. Síntesis de sulfonamidas a partir de ácidos sulfónicos. **Cl₃CCN**: tricloroacetnitrilo; **PPh₃**: trifenilfosfina; **DCM**: Diclorometano.

Con el objetivo de aumentar la diversidad estructural, se han optimizado reacciones de *N*-arilación, mediante el uso de cobre o paladio como catalizadores,¹⁵⁴ así como el uso de ésteres sulfonato de pentafluorofenilo, estrategia caracterizada por su reducida toxicidad, estabilidad de los reactivos y altos rendimientos (*esquema 2.5*).¹⁵⁵



Esquema 2.5. Síntesis de sulfonamidas por reacciones de *N*-arilación catalizadas por metales y a partir de sulfonatos de pentafluorofenilo.

Por otro lado, se ha optimizado la síntesis de nuevos derivados en fase sólida con la utilización de distintos polímeros. El uso de florisil y montmorillonita KSF (mineral del grupo de los silicatos) ha permitido obtener diferentes sulfonamidas con elevados rendimientos (80-95%). El mismo proceso de reacción, acelerado por irradiación de microondas, permitió obtener similares rendimientos en un tiempo de reacción mucho más corto.¹⁵⁶ También se ha descrito la utilización de carbamato como soporte sólido, en el cual se inmoviliza la amina a través del átomo de nitrógeno (*esquema 2.6*).¹⁵⁷



Esquema 2.6. Síntesis de sulfonamidas en fase sólida

2.3.2. Reseña histórica

Las sulfonamidas, también conocidas como fármacos sulfa o sulfamidas, fueron los primeros compuestos eficaces que se emplearon en el tratamiento de las infecciones bacterianas en el hombre. Se caracterizan por presentar una base estructural en la que reside su efecto bacteriostático, la sulfanilamida (**18**), análogo estructural del ácido *para*-aminobenzoico (**19**, PABA). Actúan por tanto, como antagonistas competitivos del PABA, inhibiendo la síntesis del ácido dihidropterico (**20**) en la ruta biosintética de *nov*o del ácido fólico (**21**), necesario para la síntesis de purinas y piridinas (figura 2.18). Además, esta diana es muy específica ya que las células de mamíferos no pueden sintetizar ácido fólico, sino que es aportado a través de la dieta.¹⁵⁸

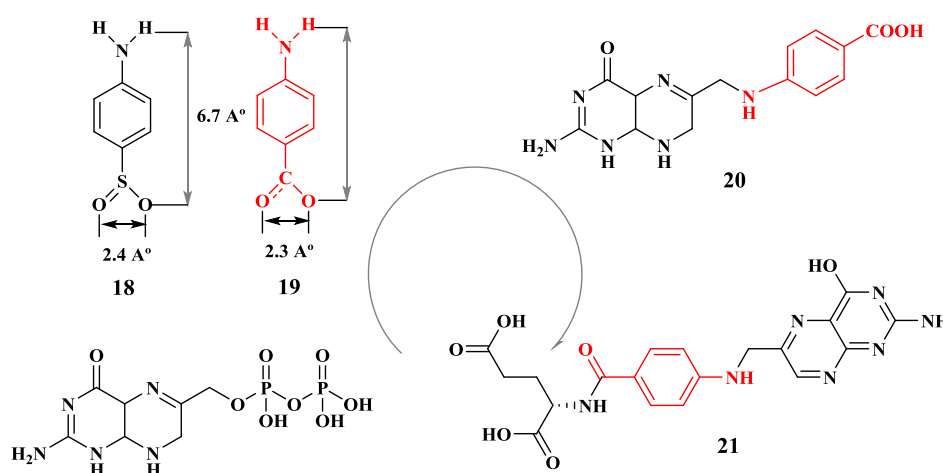
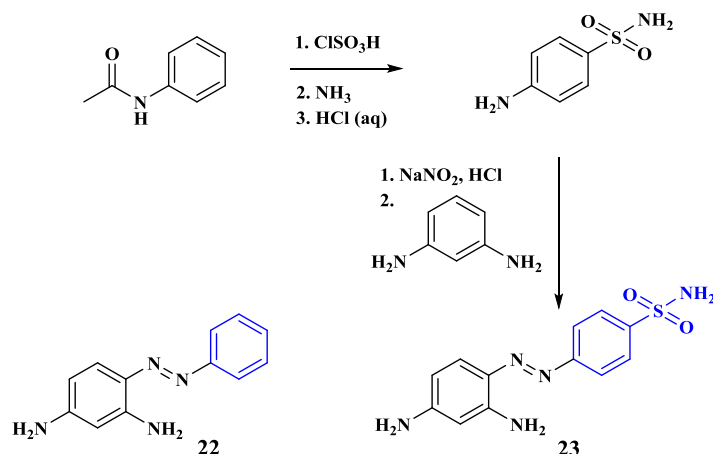


Figura 2.18. Analogía estructural de la sulfanilamida con el PABA

El origen de estos compuestos antimicrobianos se sitúa en los estudios que se hicieron con colorantes sobre células, tanto de mamíferos como de microorganismos, hace más de un siglo. La primera sulfonamida, la sulfanilamida, fue sintetizada en 1908 por Gelmo como parte de un programa de investigación de colorantes azoicos. Sin embargo, no fue hasta 1932 cuando se descubrió su potencialidad como antimicrobiano.¹⁵⁸

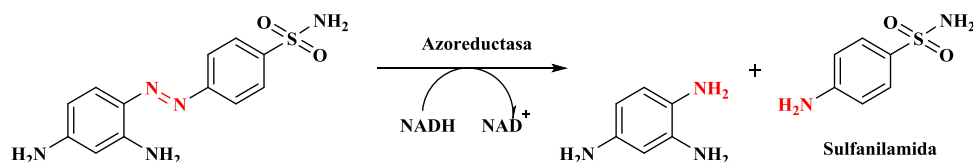
A principios del siglo XX la *IG Farben Industrie de Wupperthal-Elberfeld* realizó una serie de estudios con diversos colorantes, siendo uno de ellos la *crisoidina* (**22**). El director del instituto, G. Dogmak, modificó este colorante con diferentes sustituyentes, entre ellos la *para*-aminobencenesulfonamida. Posteriormente se confirmó su efectividad en ratas infectadas con estreptococos hemolíticos y se patentó con el nombre de *Prontosil Rubrum* (**23**) (esquema 2.7).



Esquema 2.7. Síntesis del *Prontosil Rubrum*

El propio Dogmak utilizó el Prontosil cuando su hija enfermó gravemente por una infección estreptocócica, ante la inutilidad de otros tratamientos, consiguiendo sorprendentemente su rápida recuperación. El Prontosil se convertía en la primera sulfonamida antibacteriana y Dogmak fue galardonado con el Premio Nobel en 1939.

Cuatro años antes de la obtención del nobel, un grupo de investigadores del Instituto *Pasteur* de París, descubrió que la agrupación azo del Prontosil se reducía *in vivo* dando lugar a la sulfanilamida, producto responsable de la acción antibacteriana (esquema 2.8).



Esquema 2.8. Metabolización *in vivo* del Prontosil

Rápidamente se sintetizaron una gran cantidad de derivados. Desde 1938 hasta 1942 surgieron nuevos fármacos como la Sulfapiridina (**24**), Sulfatiazol (**25**), Sulfacetamida (**26**), Sulfaguanidina (**27**) y la Sulfadiazina (**28**) o Sulfametazina (**29**) (figura 2.19), las cuales aparecieron ante la necesidad de salvar vidas durante la Segunda Guerra Mundial.

Se convirtieron en agentes fundamentales de la quimioterapia antibacteriana, evitando millones de muertes y, aunque con la generalización del uso de la penicilina se redujo considerablemente su campo de aplicación, las sulfonamidas han seguido ocupando un lugar destacado en el arsenal terapéutico para algunas infecciones específicas.¹⁵⁹

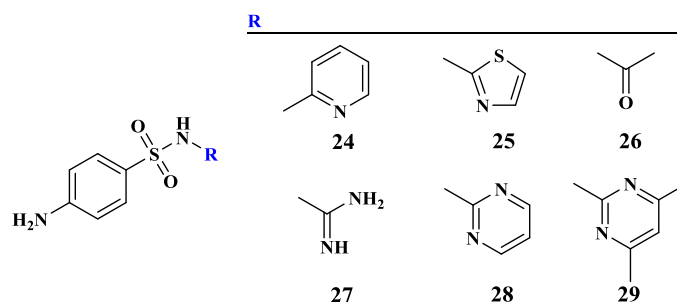


Figura 2.19. Sulfonamidas antibacterianas

2.3.3. Diversidad de actividades farmacológicas

El descubrimiento de las sulfonamidas como antibacterianos provocó una revolución en la quimioterapia al introducir el concepto de antagonismo metabólico. Pronto se convirtieron en cabezas de serie de nuevos fármacos al potenciar los efectos secundarios que presentaban en su uso como antibacterianos, mediante diferentes estrategias de farmacomodulación (figura 2.20).

Se observó que las sulfonamidas producían hipoglucemia como consecuencia del aumento de la liberación de insulina y reducían la eliminación renal de la penicilina G en su coadministración. A partir de estos hallazgos se desarrollaron los antidiabéticos orales como la Glibencamida (**30**),¹⁶⁰ y el diseño de la Probenecida (**31**) como fármaco uricosúrico, útil en el tratamiento de la gota.¹⁶¹

También se observó que las sulfonamidas producían acidosis metabólica y alcalinización de la orina, lo que dio lugar a la primera sulfonamida diurética, la Acetazolamida (**32**). Se determinó que el efecto se debía a la inhibición de la anhidrasa carbónica, una isoenzima que cataliza la formación de ácido carbónico a partir de anhídrido carbónico y agua¹⁶². A partir de la Acetazolamida, se desarrollaron otros diuréticos, aunque con un modo de acción diferente, denominadas tiazidas como la Hidroclorotiazida (**33**). A su vez, se desarrollaron nuevos derivados, como la Metazolamina (**34**) para el tratamiento del glaucoma, tras observarse que la Acetazolamida disminuía la presión intraocular por inhibición no selectiva de la anhidrasa carbónica.¹⁶³

La capacidad de inhibición enzimática de las sulfonamidas extendió su uso como antiinflamatorios, actuando como inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), como los oxicams, Celecoxib (**35**) y Valdecoxib (**36**).¹⁶⁴ También forman parte del tratamiento combinado antirretroviral, como inhibidores de la proteasa del VIH como el Amprenavir (**37**), o Tipranavir (**38**).¹⁶⁵

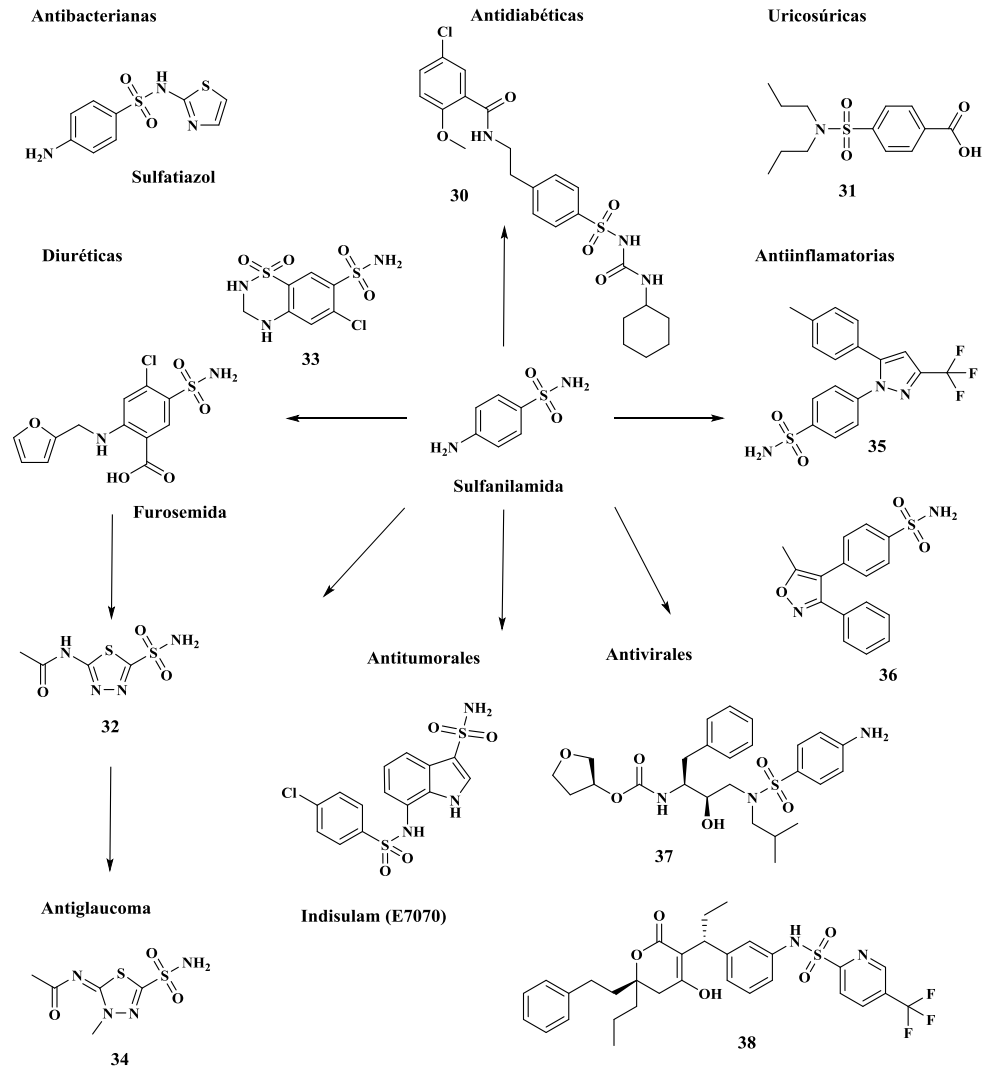


Figura 2.20. Farmacomodulación de la sulfanilamida.

Se han descrito derivados de sulfonamidas que abarcan una gran diversidad de mecanismos antitumorales, como inhibidores de la polimerización de la tubulina, inhibidores de la anhidrasa carbónica (también implicada en el proceso de tumorigénesis), o como inhibidores de la angiogénesis por su interacción con metaloproteinasas.¹⁶⁶

En la actualidad, el grupo sulfonamido sigue siendo objeto de investigación, ampliando las potencialidades de algunas de las aplicaciones ya descritas, con la síntesis de nuevos derivados, así como con el descubrimiento de nuevas, concretamente, como fármacos anticancerígenos e inhibidores de una amplia variedad de serin-proteasas, cisteín-proteasas y tirosín-fosfatasa, con diferentes aplicaciones prometedoras.¹⁶⁷

2.3.4. Sulfonamidas en el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas

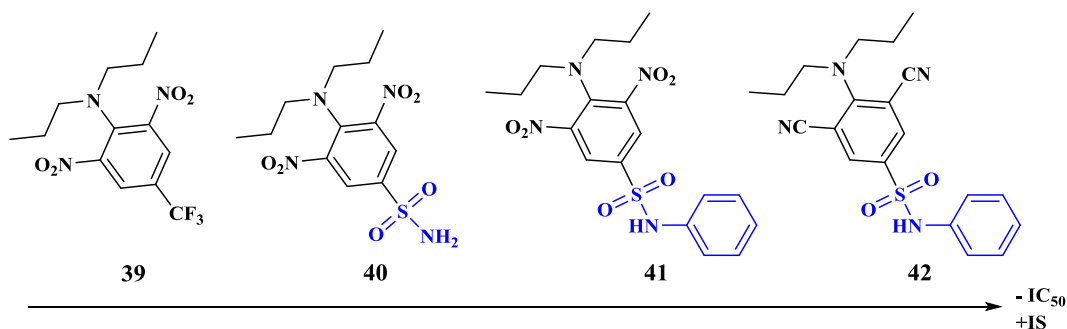
Diversas sulfonamidas se han empleado en el tratamiento y quimioprofilaxis frente a parasitosis producidas por protozoos, fundamentalmente en especies pertenecientes al filo Sporozoa o Apicomplexa, como las coccidiosis intestinales producidas por *Isospora belli* y *Cyclospora cayetanensis*¹⁶⁸, toxoplasmosis¹⁶⁹ y también en malaria.¹⁷⁰

Debido a su amplio espectro de acción y su uso como agentes antiparasitarios, el estudio de sulfonamidas se ha extendido con la síntesis de nuevos derivados frente a parásitos del orden Kinetoplastida. En los últimos años, varias bencenosulfonamidas han demostrado ser activas frente a diferentes especies de *Leishmania* y *Trypanosma cruzi*.

En la bibliografía se encuentran descritas **sulfonamidoanilinas** con un mecanismo de acción definido por su interacción selectiva con la tubulina de estos tripanosomátidos. Los derivados están relacionadas con la trifluralina **39**, un herbicida de acción antimitótica selectivo en plantas, con una eficacia *in vitro* demostrada frente a *Leishmania*, pero de elevada toxicidad. La sustitución en su estructura del grupo trifluorometilo por un grupo sulfonamido, permitió la obtención de un compuesto más soluble en agua y de toxicidad moderada, denominado Oryzalina **40**, convirtiéndose en un nuevo cabeza de serie a partir del cual llevar a cabo variaciones moleculares con la síntesis de nuevos análogos.¹⁷¹

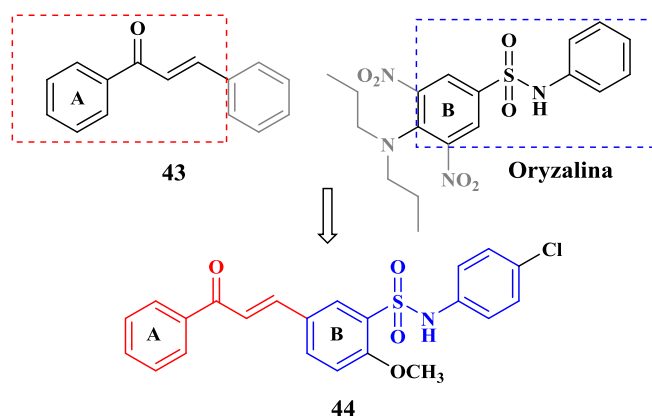
Los derivados N^1 -arilo- N^4 -dialquil-3,5-dinitrosulfonamidas obtenidos, mostraron ser activos en *Leishmania*, *T. cruzi* y de manera más significativa en *T. brucei*, con índices de selectividad (IS) mayores a 100, tanto respecto a macrófagos J774 como células de cáncer prostático. Los IS se correlacionaron con su mecanismo de acción, que al igual que sus precursores, consistía en la inhibición de la polimerización de la tubulina por su unión a la subunidad α -tubulina, y por tanto, la formación del huso mitótico.

El desarrollo de análogos que componen esta serie de compuestos permitió establecer los requisitos estructurales que determinaban su potencia y selectividad, dando un nuevo cabeza de serie **41**, limitándose al sustituyente dipropilamino en N^4 y la introducción de un grupo arilo en N^1 . Estudios computacionales posteriores realizados por Mitra y Sept determinaron la relevancia del grupo NO₂ como aceptor de puentes de hidrógeno y, su sustitución por otros grupos, como CN, lo que permitió obtener el derivado **42** con las mismas propiedades tripanocidas.¹⁷²

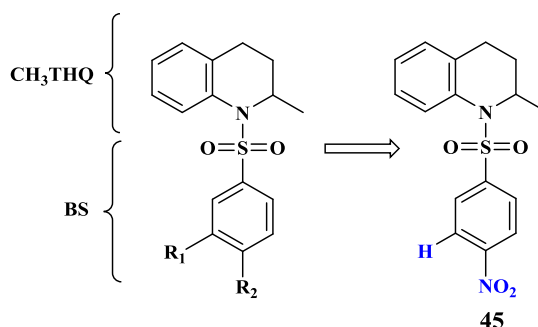


Por otro lado, la consideración de la amplia variedad de actividades farmacológicas de las sulfonamidas, ha conducido al diseño de nuevos derivados con distintas dianas terapéuticas o mecanismos de acción. Una de las técnicas de farmacomodulación comúnmente utilizada ha sido la *hibridación molecular*. Ésta constituye una estrategia clásica en el diseño racional de fármacos, basada en la asociación o conjugación molecular de dos entidades o unidades farmacofóricas, a través de enlaces covalentes, en una misma entidad química común, con una afinidad y selectividad mejoradas respecto a sus precursores o, adicionalmente, con un mecanismo de acción dual.¹⁷³

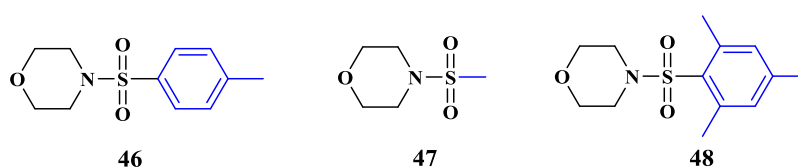
Siguiendo esta estrategia, derivados de **chalconas (43)** funcionalizadas con sulfonamidas relacionadas con el herbicida Oryzalina, han mostrado ser activas frente a diferentes especies de *Leishmania*. De entre los diferentes derivados, el compuesto **44** se identificó como el más activo *in vitro*, frente a promastigotes de *L. braziliensis* ($IC_{50} = 4.6 \mu M$) y formas promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis* (IC_{50} de $4.3 \mu M$ y $2.0 \mu M$ respectivamente) con el mayor IS. Sin embargo, ninguno de los derivados obtenidos mostró actividad frente a *Trypanosoma*, indicando especificidad en la actividad leishmanicida.¹⁴⁴ Estudios teóricos posteriores y de Relación Estructura-Actividad (REA) demostraron que el grupo sulfonamido constituía un elemento farmacofórico esencial para la actividad.¹⁷⁴



También se ha descrito la funcionalización del anillo 2-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina (CH₃THQ), de diversas aplicaciones farmacológicas, con el grupo sulfonamida. Los nuevos derivados de **1,2,3,4-tetrahidrobencenosulfonamidas** presentaron un perfil tripanocida significativo *in vitro* frente a *Trypanosoma cruzi*. El compuesto más activo resultó ser un *para*-nitroderivado (**45**) con una IC_{50} de $11.44 \mu M$ y toxicidad moderada ($IC_{50} = 248 \mu M$). La adición del anillo de bencenosulfonilo (BS) resultó en un aumento considerable de la actividad con respecto a su precursor, así como la sustitución en posición *para* por un grupo electrón-atrayente como el NO₂ en comparación al *meta*-sustituido. Sin embargo, la actividad de esta serie de compuestos frente a *Leishmania* fue relativamente moderada.

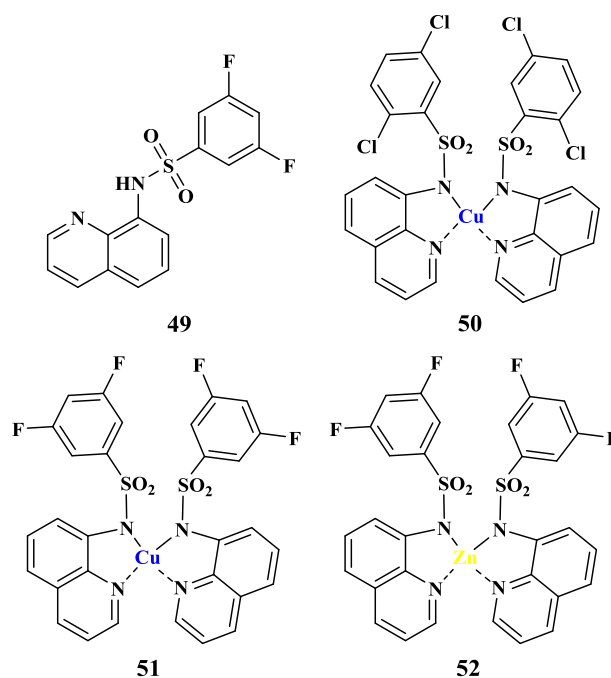


La relevancia de las arilbencenosulfonamidas *para*-sustituidas en el desarrollo de fármacos frente a *Leishmania* también ha sido descrita con la evaluación de **derivados de morfolina** funcionalizados con el grupo sulfonamido frente a formas promastigotes de *L. major*. La 4-metilbencenosulfonamida **46** (48 μM), aunque con una mínima diferencia respecto a la 4-metilsulfonamida **47** (51 μM), resultó ser mucho más activa que su análogo estructural 2,4,6-trimetilbencenosulfonamida **48**.¹⁴⁸

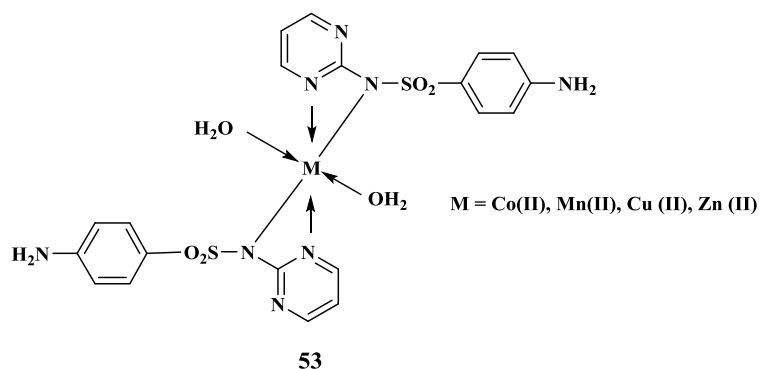


Otra de las estrategias descritas es la evaluación de diferentes complejos metálicos de bencenosulfonamidas heterocíclicas de actividad leishmanicida y tripanocida *in vitro* demostrada. El interés en su evaluación reside en la efectividad de determinados metalofármacos antitumorales en enfermedades producidas por parásitos kinetoplástidos. Inicialmente estudiados en malaria se han extendido a *Leishmania* y *Trypanosoma*.¹⁷⁵

Da Silva *y col* han demostrado la actividad antiparasitaria *in vitro* de derivados de **quinolinarilsulfonamidas** frente a formas promastigotes de *L. amazonensis* y *L. chagasi* con un IC_{50} de 2.12 y 0.49 μM , e IS de 31.28 y 135 respectivamente, para el compuesto más activo **49**.¹⁷⁶ Los mismos autores describen una mayor actividad *in vitro* de los complejos de esta serie de compuestos con metales de transición (Cu(II) y Zn(II)), frente a las mismas especies de *Leishmania* y *T. cruzi*. La mayor actividad de los complejos, en concordancia con la actividad descrita para determinados agentes antiprotozoarios,¹⁷⁷ se correlaciona con la citotoxicidad, a excepción del complejo de cobre de la bencenosulfonamida **50**, y los complejos de cobre y zinc de las bencenosulfonamidas **51** y **52**, respectivamente, activos frente a *L. amazonensis* y *T. cruzi* con IS superiores a 10.¹⁷⁸



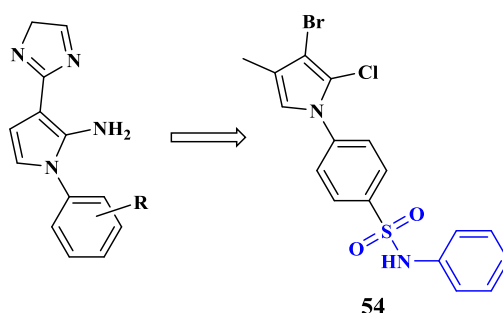
En este sentido, también se han descrito el efecto leishmanicida y tripanocida de complejos de **Sulfadiazina (53)** con los metales Cu(II), Zn(II), Mn(II), Ni(II), Pd(II), Pt(II) y VO(II), frente a amastigotes de *L. donovani* y tripomastigotes de *T. b. rhodosiense*. En el caso de *L. donovani*, el complejo de Mn(II) resultó el más activo, mientras que el complejo de Cu(II) resultó como el más activo y menos tóxico frente a *T. b. rhodosiense*.¹⁷⁹



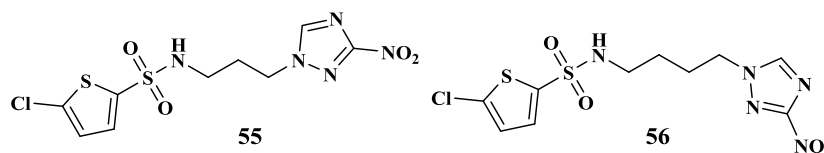
En los últimos años, el aumento del conocimiento de la biología de estos parásitos y la caracterización de diversas isoenzimas específicas, ha permitido el diseño de inhibidores enzimáticos selectivos frente a dianas clave en estos parásitos. En su desarrollo, se hace necesaria la obtención de análogos que permitan establecer los elementos estructurales para una mayor selectividad, afinidad y actividad *in vitro*. Siguiendo esta estrategia, se han obtenido

resultados prometedores de compuestos funcionalizados con el grupo sulfonamido, inhibidores de la esteroil 14-demetilasa CYP51 y anhidrasa carbónica α de *T. cruzi*.¹⁸⁰

Otro tipo de compuestos, que han adquirido especial relevancia para su funcionalización con el grupo sulfonamido por su actividad leishmanicida y/o tripanocida *in vitro*, son los derivados azólicos. Como en estudios anteriores, la incorporación del grupo sulfonamido con un sustituyente aromático mejora considerablemente la actividad leishmanicida. Así, se han descrito derivados de **4-(1H-pirazol-1-il)benzenosulfonamidas** frente a formas promastigotes de *L. infantum* (syn *L. chagasi*) y *L. amazonensis*. El compuesto más activo **54** ($IC_{50} = 0.059$ y 0.070 mM) presentó una actividad *in vitro* comparable a la Pentamidina en *L. infantum* ($IC_{50} = 0.062$), pero con un mayor índice de selectividad ($IS_{54} = 2.44$, $IS_{Pentamidina} = 0.87$).¹⁸¹

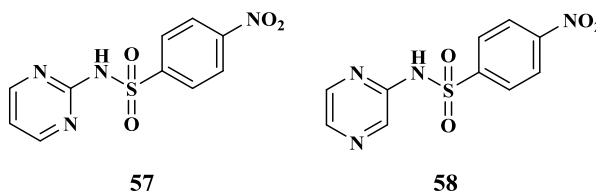


Por otro lado, Papadopoulou *y col.* describen la actividad de una serie de **3-nitro-1H-1,2,4-triazoles** como agentes tripanocidas, identificándose a las sulfonamidas **55** y **56**, más activas que sus respectivas amidas, como potenciales tripanocidas frente a *T. cruzi*.¹⁸² El interés en este tipo de compuestos no solo reside en sus grupos bioactivos funcionales, sino en sus grupos nitro (NO_2). Los autores proponen que éstos deben reducirse por la nitroreductasa tipo I (NTR1) ausente en la mayoría de eucariotas a excepción de parásitos tripanosomátidos, demostrando la viabilidad terapéutica de los compuestos nitroheterocíclicos como profármacos específicos para estas parasitosis.¹⁸³



Ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio han mostrado que la 4-nitro-*N*-[(2)-pirimidin-2(1H)-iliden]benzenosulfonamida **57** y la 4-nitro-*N*-[(2)-pirazin-2(1H)-iliden]benzenosulfonamida **58** poseen actividad *in vitro* frente a promastigotes de *L. infantum*, sin mostrar citotoxicidad frente a macrófagos. Estudios *in vivo* frente a *L. infantum* han puesto

de manifiesto la actividad de ambas sulfonamidas con una clara reducción de la carga parasitaria (ca 99%). También se propuso un posible mecanismo de acción, observándose que presentan actividad nucleasa en presencia de Cu (II).¹⁴⁵



2.3.5. Sulfonamidas como agentes antitumorales

Las sulfonamidas en su acción antitumoral presentan diferentes mecanismos de acción. Entre los más conocidos o estudiados, por el número de derivados identificados que interaccionan con una misma diana terapéutica, adquieren especial relevancia los derivados de sulfonamidas inhibidores de la anhidrasa carbónica,¹⁸⁴ de histonas deacetilasas,¹⁸⁵ de metaloproteinasas¹⁸⁶ e inhibidores de la polimerización de la tubulina, denominadas sulfonamidas antimitóticas por su interferencia en la formación del huso mitótico durante la mitosis.¹⁸⁷

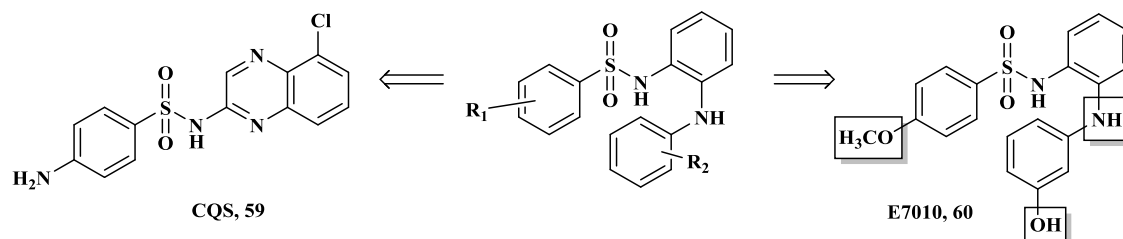
En el desarrollo secuencial de la terapéutica de las sulfonamidas como agentes antitumorales, las sulfonamidas antimitóticas han dado lugar a los resultados más prometedores, como así lo demuestra el número de derivados en ensayos clínicos. A continuación, se describe brevemente la estrategia de diseño, la REA y el efecto biológico de esta clase de sulfonamidas, desde la identificación del primer derivado, la sulfonamida ABT-751, hasta los desarrollados recientemente.

El interés en el desarrollo de sulfonamidas como agentes antitumorales surgió tras observar la acumulación preferencial de la sulfadiazina, sulfonamida de acción antibacteriana, en tumores murinos de localización subcutánea.¹⁸⁸ Considerando la amplia variedad de actividades farmacológicas de las sulfonamidas, Yoshino *y col.* plantearon en trabajos posteriores el diseño y la síntesis de nuevos derivados con la finalidad de obtener agentes antitumorales con un mecanismo de acción diferente a compuestos con actividad antitumoral conocidos.¹⁸⁹ El *template* de optimización, a partir del cual diseñar estos análogos, fue la sulfonamida CQS **59**, una de las pocas sulfonamidas de acción antitumoral descrita hasta el momento, excluida en ensayos clínicos en fase II por su elevada toxicidad.¹⁹⁰

Mediante el *screening* de un elevado número de nuevos derivados de sulfonamidas, que diferían ampliamente en sus estructuras, se identificó la sulfonamida E7010 (**60**), con un mecanismo de acción único, no descrito anteriormente. E7010 presentaba actividad antiproliferativa dosis-dependiente en correlación con su capacidad de inhibir la polimerización de la tubulina y el aumento de la población celular en la fase G2/M del ciclo celular.^{189, 191}

La elevada cantidad de análogos estructurales analizados permitió discernir fácilmente la REA, concluyéndose como elementos farmacofóricos esenciales para la actividad

antitumoral: el grupo sulfonamido, como motivo estructural básico, el grupo amino en posición *orto* respecto al grupo sulfonamido y los grupos metoxi e hidroxilo en posición *para*.¹⁹²



Actualmente, la sulfonamida E7010, conocida como ABT-751, se encuentra en ensayos clínicos en fase II para el tratamiento del neuroblastoma recidivante y resistente a otros tratamientos (NTC00436852), con un mecanismo de acción y propiedades farmacocinéticas totalmente definidas.¹⁹³ Es la primera sulfonamida de administración oral, de acción antimitótica por su unión a la subunidad β -tubulina en el sitio de unión a la Colchicina. Además, diferentes estudios demuestran que la sulfonamida ABT-751 puede actuar adicionalmente como un fármaco disruptor de la vascularización tumoral, actuando de manera sinérgica en terapias dirigidas con agentes inhibidores del factor de crecimiento epidérmico VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), como el bevacizumab.¹⁹⁴

En los ensayos clínicos llevados a cabo con ABT-751, dirigidos principalmente a pacientes pediátricos con neoplasias recidivantes en tratamientos prologandos, se han observado signos de neuropatía periférica, íleo y fatiga. Sin embargo, una de las ventajas frente a otros agentes disruptores de la polimerización de la tubulina es la ausencia de una mielosupresión significativa.¹⁹⁵

A partir de la sulfonamida ABT-751 se sintetizaron nuevos derivados, bien manteniendo las propiedades antimitóticas o, con un mecanismo de acción diferente.

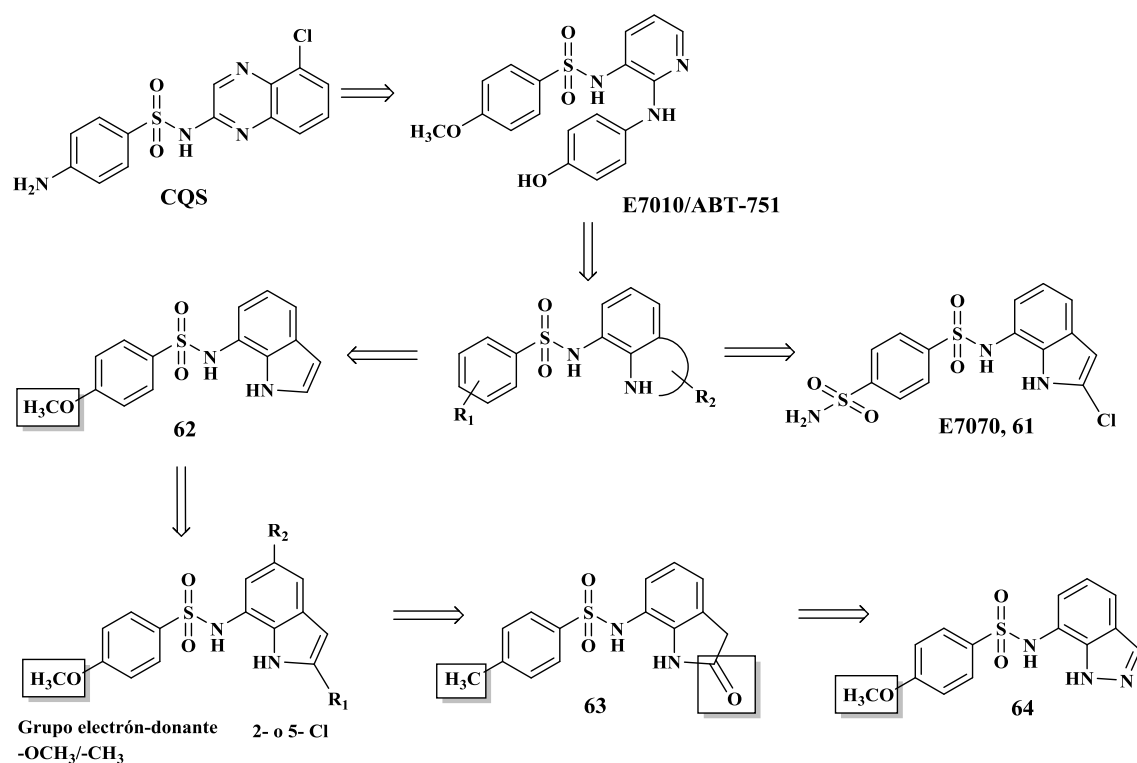
La síntesis de análogos estructurales heterobíclicos de la sulfonamida E7010 llevó a la identificación de un nuevo derivado de acción antitumoral, el *N*-(3-cloro-7-indolil)-1,4-bencenosulfonamida, E7070, **61**).¹⁹⁶ A diferencia de la sulfonamida ABT-751, E7070 presentó un mecanismo de acción multifactorial, atribuyéndose su capacidad antiproliferativa principalmente a la inhibición de la actividad quinasa de las CDKs, resultando en una parada del ciclo celular en G1/S seguida de muerte celular por apoptosis y, a la inhibición de la anhidrasa carbónica, especialmente las isoformas IX y XII, sobreexpresadas en muchos tipos de cáncer.¹⁹⁷ Actualmente, se encuentra en desarrollo en diferentes ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos bajo la denominación de Indisulam.¹⁹⁸

Paralelamente a la sulfonamida E7070, se desarrollaron los derivados de la serie *N*-(7-indolil)bencenosulfonamidas (**62**), diferenciándose en la posición de un átomo de cloro en el anillo indólico. Éstos presentaron las mismas propiedades antimitóticas que la sulfonamida ABT-751, mediante la supresión de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos por su unión a la subunidad β -tubulina, de manera reversible, en el sitio de unión de la Colchicina.

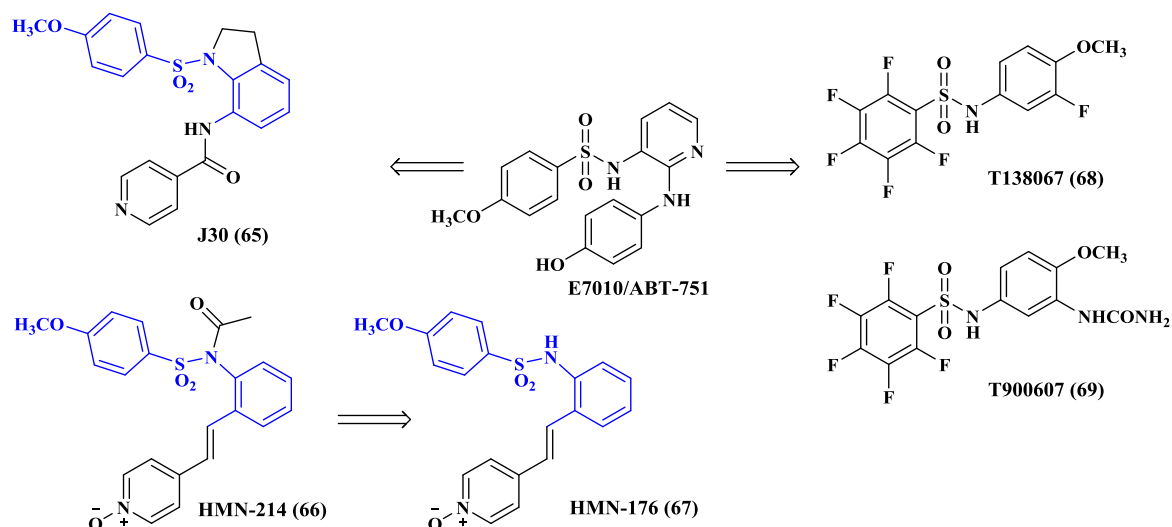
Los estudios de REA de la sulfonamida **62** se centraron en el patrón de sustitución de los anillos aromáticos, identificándose como requisitos estructurales para la actividad antitumoral la sustitución en las posiciones -2 o -5 del anillo indólico por un átomo de cloro y un grupo electrón-donante, metilo o metoxilo, de manera análoga a la sulfonamida ABT-751, en la posición *para* del anillo bencénico. La presencia de estos sustituyentes resultó esencial para mantener la actividad antiproliferativa y el fenotipo de parada en mitosis.¹⁹⁹

Posteriormente, siguiendo con la optimización de los derivados indólicos, la sustitución del anillo 2-Cl-5-indolilo por un anillo 2-oxindol (**63**) permitió aumentar la capacidad antiproliferativa.²⁰⁰

Por otro lado, a partir del mismo *template* de optimización, se desarrollaron los derivados *N*-(7-indazolil)bencenosulfonamidas, identificándose la 4-metoxi-*N*-(3-cloro-7-indazolil)bencenosulfonamida (**64**) como uno de los derivados más activo frente a un amplio panel de líneas tumorales por su interacción con la tubulina.²⁰¹



A partir de la sulfonamida ABT-751 también se desarrollaron otros derivados, como el derivado aroilaminoindolina J30 (**65**), la sulfonamida HMN-214 (**66**), profármaco de HMN-176 (**67**) y, las sulfonamidas pentafluoradas T138067 (**68**) y T900607 (**69**).



A partir de una serie de 7-aroil-aminoindolina-1-bencenosulfonamidas, Chang *y col.* identificaron el derivado J30 (**65**), con capacidad antiproliferativa ($IC_{50} = 8.6-11.1$ nM) en una variedad de líneas tumorales, incluyéndose líneas resistentes-MDR.²⁰² Los mismos autores demostraron que J30 provocaba una parada del ciclo celular en G2/M por inducción de la fosforilación de Bcl-2 y activación de la vía intrínseca de la apoptosis al inhibir la polimerización de la tubulina. Estudios posteriores demostraron su eficacia en tumores xenógrafos-MDR tras su administración oral.²⁰³

HMN-214 (**66**) es el profármaco de HMN-176 (**67**), de administración oral. Este derivado, a pesar de la similitud estructural con la sulfonamida ABT-751 y J30, inhibe la mitosis sin ningún efecto sobre la polimerización de la tubulina. Su capacidad antimitótica se debe a su interferencia en la localización subcelular de la quinasa PLK-1 (*Polo-Like Kinase-1*), una serina/treonina quinasa que regula diversos eventos críticos durante la mitosis: entrada en mitosis, formación del huso mitótico, promoción de la anafase y citocinesis.

HMN-176 presenta una potente actividad citotóxica en una variedad de líneas tumorales y diferentes tumores xenógrafos. Actualmente, se encuentra en evaluación en ensayos clínicos de fase II.²⁰⁴

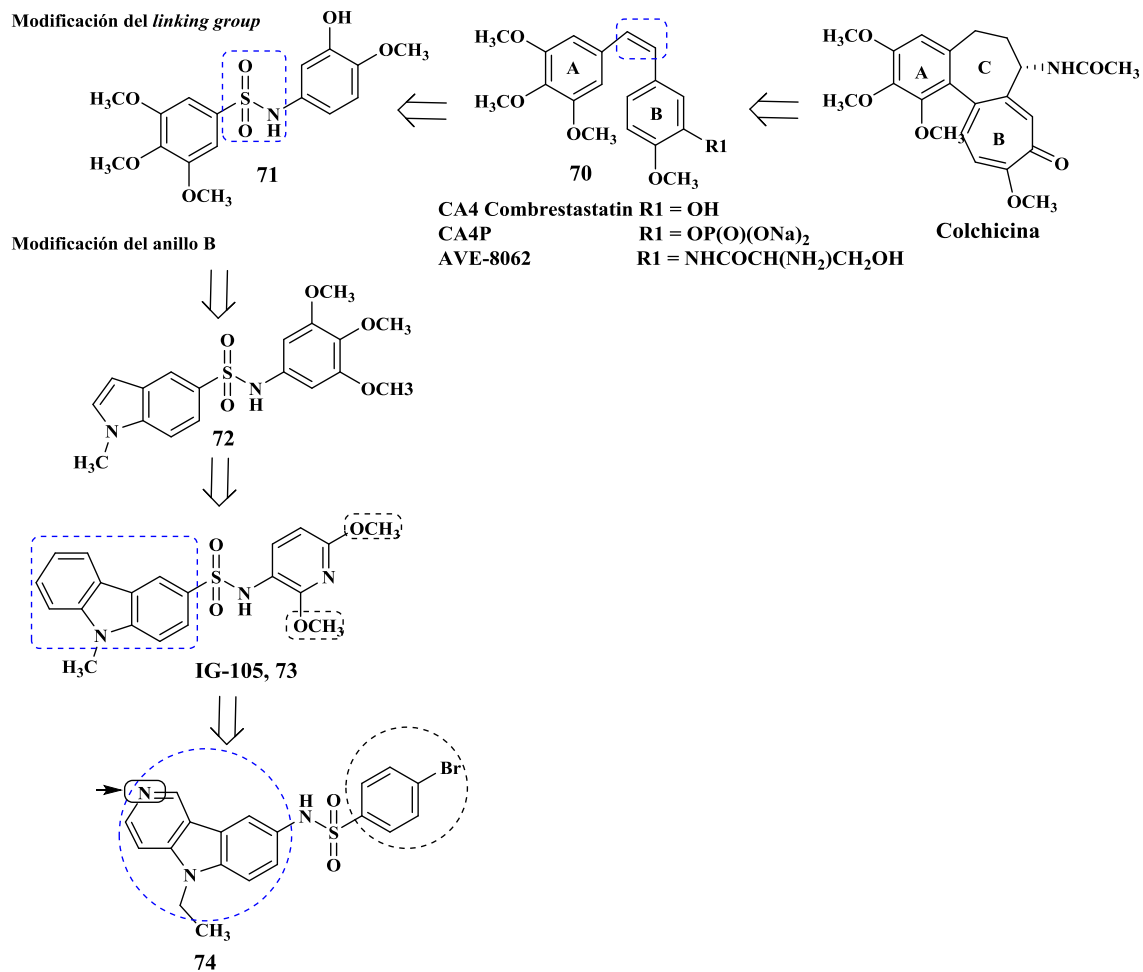
Las pentafluorobencenosulfonamidas (**68**, **69**) inhiben la polimerización de la tubulina por la modificación covalente de las isoformas α -tubulina 1,2 y 4, en el residuo de cisteína Cys-239, como resultado de una sustitución nucleofílica aromática.

Estudios iniciales con la sulfonamida T138067 (**68**) demostraron su capacidad antiproliferativa *in vitro* frente a un amplio panel de líneas celulares resistentes a Vinblastina, Paclitaxel, Doxorubicina y Actinomicina D; e igualmente eficaz en modelos xenógrafos-MDR. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos en fase III para el tratamiento de este tipo de tumores. No obstante, uno de los inconvenientes de esta sulfonamida es su neurocitotoxicidad, asociada a su elevada lipofilia y el paso de la barrera hematoencefálica.²⁰⁵ Con objeto de obtener análogos más hidrofílicos se sintetizó la sulfonamida T900607 (**69**), un derivado de urea con un mismo mecanismo de acción a su precursor, pero sin embargo, una menor neurocitotoxicidad. Actualmente, la sulfonamida **69** se encuentra en ensayos clínicos en fase II.²⁰⁶

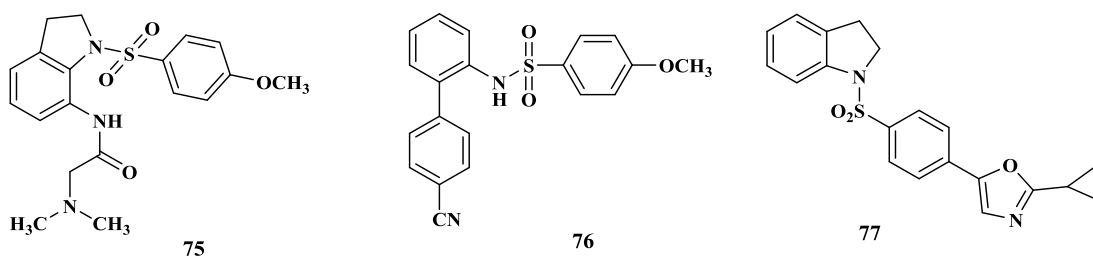
La búsqueda de nuevas sulfonamidas antitumorales también se ha llevado a cabo a partir de las combretastatinas, compuestos naturales aislados de la corteza de *Combretum caffrum*, que se caracterizan por su unión a la tubulina en el sitio de unión a la Colchicina. La combretastatina A4 (**70**) y sus derivados CA4P (R1=fosfato) y AVE-8062 (R1=NHCOCH(NH₂)CH₂OH) resultaron ser los compuestos más activos, convirtiéndolos en cabezas de serie.²⁰⁷

Los estudios de REA entre las diferentes combretastatinas permitieron determinar los requisitos estructurales para su actividad, definiéndose por dos anillos no coplanares, el anillo 3,4,5-trimetoxifenilo (anillo A) y el anillo 4-metoxi-3-R1-fenilo sustituido (anillo B), separados por un grupo de dos átomos, preferentemente en disposición *cisoides*. Esta estructura base se utilizó como *template* para el desarrollo de análogos, estableciéndose como dominios de diversidad estructural, el anillo B y el enlace olefínico.

Con la sustitución del enlace olefínico por un grupo sulfonamida se obtuvieron derivados con mayor actividad en la inhibición de la polimerización de la tubulina (**71**),²⁰⁸ la cual se potenció con la sustitución del anillo B por un núcleo indólico (**72**).²⁰⁹ A partir de éste, con la formación de un anillo de carbazol se obtuvo el compuesto IG-105 (**73**), una *N*-(2,6-dimetoxipiridina-3-il)-9-metilcarbazolsulfonamida, con actividad *in vitro* en rango nM, manteniendo el fenotipo propio de los TBA por su unión al sitio de unión de la Colchicina. La formación de un anillo de δ -carbolina a partir del carbazol, permitió obtener derivados con las mismas propiedades, sin embargo, los compuestos más activos no se correspondieron con la sulfonamidas con el anillo B disustituido por grupos metoxilo, sino por la correspondiente bromo-4-bencenosulfonamida (**74**).²¹⁰



Actualmente, el desarrollo de sulfonamidas antimitóticas sigue siendo una área de investigación de especial interés, como así lo demuestra la continua identificación de derivados de sulfonamidas anti-tubulina en los últimos años (75²¹¹, 76²¹² y 77²¹³).



2.4. POLIAMINAS

2.4.1. “Estructuras privilegiadas” como *template* universal en el desarrollo de fármacos

Las poliaminas son moléculas de naturaleza policatiónica esenciales para el crecimiento celular y desarrollo en eucariotas. Los principales constituyentes son la putrescina (1,4-diaminobutano, **78**), espermidina (1,8-diamino-4-azaoctano, **79**) y espermina (1,12-diamino-4,9-diazadodecano, **80**)²¹⁴ (figura 2.21).

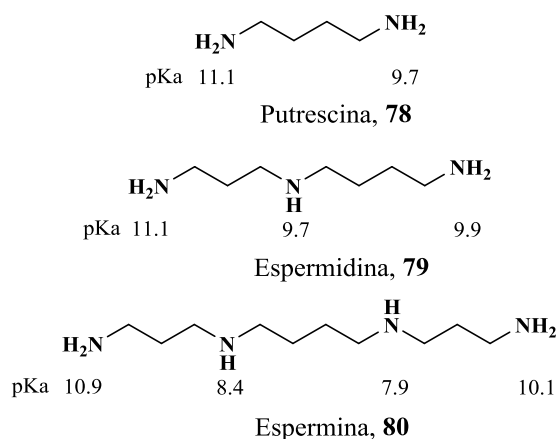


Figura 2.21. Estructura de la putrescina, espermidina y espermina, y los valores de *pKa*.

El elevado grado de protonación en condiciones fisiológicas es determinante para sus funciones biológicas. La distribución de carga y flexibilidad les permite unirse a varias macromoléculas siendo la cantidad de poliamina libre relativamente baja (entre 200 y 80 μM en eucariotas)²¹⁵. La mayor parte se encuentran unidas al ARN (57 -85%) o al ADN (4-18%), y en menor proporción unidas a moléculas de ATP (2-12 %), proteínas y fosfolípidos (por debajo del 5%).

Debido a su versatilidad de interacción, las poliaminas se encuentran relacionadas con una multitud de procesos: estabilización y modulación de la conformación del ADN; regulación de la expresión génica a través de la modulación de vías de señalización, transcripción o traducción; ensamblaje de microtúbulos; estabilización de membranas; modulación de canales iónicos; y otros procesos relacionados con su metabolismo a partir del cual regulan la proliferación y diferenciación celular y apoptosis.²¹⁶

Desde el ámbito de la química terapéutica, la enorme variedad de poliaminas fisiológicas y su implicación en los diferentes procesos celulares indican que son validadas por

la naturaleza como “*estructuras privilegiadas*”, término acuñado por Evans para definir un único esqueleto molecular que puede actuar como ligando para diferentes receptores.²¹⁷

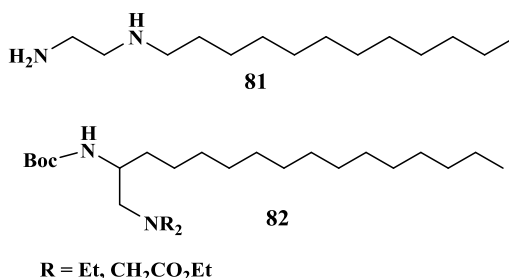
Asumiendo que la naturaleza ya ha identificado estas estructuras como cabezas de serie o prototipos de relevancia biológica, a partir de las modificaciones estructurales apropiadas pueden obtenerse moléculas con elevada afinidad y selectividad para cualquier diana. Concretamente, en el *template* poliamínico puede modularse su variabilidad conformacional, su capacidad de reconocimiento de diferentes especies aniónicas y catiónicas mediante cambios del *pKa* de sus nitrógenos y su paso a través de membranas, por la dualidad de su carácter hidrofílico-lipofílico según el número de grupos amino y longitud variable de sus grupos alquilo hidrofóbicos como elementos de unión. Es por ello que es reconocido como un *template* universal validado como punto de partida en el diseño de nuevos fármacos.²¹⁸

2.4.2. Poliaminas en el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas

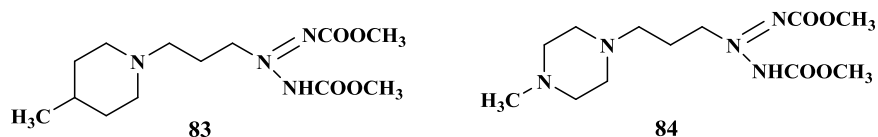
Las poliaminas naturales (putrescina, espermidina y espermina) se encuentran en altas concentraciones en células de elevada tasa de proliferación, tanto en células cancerígenas como en parásitos protozoos.

Desde que se demostró la eficacia de la DFMO (difluorometilornitina) como inhibidor de la ODC (Ornitina Descarboxilasa), primera enzima de la ruta biosintética de las poliaminas naturales, en el tratamiento de la tripanosomiasis africana, el uso del *template* poliamínico en el desarrollo de agentes leishmanicidas y tripanocidas se ha dirigido al desarrollo de reguladores homeostáticos. Concretamente, inhibidores enzimáticos, bien de las enzimas de biosíntesis y catabolismo de las poliaminas naturales, así como de inhibidores del metabolismo *redox*, principalmente inhibidores de la Tripanotión Reductasa (TR).²¹⁹

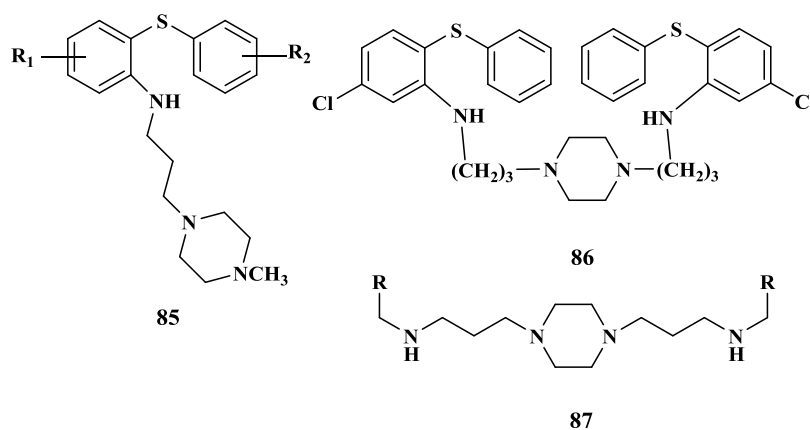
En la bibliografía se encuentran descritas etilendiaminas (**81**, **82**) con una cadena lipídica como sustituyente, capaces de producir la lisis total de promastigotes de *Leishmania*.²²⁰



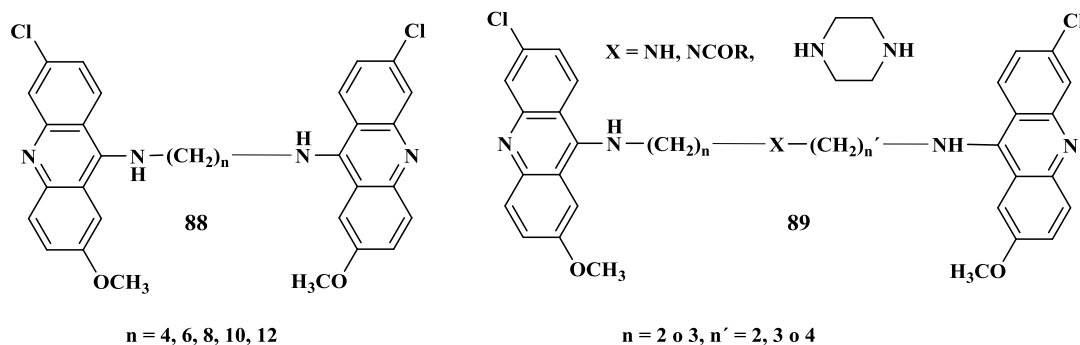
Considerando la subunidad 1,3-diaminopropano como posible farmacóforo, se sintetizaron derivados de 1,3-diaminas (**83**, **84**) con actividad leishmanicida.



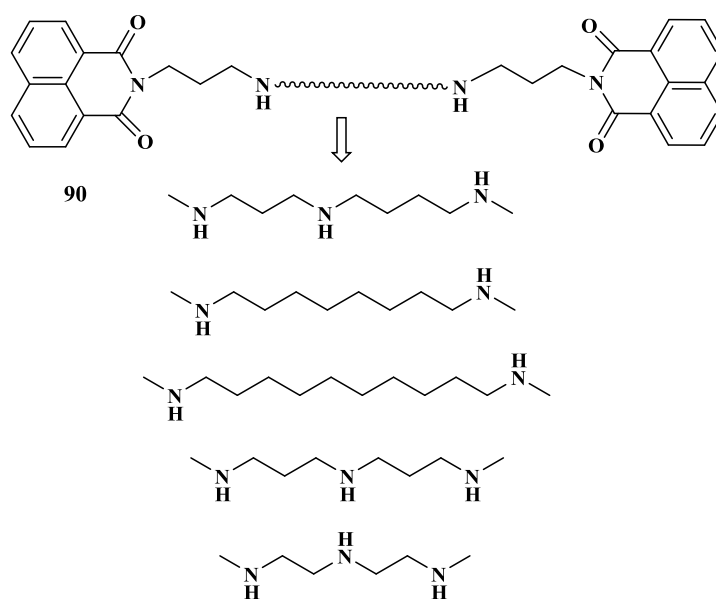
Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de una serie de derivados análogos, en los que uno de los nitrógenos de la subunidad 1,3-diaminopropano forma parte de un anillo de piperazina (**85**, **86** y **87**), y se evaluó su actividad tripanocida frente a tripomastigotes de *T. cruzi* y *T. brucei*. Los mismos autores estudiaron el posible mecanismo de acción de los compuestos obtenidos, como inhibidores de la enzima TR, enzima esencial del equilibrio redox en *Trypanosoma* y *Leishmania*, y por lo tanto, imprescindible para la supervivencia de los parásitos. Sin embargo, el compuesto que presentó mayor toxicidad frente a los parásitos (R = ciclohexilo), resultó totalmente inactivo frente a la enzima, constituyendo un cabeza de serie para la identificación de una nueva diana terapéutica.²²¹



Diversas diaminas, poliaminas y poliaminas sustituidas por una cadena lateral se han utilizado como elemento de unión de subunidades de acridina (**88**, **89**). La actividad *in vitro* de las bisacridinas resultantes se ha estudiado frente a *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. infantum*. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad antiparasitaria, así como la citotoxicidad de los compuestos sintetizados depende de la naturaleza de la poliamina y de su cadena lateral.²²²



Por otro lado, se ha observado que bisaminopropilnaftalimido poliaminas (**90**), relacionadas estructuralmente con las acridinas **88** y **89**, presentan actividad *in vitro* frente a *Leishmania infantum*. En este caso, sin embargo, la actividad leishmanicida no se ve afectada por la longitud de la cadena alquílica central, ni la presencia del átomo de nitrógeno.²²³

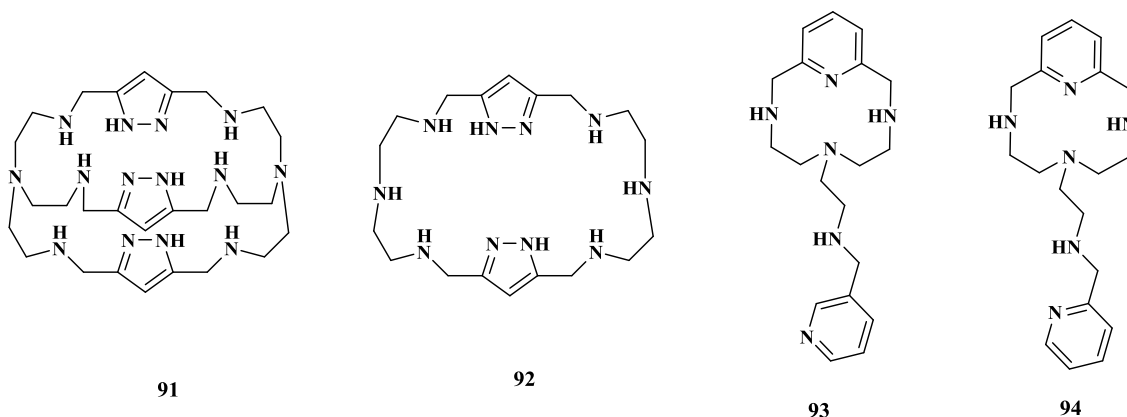


En los últimos años, el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia ha desarrollado diversas familias de derivados poliamínicos como agentes leishmanicidas y/o tripanocidas de elevada selectividad.

En colaboración con el Instituto de Química Médica del CSIC de Madrid se han sintetizado poliazamacrociclos con unidades de pirazol 3,5-disustituido activos *in vitro* frente *T. cruzi* con índices de selectividad de entre 43 y 173 veces superiores al Benznidazol (**91**, **92**)²²⁴

Por otro lado, han desarrollado una amplia familia de piridofanos de tipo escorpiando (**93**, **94**) cuyos elevados índices de selectividad se atribuyen a su mecanismo de acción específico como inhibidores de la Superóxido Dismutasa de hierro (FeSOD), defensa

antioxidante exclusiva de tripanosomátidos. Este tipo de compuestos han mostrado ser activos tanto *in vitro* frente a *Leishmania* spp., como en modelos murinos de *T. cruzi*.²²⁵



2.4.3. Derivados poliamínicos como agentes antitumorales

Niveles anormalmente elevados de poliaminas son considerados como una de las características por la cual la célula mantiene su capacidad proliferativa. Detectados en fluidos fisiológicos de pacientes oncológicos como marcadores bioquímicos de neoplasia o directamente en tumores, se han asociado con cáncer de mama, colon, próstata y melanoma entre otros.²²⁶ Muchos de estos estudios sugieren una correlación entre la sobreexpresión de las enzimas de la biosíntesis de poliaminas, reguladas a partir de determinados oncogenes, como Ras o Myc, y un aumento de la proliferación celular o estado tumorigénico.²²⁷

Aunque el mecanismo por el cual las poliaminas contribuyen al desarrollo tumoral no se conoce en su totalidad, la desregulación de sus niveles, teniendo en cuenta la multitud de sus funciones, se ha asociado a procesos de apoptosis, necrosis, autofagia y diferenciación celular.²²⁸

Dada la correlación entre la concentración de poliaminas y el estado tumorigénico, el desarrollo de derivados de poliaminas como potenciales fármacos antitumorales se ha centrado en la regulación de su compleja red de mecanismos de biosíntesis, catabolismo y transporte en las vías metabólicas de las poliaminas en mamíferos (*Figura 2.22*).

En una primera aproximación, los estudios se centraron en obtener inhibidores enzimáticos de dos de las enzimas clave en su ruta biosintética, la Ornitina Descarboxilasa (ODC) y la S-Adenosilmetionina Descarboxilasa (AdoMet-DC). La difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor irreversible de la ODC, fue el primero en mostrar propiedades antitumorales.²²⁹ Sin embargo, la DFMO como tratamiento único o en combinación no resultó efectivo debido a su pobre transporte en la célula, de hecho es citostático y no citotóxico, y mecanismos compensatorios aumentan el transporte de poliaminas y superan los efectos inhibidores de la ODC (*figura 2.22*).

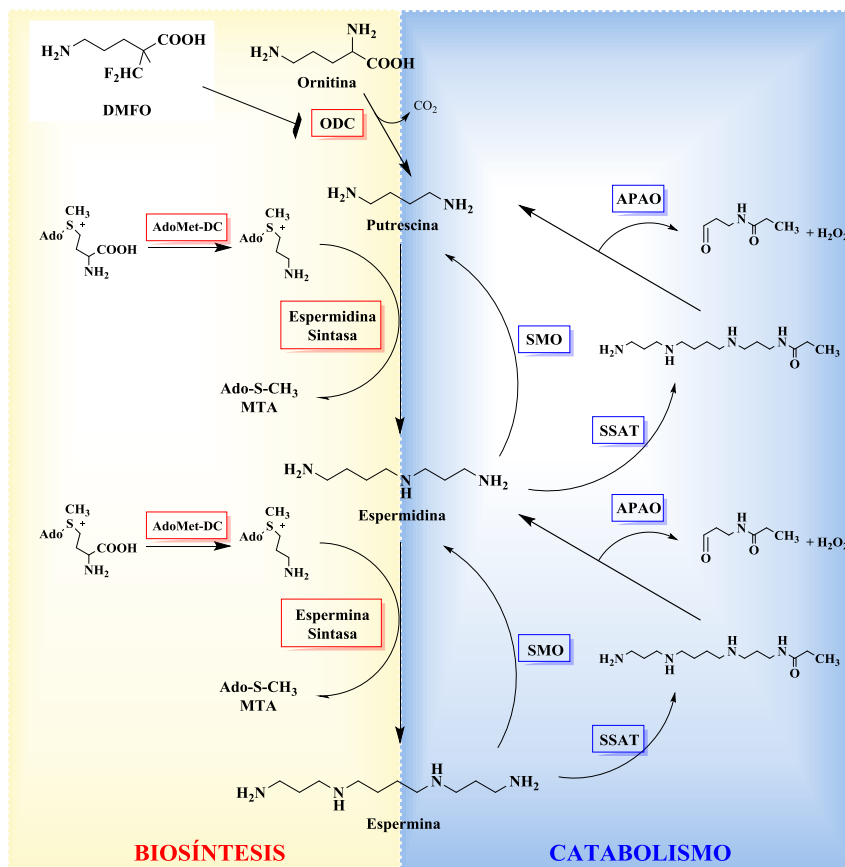


Figura 2.22. Vías metabólicas de las poliaminas en mamíferos. **DMFO:** difluorometilornitina, **ODC:** Ornitina Descarboxilasa, **AdoMet-DC:** S-Adenosilmetionina descarboxilasa, **SMO:** Espermina oxidasa, **SSAT:** espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa, **APAO:** Acetilpoliamina oxidasa.

La falta de eficacia en la práctica clínica de estos inhibidores condujo a una nueva estrategia adoptada por Porter y Bergenson, fundamentada en la naturaleza de autorregulación de las propias poliaminas a través de análogos estructurales. Éstos actuarían como sustratos del sistema de transporte, evitando así los mecanismos compensatorios de las poliaminas. Y en efecto, la acumulación de estos análogos resultaba en la inhibición del crecimiento o muerte celular por depleción de los niveles de poliaminas.²³⁰

A partir de esta estrategia se establecieron los análogos estructurales de las poliaminas fisiológicas como potenciales fármacos antitumorales, clasificados en distintas generaciones, según su desarrollo a lo largo de los años y las variaciones moleculares que se incorporan al *template* poliamínico.

Los derivados de primera generación son alquilaminas simétricamente di-sustituidas, compuestos similares a la espermina y espermidina, donde su grupo amino terminal está protegido por grupos alquilo para prevenir la oxidación por múltiples amino oxidasas (*figura 2.23 A; 95, 96*).

La sustitución asimétrica de los anteriores dio lugar a la segunda generación, que permitió validar la estrategia de adición de grupos hidrofóbicos para facilitar la entrada en la célula a través de su sistema de transporte (*figura 2.23 B; 97, 98*).

Posteriormente, se describieron las oligoaminas insaturadas o conformacionalmente restringidas con un IC_{50} de un orden de magnitud más bajo que sus análogos más cortos, correlacionada con su habilidad para formar agregados en el ADN (*figura 2.23C; 99, 100*).

En último lugar, se encuentran los análogos estructurales como reguladores epigenéticos, representados por poliamino(bis)guanidinas (*figura 2.23 D; 101*), por ser unos de los primeros inhibidores sintéticos de la histona demetilasa específica de lisina LSD1 (*Lysine (K)-Specific Demethylase 1A*) que producen re-expresión de genes supresores de tumores.²³¹

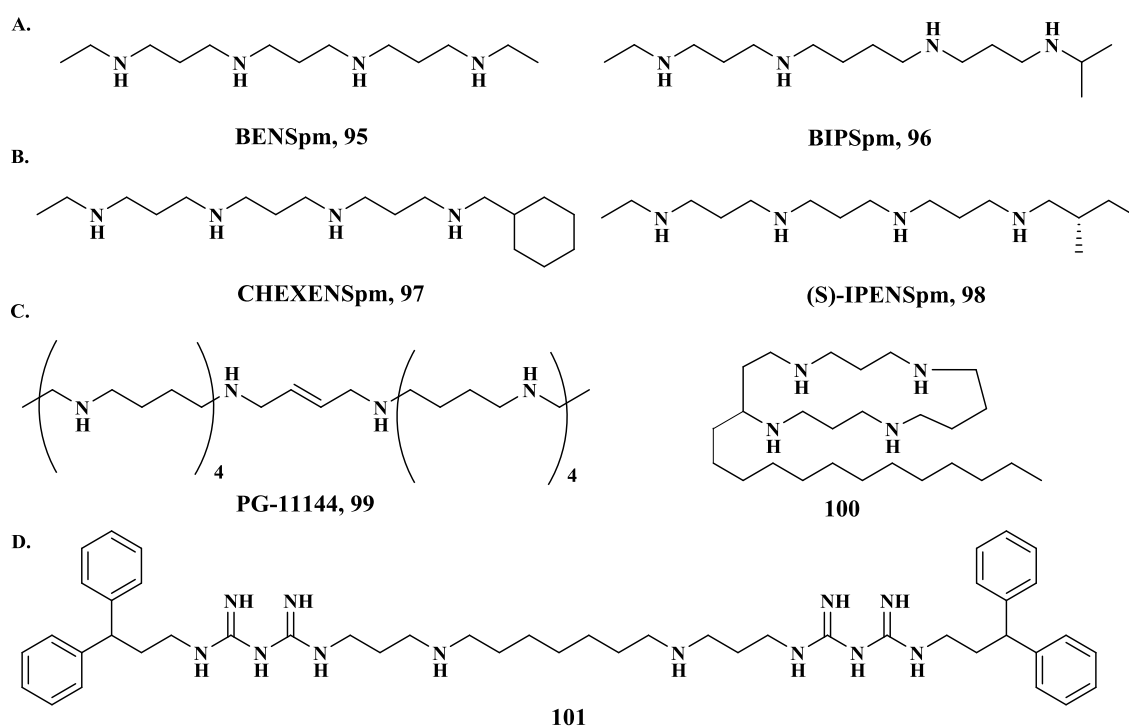
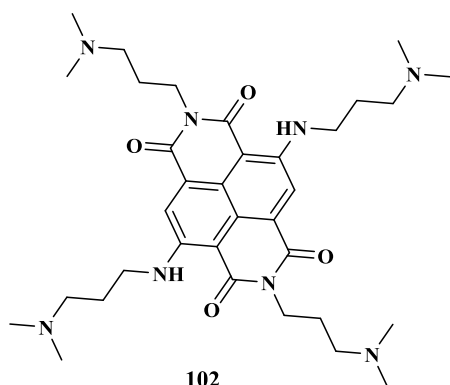


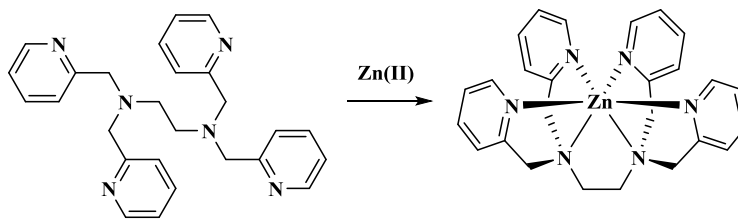
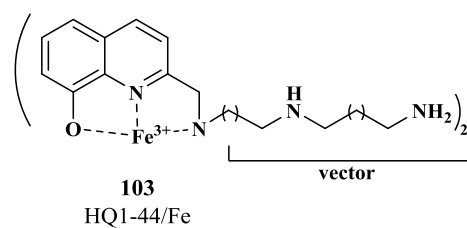
Figura 2.23. Diversidad estructural de análogos poliamínicos con actividad antitumoral. **A.** alquilaminas simétricamente di-sustituidas, **BENSpm**: Bis(etil)norespermina, **BIPSpm**: Bis(propil)espermina; **B.** alquilaminas asimétricas, **CHEXENSpm**. N^1 -ciclohexil-metil- N^{11} -etilnorespermina, **(S)-IPENSpm**: (S)- N^1 -(3-metil-butil)- N^{11} -etilnorespermina; **C.** Oligoaminas conformacionalmente restringidas; **D.** poliamino(bis)guanidina.

A pesar del elevado número de estudios, no se conocen en su totalidad las bases moleculares por las cuales los derivados poliamínicos ejercen su actividad antineoplásica, aunque se han propuesto diferentes mecanismos de acción más allá de la regulación de sus vías metabólicas. La utilización del *template* poliamínico permite estudiar estos nuevos mecanismos, como son su interacción con secuencias específicas de ADN (**102**)²³², o la regulación de la homeostasis de cationes intracelulares como Fe(II) (**103**), Cu(II) o Zn(II) (**104**).²³³ Además, los diferentes derivados pueden entrar en la célula a través del sistema de transporte de las

poliaminas, y por tanto pueden ser utilizados como sistema de vectorización por medio de conjugados con otros compuestos, así como constituir una herramienta para el estudio del mismo sistema de transporte en eucariotas.²³⁴



BMSG-SH-3-5, Compuesto de interacción con secuencias *G-quadruplex*



104, TPEN
(N,N,N',N'-tetrakis(2-metilpiridil)etilendiamina)

2.5. Bibliografía

1. Rogers, W. O.; Wirth, D. F., Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84* (2), 565-569.
2. Stuart, K.; Brun, R.; Croft, S.; Fairlamb, A.; Gürtler, R. E.; McKerrow, J.; Reed, S.; Tarleton, R., Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* **2008**, *118* (4), 1301-1310.
3. (a) Bañuls, A.-L.; Hide, M.; Prugnolle, F., *Leishmania* and the Leishmaniases: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* **2007**, *64*, 1-109. (b) Bates, P. A.; Rogers, M. E., New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* **2004**, *4* (6), 601-609.
4. Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Rodrigues, J. C. F.; Crepaldi, P. H.; Pimenta, P. F. P.; de Souza, W., The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathog* **2013**, *9* (10), e1003594.
5. Erfe, M. C.; David, C. V.; Huang, C.; Lu, V.; Maretta-Mira, A. C.; Haskell, J.; Bruhn, K. W.; Yeaman, M. R.; Craft, N., Efficacy of synthetic peptides RP-1 and AA-RP-1 against *Leishmania* species *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56* (2), 658-665.
6. Bailey, H.; Bishop, W. J., Leishman-Donovan Bodies and Donovaniasis: Sir William Boog Leishman, 1865-1926: Charles Donovan, 1863-1951. *Br J Vener Dis* **1959**, *35* (1), 8-9.
7. Laison, R.; Shaw, J. J.; Ward, R. D.; Fraiha, H., Leishmaniasis in Brazil. IX. Considerations on the *Leishmania braziliensis* complex. Importance of sandflies of the genus *Psychodopygus* (Mangabeira) in the transmission of *L. braziliensis braziliensis* in north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1973**, *67* (2), 184-196.
8. Rioux, J. A.; Lanotte, G.; Serres, E.; Pratlong, F.; Bastien, P.; Perieres, J., Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* **1990**, *65* (3), 111-125.
9. Akhouni, M.; Kuhls, K.; Cannet, A.; Votýpka, J.; Marty, P.; Delaunay, P.; Sereno, D., A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10* (3), e0004349.
10. Vannier-Santos, M. A.; Martiny, A.; de Souza, W., Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des* **2002**, *8* (4), 297-318.
11. (a) Seguin, O.; Descoteaux, A., *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cell Immunol* **2016**; (b) Handman, E., Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* **1999**, *44*, 1-39.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> (último acceso mayo 2016).
13. Desjeux, P., Human leishmaniases: epidemiology and public health aspects. *World World Health Stat Q* **1992**, *45* (2-3), 267-275.
14. Herwaldt, B. L., Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* **2001**, *14* (4), 659-688.
15. Cruz, I.; Morales, M. A.; Noguer, I.; Rodríguez, A.; Alvar, J., *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* **2002**, *359* (9312), 1124-1125.
16. Riera, C.; Fisa, R.; López-Chejade, P.; Serra, T.; Girona, E.; Jiménez, M.; Muncunill, J.; Sedeno, M.; Mascaró, M.; Udina, M.; Gallego, M.; Carrió, J.; Forteza, A.; Portús, M., Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* **2008**, *48* (7), 1383-1389.
17. Coutinho, M. T.; Bueno, L. L.; Sterzik, A.; Fujiwara, R. T.; Botelho, J. R.; De Maria, M.; Genaro, O.; Linardi, P. M., Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* **2005**, *128* (1-2), 149-155.
18. Novo, S. P.; Leles, D.; Bianucci, R.; Araujo, A., The process of *Leishmania* infection - disease and new perspectives of paleoparasitology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2016**, *58*, 45.
19. Alvar, J., Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. *Parasitol Today* **1994**, *10* (4), 160-163.

20. Maciel, B. L.; Lacerda, H. G.; Queiroz, J. W.; Galvao, J.; Pontes, N. N.; Dimenstein, R.; McGowan, S. E.; Pedrosa, L. F.; Jeronimo, S. M., Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* **2008**, *79* (4), 591-598.
21. Bhattacharya, S. K.; Sur, D.; Karbwang, J., Childhood visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* **2006**, *123* (3), 353-356.
22. Roberts, C. W.; Walker, W.; Alexander, J., Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* **2001**, *14* (3), 476-488.
23. Salman, S. M.; Rubeiz, N. G.; Kibbi, A.-G., Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clin Dermatol* **1999**, *17* (3), 291-296.
24. Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M., Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **2007**, *5* (11), 873-882.
25. (a) Organización Mundial de la Salud (OMS), Leishmaniasis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>, (último acceso Octubre 2016); (b) Drugs for Neglected Disease initiative (DNDi), What is Leishmaniasis? <http://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>, (último acceso Octubre 2016).
26. Ejov, M.; Dagne, D., Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014–2020. *WHO Regional Office for Europe* 2014. Disponible en <http://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/strategic-framework-for-leishmaniasis-control-in-the-who-european-region-2014-2020>, **2014**.
27. (a) Amela, C.; Suarez, B.; Isidoro, B.; Sierra, M. J.; Santos, S.; Simón, F. Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España; Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, **2012**; (b) Jiménez, M.; González, E.; Martín-Martín, I.; Hernández, S.; Molina, R., Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol* **2014**, *202* (3-4), 296-300.
28. (a) Castillo, E.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F.; Rangel, M.; González-Rosende, M. E., The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. *Curr Med Chem* **2010**, *17* (33), 4027-4051; (b) Sundar, S.; Chakravarty, J., An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* **2015**, *16* (2), 237-252.
29. Organización Mundial de la Salud (OMS). Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010; Serie de Informes técnicos 949, **2012**, disponible en www.who.int.
30. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Leishmaniasis en las Américas: Recomendaciones para el tratamiento, **2013**, disponible en <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/7704>.
31. Blum, J.; Buffet, P.; Visser, L.; Harms, G.; Bailey, M. S.; Caumes, E.; Clerinx, J.; van Thiel, P. P.; Morizot, G.; Hatz, C.; Dorlo, T. P.; Lockwood, D. N., LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014. *J Travel Med* **2014**, *21* (2), 116-129.
32. Sosa, N.; Capitán, Z.; Nieto, J.; Nieto, M.; Calzada, J.; Paz, H.; Spadafora, C.; Kreishman-Deitrick, M.; Kopydlowski, K.; Ullman, D.; McCarthy, W. F.; Ransom, J.; Berman, J.; Scott, C.; Grogl, M., Randomized, double-blinded, phase 2 trial of WR 279,396 (Paromomycin and Gentamicin) for cutaneous leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg* **2013**, *89* (3), 557-563.
33. Sundar, S.; Chatterjee, M., Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* **2006**, *123* (3), 345-352.
34. (a) Zhou, Y.; Messier, N.; Ouellette, M.; Rosen, B. P.; Mukhopadhyay, R., *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug Pentostam. *J Biol Chem* **2004**, *279* (36), 37445-37451; (b) Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H., Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem* **1995**, *230* (2), 460-468.
35. Wyllie, S.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H., Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **2004**, *279* (38), 39925-39932.

36. Sereno, D.; Holzmuller, P.; Mangot, I.; Cuny, G.; Ouaisi, A.; Lemesre, J.-L., Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, *45* (7), 2064-2069.
37. Haldar, A. K.; Sen, P.; Roy, S., Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol Biol Int* **2011** (2011), 571242.
38. (a) Croft, S. L.; Yardley, V., Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* **2002**, *8* (4), 319-42; (b) Mbongo, N.; Loiseau, P. M.; Billion, M. A.; Robert-Gero, M., Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, *42* (2), 352-357.
39. (a) Bray, P. G.; Barrett, M. P.; Ward, S. A.; de Koning, H. P., Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol* **2003**, *19* (5), 232-239; (b) Nacher, M.; Carme, B.; Sainte Marie, D.; Couppie, P.; Clyti, E.; Guibert, P.; Pradinaud, R., Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol* **2001**, *95* (4), 331-336.
40. (a) Rakotomanga, M.; Blanc, S.; Gaudin, K.; Chaminade, P.; Loiseau, P. M., Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51* (4), 1425-1430; (b) Pérez-Victoria, F. J.; Sánchez-Canete, M. P.; Seifert, K.; Croft, S. L.; Sundar, S.; Castanys, S.; Gamarro, F., Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* **2006**, *9* (1-2), 26-39.
41. Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H., Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **2006**, *19* (1), 111-126.
42. Sundar, S.; Olliaro, P. L., Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag* **2007**, *3* (5), 733-740.
43. Mishra, J.; Saxena, A.; Singh, S., Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* **2007**, *14* (10), 1153-1169.
44. Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K., Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* **2007**, *356* (25), 2571-2581.
45. Momeni, A. Z.; Aminjavaheri, M.; Omidghaemi, M. R., Treatment of cutaneous leishmaniasis with ketoconazole cream. *J Dermatolog Treat* **2003**, *14* (1), 26-29.
46. Wyllie, S.; Patterson, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R.; Norval, S.; Kime, R.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H., The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci Transl Med* **2012**, *4* (119), 119re1.
47. (a) Sundar, S.; Sinha, P. K.; Dixon, S. A.; Buckley, R.; Miller, A. K.; Mohamed, K.; Al-Banna, M., Pharmacokinetics of oral sitamaquine taken with or without food and safety and efficacy for treatment of visceral leishmaniasis: a randomized study in Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg* **2011**, *84* (6), 892-900; (b) Jha, T. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Felton, J. M.; Sabin, A. J.; Horton, J., A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am J Trop Med Hyg* **2005**, *73* (6), 1005-1011.
48. Croft, S. L.; Seifert, K.; Yardley, V., Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* **2006**, *123* (3), 399-410.
49. Sundar, S.; Rai, M.; Chakravarty, J.; Agarwal, D.; Agrawal, N.; Vaillant, M.; Olliaro, P.; Murray, H. W., New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. *Clin Infect Dis* **2008**, *47* (8), 1000-1006.
50. Melaku, Y.; Collin, S. M.; Keus, K.; Gatluak, F.; Ritmeijer, K.; Davidson, R. N., Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. *Am J Trop Med Hyg* **2007**, *77* (1), 89-94.
51. Musa, A.; Khalil, E.; Hailu, A.; Olobo, J.; Balasegaram, M.; Omollo, R.; Edwards, T.; Rashid, J.; Mbui, J.; Musa, B.; Abuzaid, A. A.; Ahmed, O.; Fadlalla, A.; El-Hassan, A.; Mueller, M.; Mucee, G.; Njoroge, S.; Manduku, V.; Mutuma, G.; Apadet, L.; Lodenyo, H.; Mutea, D.; Kirigi, G.; Yifru, S.; Mengistu, G.; Hurissa, Z.; Hailu, W.; Weldegebreal, T.; Tafes, H.; Mekonnen, Y.; Makonnen, E.; Ndegwa, S.; Sagaki, P.; Kimutai, R.; Kesusu, J.; Owiti, R.; Ellis, S.; Wasunna, M., Sodium stibogluconate (SSG) &

- paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* **2012**, *6* (6), e1674.
52. (a) Seifert, K.; Croft, S. L., *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, *50* (1), 73-79; (b) Serrano-Martín, X.; Payares, G.; De Lucca, M.; Martínez, J. C.; Mendoza-León, A.; Benaim, G., Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53* (12), 5108-5113; (c) Wasunna, M.; Njenga, S.; Balasegaram, M.; Alexander, N.; Omollo, R.; Edwards, T.; Dorlo, T. P.; Musa, B.; Ali, M. H.; Elamin, M. Y.; Kirigi, G.; Juma, R.; Kip, A. E.; Schoone, G. J.; Hailu, A.; Olobo, J.; Ellis, S.; Kimutai, R.; Wells, S.; Khalil, E. A.; Strub Wourgaft, N.; Alves, F.; Musa, A., Efficacy and safety of AmBisome in combination with Sodium Stibogluconate or Miltefosine and Miltefosine Monotherapy for african visceral leishmaniasis: Phase II Randomized Trial. *PLoS Negl Trop Dis* **2016**, *10* (9), e0004880.
53. De Souza, W., Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* **2002**, *8* (4), 269-285.
54. Hoare, C. A., Morphological and Taxonomic Studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. *J Protozool* **1964**, *11* (2), 200-207.
55. Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Crepaldi, P. H.; de Souza, W., Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* **2012**, *6* (8), e1749.
56. Cal, M.; Ioset, J. R.; Fugi, M. A.; Maser, P.; Kaiser, M., Assessing anti-T. *cruzi* candidates *in vitro* for sterile cidalidad. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2016**, *6* (3), 165-170.
57. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). DPDx-laboratory identification of Parasitic Disease of Public Health Concern. Leishmaniasis. <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>, (último acceso marzo 2017).
58. Luitgards-Moura, J. F.; Vargas, A. B.; Almeida, C. E.; Magno-Esperanca, G.; Agapito-Souza, R.; Folly-Ramos, E.; Costa, J.; Tsouris, P.; Rosa-Freitas, M. G., A *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population from Roraima, Amazon region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2005**, *47* (3), 131-137.
59. (a) Stevens, J. R.; Gibson, W. C., The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saude Publica* **1999**, *15* (4), 673-684; (b) Lacombe, D., Extra-intestinal phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Rev Bras Biol* **1980**, *40* (3), 525-535.
60. Kribs-Zaleta, C. M., Alternative transmission modes for *Trypanosoma cruzi*. *Math Biosci Eng* **2010**, *7* (3), 657-673.
61. Prata, A., Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* **2001**, *1* (2), 92-100.
62. Lupi, O.; Bartlett, B. L.; Haugen, R. N.; Dy, L. C.; Sethi, A.; Klaus, S. N.; Machado Pinto, J.; Bravo, F.; Tying, S. K., Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. *J Am Acad Dermatol* **2009**, *60* (6), 897-925; quiz 926-928.
63. Leslie, M., Infectious diseases. A tropical disease hits the road. *Science* **2011**, *333* (6045), 934.
64. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Parasites-American Trypanosomiasis (also Known as Chagas Disease). https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/vectors/, (último acceso mayo 2017).
65. (a) Organización Mundial de la Salud (OMS). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>, (último acceso octubre 2016); (b) Drugs for Neglected Disease initiative (DNDi). What is Chagas Disease? <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/> (último acceso Octubre 2016); (c) Requena-Méndez, A.; Aldasoro, E.; de Lazzari, E.; Sicuri, E.; Brown, M.; Moore, D. A.; Gascón, J.; Muñoz, J., Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* **2015**, *9* (2), e0003540; (d) Carlier, Y., Globalization of Chagas disease (American trypanosomiasis): the situation in Europe and Belgium. *Bull Mem Acad R Med Belg* **2011**, *166* (10-12), 347-355.
66. Coura, J. R.; Castro, S. L. d., A Critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 3-24.
67. Brener, Z., Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1962**, *4*, 389-396.

68. Bern, C.; Montgomery, S. P.; Herwaldt, B. L.; Rassi, A., Jr.; Marin-Neto, J. A.; Dantas, R. O.; Maguire, J. H.; Acquatella, H.; Morillo, C.; Kirchhoff, L. V.; Gilman, R. H.; Reyes, P. A.; Salvatella, R.; Moore, A. C., Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA* **2007**, *298* (18), 2171-2181.
69. Mario, S.-S.; Gildardo, R.; Edgar, A. G.; Virgilio, B.-G., Therapeutic targets for the development of anti-*Trypanosoma Cruzi* drugs: A brief review. *Mini Rev Org Chem* **2016**, *13* (3), 227-243.
70. Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe de la situación mundial de las enfermedades no transmisibles. WHO/NMH/NVI/15.1. <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/es/>, (último acceso octubre de 2016).
71. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
72. Weinberg, R. A., The nature of cancer. In *The biology of cancer*, 1st Edition ed.; Garland Science, N., USA, Ed. **2007**.
73. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **2015**, *136* (5), E359-86.
74. Peltomäki, P., Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res* **2012**, *318* (4), 299-310.
75. Garzon, R.; Croce, C. M., MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* **2008**, *15* (4), 352-358.
76. Hanahan, D.; Weinberg, Robert, A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646-674.
77. (a) Pavletich, N. P., Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **1999**, *287* (5), 821-828; (b) Alcorta, D. A.; Xiong, Y.; Phelps, D.; Hannon, G.; Beach, D.; Barrett, J. C., Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (24), 13742-13747; (c) Chellappan, S. P.; Giordano, A.; Fisher, P. B., Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development. *Curr Top Microbiol Immunol* **1998**, *227*, 57-103; (d) Harper, J. W., Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* **1997**, *29*, 91-107.
78. Lee, M. H.; Yang, H. Y., Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* **2001**, *58* (12-13), 1907-1922.
79. (a) Villa, M.; Cassani, C.; Gobbin, E.; Bonetti, D.; Longhese, M. P., Coupling end resection with the checkpoint response at DNA double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci* **2016**, *73* (19), 3655-3663; (b) Matheson, C. J.; Backos, D. S.; Reigan, P., Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends Pharmacol Sci* **2016**, *37* (10), 872-881.
80. Gorbsky, G. J., The spindle checkpoint and chromosome segregation in meiosis. *FEBS J* **2015**, *282* (13), 2471-2487.
81. Campisi, J.; d'Adda di Fagagna, F., Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (9), 729-740.
82. Hayflick, L., The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **1965**, *37* (3), 614-636.
83. Rodier, F.; Campisi, J., Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **2011**, *192* (4), 547-556.
84. Shay, J. W.; Roninson, I. B., Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* **2004**, *23* (16), 2919-33.
85. Brandl, A.; Hartmann, A.; Bechmann, V.; Graf, B.; Nerlich, M.; Angele, P., Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. *J Orthop Res* **2011**, *29* (7), 1114-1120.
86. Di Bernardo, G.; Cipollaro, M.; Galderisi, U., Chromatin modification and senescence. *Curr Pharm Des* **2012**, *18* (13), 1686-1693.
87. Collado, M.; Serrano, M., Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10* (1), 51-57.
88. Dorr, J. R.; Yu, Y.; Milanovic, M.; Beuster, G.; Zasada, C.; Dabritz, J. H.; Lise, J.; Lenze, D.; Gerhardt, A.; Schleicher, K.; Kratzat, S.; Purfurst, B.; Walenta, S.; Mueller-Klieser, W.; Graler, M.; Hummel, M.; Keller, U.; Buck, A. K.; Dorken, B.; Willmitzer, L.; Reimann, M.; Kempa, S.; Lee, S.; Schmitt, C. A.,

- Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* **2013**, *501* (7467), 421-425.
89. Young, A. R.; Narita, M.; Ferreira, M.; Kirschner, K.; Sadaie, M.; Darot, J. F.; Tavares, S.; Arakawa, S.; Shimizu, S.; Watt, F. M.; Narita, M., Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **2009**, *23* (7), 798-803.
90. Muñoz-Espín, D.; Serrano, M., Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15* (7), 482-496.
91. Campisi, J., Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! *Mech Ageing Dev* **2005**, *126* (1), 51-58.
92. Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92* (20), 9363-9367.
93. Lee, B. Y.; Han, J. A.; Im, J. S.; Morrone, A.; Johung, K.; Goodwin, E. C.; Kleijer, W. J.; DiMaio, D.; Hwang, E. S., Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **2006**, *5* (2), 187-195.
94. Bringold, F.; Serrano, M., Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* **2000**, *35* (3), 317-329.
95. d'Adda di Fagagna, F., Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 512-522.
96. Narita, M., Cellular senescence and chromatin organisation. *Br J Cancer* **2007**, *96* (5), 686-691.
97. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**, *26* (4), 239-257.
98. Favalaro, B.; Allocati, N.; Graziano, V.; Di Ilio, C.; De Laurenzi, V., Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* **2012**, *4* (5), 330-349.
99. Ghobrial, I. M.; Witzig, T. E.; Adjei, A. A., Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* **2005**, *55* (3), 178-194.
100. Kiraz, Y.; Adan, A.; Kartal Yandim, M.; Baran, Y., Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol* **2016**, *37* (7), 8471-8486.
101. Babashah, S.; Soleimani, M., The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. *Eur J Cancer* **2011**, *47* (8), 1127-1137.
102. Hannun, Y. A.; Obeid, L. M., Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9* (2), 139-150.
103. Brown, J. M.; Attardi, L. D., The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* **2005**, *5* (3), 231-237.
104. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J. M.; Alnemri, E. S.; Baehrecke, E. H.; Blagosklonny, M. V.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; El-Deiry, W. S.; Fulda, S.; Gottlieb, E.; Green, D. R.; Hengartner, M. O.; Kepp, O.; Knight, R. A.; Kumar, S.; Lipton, S. A.; Lu, X.; Madeo, F.; Malorni, W.; Mehlen, P.; Nunez, G.; Peter, M. E.; Piacentini, M.; Rubinsztein, D. C.; Shi, Y.; Simon, H. U.; Vandenabeele, P.; White, E.; Yuan, J.; Zhivotovsky, B.; Melino, G.; Kroemer, G., Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **2012**, *19* (1), 107-120.
105. WTSI [en línea]. MEROPS: the peptidase database, (último acceso abril 2017).
106. Los, M.; Stroh, C.; Janicke, R. U.; Engels, I. H.; Schulze-Osthoff, K., Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* **2001**, *22* (1), 31-34.
107. (a) Taylor, R. C.; Cullen, S. P.; Martin, S. J., Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9* (3), 231-241; (b) Clark, A. C., Caspase Allosteric and Conformational Selection. *Chem. Rev* **2016**, *116* (11), 6666-6706.
108. Tait, S. W.; Green, D. R., Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (9), 621-632.
109. (a) Bao, Q.; Shi, Y., Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* **2007**, *14* (1), 56-65; (b) Keller, N.; Mares, J.; Zerbe, O.; Grutter, M. G., Structural and biochemical studies on procaspase-8: new insights on initiator caspase activation. *Structure* **2009**, *17* (3), 438-448.

110. Shi, Y., Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Sci.* **2004**, *13* (8), 1979-1987.
111. Luthi, A. U.; Martin, S. J., The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* **2007**, *14* (4), 641-650.
112. Nicholson, D. W.; Ali, A.; Thornberry, N. A.; Vaillancourt, J. P.; Ding, C. K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P. R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y. A., Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **1995**, *376* (6535), 37-43.
113. Green, D. R.; Kroemer, G., The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **2004**, *305* (5684), 626-629.
114. Adams, J. M.; Cory, S., The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **2007**, *26* (9), 1324-1337.
115. (a) Brunelle, J. K.; Letai, A., Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* **2009**, *122* (4), 437-441; (b) Hegde, R.; Srinivasula, S. M.; Zhang, Z.; Wassell, R.; Mukattash, R.; Cilenti, L.; DuBois, G.; Lazebnik, Y.; Zervos, A. S.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E. S., Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **2002**, *277* (1), 432-438.
116. Schulze-Osthoff, K.; Ferrari, D.; Los, M.; Wesselborg, S.; Peter, M. E., Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* **1998**, *254* (3), 439-459.
117. Micheau, O.; Tschopp, J., Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **2003**, *114* (2), 181-190.
118. Dickens, L.S.; Boyd, R.S.; Jukes-Jones, R.; Hughes, M.A.; Robinson, G.L.; Fairall, L.; Schwabe, J.W.; Cain, K.; MacFarlane, M., A Death Effector Domain Chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol Cell* **2012**, *47* (2), 291-305.
119. Li, H.; Zhu, H.; Xu, C. J.; Yuan, J., Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **1998**, *94* (4), 491-501.
120. Mehlen, P.; Bredesen, D. E., Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal* **2011**, *4* (157), mr2.
121. Amos, L. A., What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Semin Cell Dev Biol* **2011**, *22* (9), 916-926.
122. Jordan, M. A., Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2002**, *2* (1), 1-17.
123. Jordan, M. A.; Wilson, L., Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4* (4), 253-265.
124. (a) Sept, D., Microtubule Polymerization: One Step at a Time. *Curr Biol* **2007**, *17* (17), R764-R766; (b) Desai, A.; Mitchison, T. J., Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **1997**, *13*, 83-117.
125. Howard, J.; Hyman, A. A., Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **2003**, *422* (6933), 753-758.
126. Akhmanova, A.; Steinmetz, M. O., Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2015**, *16* (12), 711-726.
127. Jordan, M. A.; Toso, R. J.; Thrower, D.; Wilson, L., Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90* (20), 9552-9556.
128. Prota, A. E.; Bargsten, K.; Diaz, J. F.; Marsh, M.; Cuevas, C.; Liniger, M.; Neuhaus, C.; Andreu, J. M.; Altmann, K. H.; Steinmetz, M. O., A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111* (38), 13817-13821.
129. King, K. M.; Lupichuk, S.; Baig, L.; Webster, M.; Basi, S.; Whyte, D.; Rix, S., Optimal use of taxanes in metastatic breast cancer. *Curr Oncol* **2009**, *16* (3), 8-20.
130. Abal, M.; Andreu, J. M.; Barasoain, I., Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets* **2003**, *3* (3), 193-203.
131. Churchill, C. D.; Klobukowski, M.; Tuszyński, J. A., The unique binding mode of laulimalide to two tubulin protofilaments. *Chem Biol Drug Des* **2015**, *86* (2), 190-199.

132. Liu, J.; Towle, M. J.; Cheng, H.; Saxton, P.; Reardon, C.; Wu, J.; Murphy, E. A.; Kuznetsov, G.; Johannes, C. W.; Tremblay, M. R.; Zhao, H.; Pesant, M.; Fang, F. G.; Vermeulen, M. W.; Gallagher, B. M., Jr.; Littlefield, B. A., *In vitro* and *in vivo* anticancer activities of synthetic (-)-lulimalide, a marine natural product microtubule stabilizing agent. *Anticancer Res* **2007**, *27* (3B), 1509-1518.
133. Gigant, B.; Wang, C.; Ravelli, R. B.; Roussi, F.; Steinmetz, M. O.; Curmi, P. A.; Sobel, A.; Knossow, M., Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **2005**, *435* (7041), 519-522.
134. Jordan, M. A.; Thrower, D.; Wilson, L., Mechanism of inhibition of cell proliferation by vinca alkaloids. *Cancer Res* **1991**, *51* (8), 2212-2222.
135. Moudi, M.; Go, R.; Yien, C. Y. S.; Nazre, M., Vinca Alkaloids. *Int J Prev Med* **2013**, *4* (11), 1231-1235.
136. Ravelli, R. B.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M., Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* **2004**, *428* (6979), 198-202.
137. Skoufias, D. A.; Wilson, L., Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry* **1992**, *31* (3), 738-746.
138. Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D., An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm Res* **2012**, *29* (11), 2943-2971.
139. Neal, A. J.; Hoskin, P.J., *Clinical Oncology: Basic Principles and Practice*. 4th Edition; Hodder Arnold, London. Ed. **2009**.
140. Guillén-Ponce, C.; Molina-Garrido, M. Qué es, cómo funciona y tipos de quimioterapia, <http://www.seom.org/es/guia-actualizada-de-tratamientos/que-es-como-funciona-y-tipos-de-quimioterapia?start=2>, (último acceso diciembre de 2016).
141. Szakacs, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M., Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (3), 219-234.
142. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D. B.; Johnston, P. G., Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13* (10), 714-726.
143. Muhammad, A.; Syed Shoaib Ahmad, S.; Tayyaba, N.; Salma, S.; Gildardo, R., Synthetic routes of sulfonamide derivatives: A brief review. *Mini Rev Org Chem* **2013**, *10* (2), 160-170.
144. Andrighetti-Frohner, C. R.; de Oliveira, K. N.; Gaspar-Silva, D.; Pacheco, L. K.; Joussef, A. C.; Steindel, M.; Simoes, C. M.; de Souza, A. M.; Magalhaes, U. O.; Afonso, I. F.; Rodrigues, C. R.; Nunes, R. J.; Castro, H. C., Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. *Eur J Med Chem* **2009**, *44* (2), 755-763.
145. Dea-Ayuela, M. A.; Castillo, E.; González-Álvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Bolás-Fernández, F.; Borrás, J.; González-Rosende, M. E., *In vivo* and *in vitro* anti-leishmanial activities of 4-nitro-*N*-pyrimidin- and *N*-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and *N*²-(4-nitrophenyl)-*N*¹-propylglycinamide. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17* (21), 7449-7456.
146. Bhattacharya, G.; Salem, M. M.; Werbovetz, K. A., Antileishmanial dinitroaniline sulfonamides with activity against parasite tubulin. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12* (17), 2395-2398.
147. George, T. G.; Johnsamuel, J.; Delfin, D. A.; Yakovich, A.; Mukherjee, M.; Phelps, M. A.; Dalton, J. T.; Sackett, D. L.; Kaiser, M.; Brun, R.; Werbovetz, K. A., Antikinetoplastid antimitotic activity and metabolic stability of dinitroaniline sulfonamides and benzamides. *Bioorg Med Chem* **2006**, *14* (16), 5699-5710.
148. Khan, K. M.; Khan, M. Z.; Taha, M.; Maharvi, G. M.; Saify, Z. S.; Parveen, S.; Choudhary, M. I., Leishmanicidal potential of *N*-substituted morpholine derivatives: synthesis and structure-activity relationships. *Nat Prod Res* **2009**, *23* (5), 479-484.
149. Chibale, K.; Haupt, H.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Saravanamuthu, A.; Fairlamb, A. H.; Croft, S. L., Antiprotozoal and cytotoxicity evaluation of sulfonamide and urea analogues of quinacrine. *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *11* (19), 2655-2657.
150. Bahrami, K.; Khodaei, M. M.; Soheilzad, M., Direct conversion of thiols to sulfonyl chlorides and sulfonamides. *J Org Chem* **2009**, *74* (24), 9287-9291.
151. Convenient one-pot synthesis of sulfonamides from thiols using trichloroisocyanuric acid. *Synth Commun* **2007**, *37* (12), 2039-2050.

152. Pandya, R.; Murashima, T.; Tedeschi, L.; Barrett, A. G. M., Facile one-pot synthesis of aromatic and heteroaromatic sulfonamides. *J Org Chem* **2003**, *68* (21), 8274-8276.
153. Chantarasriwong, O.; Jang, D. O.; Chavasiri, W., A practical and efficient method for the preparation of sulfonamides utilizing Cl₃CCN/PPh₃. *Tetrahedron Lett* **2006**, *47* (42), 7489-7492.
154. (a) Lam, P. Y.; Vincent, G.; Clark, C. G.; Deudon, S.; Jadhav, P. K., Copper-catalyzed general C-N and C-O bond cross-coupling with arylboronic acid. *Tetrahedron Lett* **2001**, *42* (20), 3415-3418; (b) Burton, G.; Cao, P.; Li, G.; Rivero, R., Palladium-catalyzed intermolecular coupling of aryl chlorides and sulfonamides under microwave irradiation. *Org Lett* **2003**, *5* (23), 4373-4376.
155. Wilden, J. D.; Geldeard, L.; Lee, C. C.; Judd, D. B.; Caddick, S., Trichlorophenol (TCP) sulfonate esters: A selective alternative to pentafluorophenol (PFP) esters and sulfonyl chlorides for the preparation of sulfonamides. *Chem Commun* **2007**, (10), 1074-1076.
156. Camargo-Ordóñez, A.; Moreno-Reyes, C.; Olazarán-Santibáñez, F.; Martínez-Hernández, S.; Bocanegra-García, V.; Rivera, G., Efficient synthesis of sulfonamide derivatives on solid supports catalyzed using solvent-free and microwave-assisted methods. *Quim Nova* **2011**, *34*, 787-791.
157. Raju, B.; Kogan, T. P., Solid phase synthesis of sulfonamides using a carbamate linker. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38* (19), 3373-3376.
158. Woods, D. D., The biochemical mode of action of the sulphonamide drugs. *J gen Microbiol* **1962**, *29* (4), 687-702.
159. Jesman, C.; Mludzik, A.; Cybulska, M., History of antibiotics and sulphonamides discoveries. *Pol Merkur Lekarski* **2011**, *30* (179), 320-322.
160. Loubatières, A., The hypoglycemic sulfonamides: history and development of the problem from 1942 to 1955. *Ann N Y Acad Sci* **1957**, *71* (1), 4-11.
161. Robbins, N.; Koch, S. E.; Tranter, M.; Rubinstein, J., The history and future of probenecid. *Cardiovasc Toxicol* **2012**, *12* (1), 1-9.
162. Kinoshita, Y.; Hirasawa, Y., Progress of carbonic anhydrase inhibitors. *Sogo Rinsho* **1964**, *13*, 847-57.
163. Novello, F. C.; Sprague, J. M., Benzothiadiazine dioxides as novel diuretics. *J Am Chem Soc* **1957**, *79* (8), 2028-2029.
164. Whitehouse, M. W., Drugs to treat inflammation: A historical introduction. *Curr Med Chem* **2005**, *12* (25), 2931-2942.
165. Stranix, B. R.; Lavallee, J. F.; Sevigny, G.; Yelle, J.; Perron, V.; LeBerre, N.; Herbart, D.; Wu, J. J., Lysine sulfonamides as novel HIV-protease inhibitors: Nepsilon-acyl aromatic alpha-amino acids. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16* (13), 3459-3462.
166. Casini, A.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, L. T., Sulfonamides and sulfonylated derivatives as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* **2002**, *2* (1), 55-75.
167. Supuran, C. T.; Casini, A.; Scozzafava, A., Protease inhibitors of the sulfonamide type: anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. *Med Res Rev* **2003**, *23* (5), 535-558.
168. Verdier, R.; Fitzgerald, D. W.; Johnson, W. D., Jr; Pape, J., Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with ciprofloxacin for treatment and prophylaxis of *isospora belli* and *cyclospora cayetanensis* infection in hiv-infected patients: A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* **2000**, *132* (11), 885-888.
169. (a) Dannemann, B.; McCutchan, J. A.; Israelski, D.; Antoniskis, D.; Leport, C.; Luft, B.; Nussbaum, J.; Clumeck, N.; Morlat, P.; Chiu, J.; et al., Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. *Ann Intern Med* **1992**, *116* (1), 33-43; (b) Hill, D.; Dubey, J. P., *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* **2002**, *8* (10), 634-640.
170. (a) Ramharter, M.; Schuster, K.; Bouyou-Akotet, M. K.; Adegnika, A. A.; Schmits, K.; Mombo-Ngoma, G.; Agnandji, S. T.; Nemeth, J.; Afene, S. N.; Issifou, S.; Onnas, I. N.; Kombila, M.; Kremsner, P. G., Malaria in pregnancy before and after the implementation of a national IPTp program in Gabon. *Am J Trop Med Hyg* **2007**, *77* (3), 418-422; (b) Garner, P.; Brabin, B., A review of randomized controlled trials of routine antimalarial drug prophylaxis during pregnancy in endemic malarious areas. *Bull World Health Organ* **1994**, *72* (1), 89-99; (c) Falade, C. O.; Yusuf, B. O.; Fadero, F. F.; Mokuolu, O. A.; Hamer, D. H.;

- Salako, L. A., Intermittent preventive treatment with sulphadoxine-pyrimethamine is effective in preventing maternal and placental malaria in Ibadan, south-western Nigeria. *Malar J* **2007**, *6*, 88.
171. Chan, M. M.; Fong, D., Inhibition of leishmanias but not host macrophages by the antitubulin herbicide trifluralin. *Science* **1990**, *249* (4971), 924-926.
172. Mitra, A.; Sept, D., Binding and interaction of dinitroanilines with apicomplexan and kinetoplastid alpha-tubulin. *J Med Chem* **2006**, *49* (17), 5226-5231.
173. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; da Silva Bolzani, V.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A., Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Curr Med Chem* **2007**, *14* (17), 1829-1852.
174. Souza, A. M. T.; Castro, H. C.; Brito, M. A.; Andrighetti-Fröhner, C. R.; Magalhães, U.; Oliveira, K. N.; Gaspar-Silva, D.; Pacheco, L. K.; Joussef, A. C.; Steindel, M.; Simões, C. M. O.; Santos, D. O.; Albuquerque, M. G.; Rodrigues, C. R.; Nunes, R. J., *Leishmania amazonensis* growth inhibitors: biological and theoretical features of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives. *Curr Microbiol* **2009**, *59* (4), 374-379.
175. (a) Navarro, M.; Vasquez, F.; Sánchez-Delgado, R. A.; Pérez, H.; Sinou, V.; Schrevel, J., Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 7. Synthesis and *in vitro* antimalarial activity of new gold-chloroquine complexes. *J Med Chem* **2004**, *47* (21), 5204-5209; (b) Mbongo, N.; Loiseau, P. M.; Lawrence, F.; Bories, C.; Craciunescu, D. G.; Robert-Gero, M., *In vitro* sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. *Parasitol Res* **1997**, *83* (5), 515-517.
176. da Silva, L. E.; Joussef, A. C.; Pacheco, L. K.; da Silva, D. G.; Steindel, M.; Rebelo, R. A., Synthesis and *in vitro* evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15* (24), 7553-7560.
177. Pérez-Rebolledo, A.; Teixeira, L. R.; Batista, A. A.; Mangrich, A. S.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; González, M.; Hernández, P.; Ferreira, A. M.; Speziali, N. L.; Beraldo, H., 4-nitroacetophenone-derived thiosemicarbazones and their copper(II) complexes with significant *in vitro* anti-trypanosomal activity. *Eur J Med Chem* **2008**, *43* (5), 939-948.
178. Everson da Silva, L.; Teixeira de Sousa Jr, P.; Nunes Maciel, E.; Korting Nunes, R.; Eger, I.; Steindel, M.; Andrade Rebelo, R., *In Vitro* antiprotozoal evaluation of zinc and copper complexes based on sulfonamides containing 8-aminoquinoline ligands. *Lett Drug Des Discov* **2010**, *7* (9), 679-685.
179. Ajibade, P. A.; Kolawole, G. A.; O'Brien, P., Metal complexes of 4-amino-*N*-(2-pyrimidinyl)benzene sulfonamide: synthesis, characterization and antiprotozoal studies. *Synth React Inorg M* **2007**, *37* (8), 653-659.
180. (a) Vieira, D. F.; Choi, J. Y.; Roush, W. R.; Podust, L. M., Expanding the binding envelope of CYP51 inhibitors targeting *Trypanosoma cruzi* with 4-aminopyridyl-based sulfonamide derivatives. *Chembiochem* **2014**, *15* (8), 1111-1120; (b) Guzel-Akdemir, O.; Akdemir, A.; Pan, P.; Vermelho, A. B.; Parkkila, S.; Scozzafava, A.; Capasso, C.; Supuran, C. T., A class of sulfonamides with strong inhibitory action against the alpha-carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem* **2013**, *56* (14), 5773-5781; (c) Alafeefy, A. M.; Ceruso, M.; Al-Jaber, N. A.; Parkkila, S.; Vermelho, A. B.; Supuran, C. T., A new class of quinazoline-sulfonamides acting as efficient inhibitors against the alpha-carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2015**, *30* (4), 581-585.
181. Marra, R.; Bernardino, A.; Proux, T.; Charret, K.; Lira, M.-L.; Castro, H.; Souza, A.; Oliveira, C.; Borges, J.; Rodrigues, C.; Canto-Cavalheiro, M.; Leon, L.; Amaral, V., 4-(1*H*-Pyrazol-1-yl) benzenesulfonamide derivatives: Identifying new active antileishmanial structures for use against a neglected disease. *Molecules* **2012**, *17* (11), 12961.
182. Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Wilkinson, S. R.; Kaiser, M., Novel nitro(triazole/imidazole)-based heteroarylamides/sulfonamides as potential antitrypanosomal agents. *Eur J Med Chem* **2014**, *87*, 79-88.
183. Wilkinson, S. R.; Bot, C.; Kelly, J. M.; Hall, B. S., Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Curr Top Med Chem* **2011**, *11* (16), 2072-2084.
184. (a) Monti, S. M.; Supuran, C. T.; De Simone, G., Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008 - 2013). *Expert Opin Ther Pat* **2013**, *23* (6), 737-49; (b) Carta, F.; Supuran, C. T.;

- Scozzafava, A., Sulfonamides and their isosters as carbonic anhydrase inhibitors. *Future Med Chem* **2014**, *6* (10), 1149-1165.
185. Finn, P. W.; Bandara, M.; Butcher, C.; Finn, A.; Hollinshead, R.; Khan, N.; Law, N.; Murthy, S.; Romero, R.; Watkins, C.; Andrianov, V.; Bokaldere, R. M.; Dikovska, K.; Gailite, V.; Loza, E.; Piskunova, I.; Starchenkov, I.; Vorona, M.; Kalvinsh, I., Novel sulfonamide derivatives as inhibitors of histone deacetylase. *Helv Chim Acta* **2005**, *88* (7), 1630-1657.
186. Jain, P.; Saravanan, C.; Singh, S. K., Sulphonamides: Deserving class as MMP inhibitors? *Eur J of Med Chem* **2013**, *60*, 89-100.
187. Hu, L.; Li, Z. R.; Jiang, J. D.; Boykin, D. W., Novel diaryl or heterocyclic sulfonamides as antimitotic agents. *Anticancer Agents Med Chem* **2008**, *8* (7), 739-745.
188. Abel, G.; Connors, T. A.; Ross, W. C. J.; Nguyen Hoang, N.; Hoellinger, H.; Pichat, L., The selective concentration of sulphadiazine and related compounds in malignant tissue. *Eur J Cancer* **1973**, *9* (1), 49-54.
189. Yoshino, H.; Ueda, N.; Nijjima, J.; Sugumi, H.; Kotake, Y.; Koyanagi, N.; Yoshimatsu, K.; Asada, M.; Watanabe, T.; Nagasu, T.; et al., Novel sulfonamides as potential, systemically active antitumor agents. *J Med Chem* **1992**, *35* (13), 2496-2497.
190. Branda, R. F.; McCormack, J. J.; Perlmutter, C. A., Cellular pharmacology of chloroquinoxaline sulfonamide and a related compound in murine B16 melanoma cells. *Biochem Pharmacol* **1988**, *37* (23), 4557-4564.
191. Koyanagi, N.; Nagasu, T.; Fujita, F.; Watanabe, T.; Tsukahara, K.; Funahashi, Y.; Fujita, M.; Taguchi, T.; Yoshino, H.; Kitoh, K., *In vivo* tumor growth inhibition produced by a novel sulfonamide, E7010, against rodent and human tumors. *Cancer Res* **1994**, *54* (7), 1702-1706.
192. Yoshimatsu, K.; Yamaguchi, A.; Yoshino, H.; Koyanagi, N.; Kitoh, K., Mechanism of action of E7010, an orally active sulfonamide antitumor agent: inhibition of mitosis by binding to the colchicine site of tubulin. *Cancer Res* **1997**, *57* (15), 3208-3213.
193. Fox, E.; Maris, J. M.; Cohn, S. L.; Goodspeed, W.; Goodwin, A.; Kromplewski, M.; Medina, D.; Xiong, H.; Krivoshik, A.; Widemann, B.; Adamson, P. C.; Balis, F. M., Pharmacokinetics of orally administered ABT-751 in children with neuroblastoma and other solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **2010**, *66* (4), 737-743.
194. (a) Segreti, J. A.; Polakowski, J. S.; Koch, K. A.; Marsh, K. C.; Bauch, J. L.; Rosenberg, S. H.; Sham, H. L.; Cox, B. F.; Reinhart, G. A., Tumor selective antivascular effects of the novel antimitotic compound ABT-751: an *in vivo* rat regional hemodynamic study. *Cancer Chemother Pharmacol* **2004**, *54* (3), 273-281; (b) Luo, Y.; Hradil, V. P.; Frost, D. J.; Rosenberg, S. H.; Gordon, G. B.; Morgan, S. J.; Gagne, G. D.; Cox, B. F.; Tahir, S. K.; Fox, G. B., ABT-751, a novel tubulin-binding agent, decreases tumor perfusion and disrupts tumor vasculature. *Anticancer Drugs* **2009**, *20* (6), 483-492.
195. (a) Fox, E.; Maris, J. M.; Widemann, B. C.; Meek, K.; Goodwin, A.; Goodspeed, W.; Kromplewski, M.; Fouts, M. E.; Medina, D.; Cho, S. Y.; Cohn, S. L.; Krivoshik, A.; Hagey, A. E.; Adamson, P. C.; Balis, F. M., A phase I study of ABT-751, an orally bioavailable tubulin inhibitor, administered daily for 7 days every 21 days in pediatric patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* **2006**, *12* (16), 4882-7; (b) Fox, E.; Maris, J. M.; Widemann, B. C.; Goodspeed, W.; Goodwin, A.; Kromplewski, M.; Fouts, M. E.; Medina, D.; Cohn, S. L.; Krivoshik, A.; Hagey, A. E.; Adamson, P. C.; Balis, F. M., A phase I study of ABT-751, an orally bioavailable tubulin inhibitor, administered daily for 21 days every 28 days in pediatric patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* **2008**, *14* (4), 1111-1115.
196. Owa, T.; Yoshino, H.; Okauchi, T.; Yoshimatsu, K.; Ozawa, Y.; Sugi, N. H.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Kitoh, K., Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G1 phase of the cell cycle. *J Med Chem* **1999**, *42* (19), 3789-3799.
197. Owa, T.; Yoshino, H.; Okauchi, T.; Okabe, T.; Ozawa, Y.; Hata Sugi, N.; Yoshimatsu, K.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Kitoh, K., Synthesis and biological evaluation of *N*-(7-indolyl)-3-pyridinesulfonamide derivatives as potent antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12* (16), 2097-2100.
198. Haddad, R. I.; Weinstein, L. J.; Wiczorek, T. J.; Bhattacharya, N.; Raftopoulos, H.; Oster, M. W.; Zhang, X.; Latham, V. M., Jr.; Costello, R.; Faucher, J.; DeRosa, C.; Yule, M.; Miller, L. P.; Loda, M.; Posner, M. R.; Shapiro, G. I., A phase II clinical and pharmacodynamic study of E7070 in patients with

- metastatic, recurrent, or refractory squamous cell carcinoma of the head and neck: modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by a novel chloroindolyl sulfonamide cell cycle inhibitor. *Clin Cancer Res* **2004**, *10* (14), 4680-4687.
199. (a) Owa, T.; Okauchi, T.; Yoshimatsu, K.; Sugi, N. H.; Ozawa, Y.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Okabe, T.; Kitoh, K.; Yoshino, H., A focused compound library of novel *N*-(7-indolyl)benzenesulfonamides for the discovery of potent cell cycle inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10* (11), 1223-1226; (b) Mohan, R.; Banerjee, M.; Ray, A.; Manna, T.; Wilson, L.; Owa, T.; Bhattacharyya, B.; Panda, D., Antimitotic sulfonamides inhibit microtubule assembly dynamics and cancer cell proliferation. *Biochemistry* **2006**, *45* (17), 5440-5449.
200. Yokoi, A.; Kuromitsu, J.; Kawai, T.; Nagasu, T.; Hata Sugi, N.; Yoshimatsu, K.; Yoshino, H.; Owa, T., Profiling novel sulfonamide antitumor agents with cell-based phenotypic screens and array-based gene expression analysis. *Mol Cancer Ther* **2002**, *1* (4), 275-286.
201. Bouissane, L.; El Kazouli, S.; Leonce, S.; Pfeiffer, B.; Rakib, E. M.; Khouili, M.; Guillaumet, G., Synthesis and biological evaluation of *N*-(7-indazolyl)benzenesulfonamide derivatives as potent cell cycle inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2006**, *14* (4), 1078-1088.
202. Chang, J. Y.; Hsieh, H. P.; Chang, C. Y.; Hsu, K. S.; Chiang, Y. F.; Chen, C. M.; Kuo, C. C.; Liou, J. P., 7-Aroyl-aminoindoline-1-sulfonamides as a novel class of potent antitubulin agents. *J Med Chem* **2006**, *49* (23), 6656-9.
203. Liou, J. P.; Hsu, K. S.; Kuo, C. C.; Chang, C. Y.; Chang, J. Y., A novel oral indoline-sulfonamide agent, *N*-[1-(4-methoxybenzenesulfonyl)-2,3-dihydro-1*H*-indol-7-yl]-isonicotinamide (J30), exhibits potent activity against human cancer cells *in vitro* and *in vivo* through the disruption of microtubule. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, *323* (1), 398-405.
204. (a) Takagi, M.; Honmura, T.; Watanabe, S.; Yamaguchi, R.; Nogawa, M.; Nishimura, I.; Katoh, F.; Matsuda, M.; Hidaka, H., *In vivo* antitumor activity of a novel sulfonamide, HMN-214, against human tumor xenografts in mice and the spectrum of cytotoxicity of its active metabolite, HMN-176. *Invest New Drugs* **2003**, *21* (4), 387-399; (b) Tanaka, H.; Ohshima, N.; Ikenoya, M.; Komori, K.; Katoh, F.; Hidaka, H., HMN-176, an active metabolite of the synthetic antitumor agent HMN-214, restores chemosensitivity to multidrug-resistant cells by targeting the transcription factor NF- κ B. *Cancer Res* **2003**, *63* (20), 6942-6947.
205. (a) Medina, J. C.; Roche, D.; Shan, B.; Learned, R. M.; Frankmoelle, W. P.; Clark, D. L.; Rosen, T.; Jaen, J. C., Novel halogenated sulfonamides inhibit the growth of multidrug resistant MCF-7/ADR cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* **1999**, *9* (13), 1843-1846; (b) Kirby, S.; Gertler, S. Z.; Mason, W.; Watling, C.; Forsyth, P.; Aniagolu, J.; Stagg, R.; Wright, M.; Powers, J.; Eisenhauer, E. A., Phase 2 study of T138067-sodium in patients with malignant glioma: Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Neuro-oncol* **2005**, *7* (2), 183-188; (c) Rubenstein, S. M.; Baichwal, V.; Beckmann, H.; Clark, D. L.; Frankmoelle, W.; Roche, D.; Santha, E.; Schwender, S.; Thoolen, M.; Ye, Q.; Jaen, J. C., Hydrophilic, pro-drug analogues of T138067 are efficacious in controlling tumor growth *in vivo* and show a decreased ability to cross the blood brain barrier. *J Med Chem* **2001**, *44* (22), 3599-3605.
206. Gelmon, K. A.; Belanger, K.; Soulieres, D.; Britten, C.; Chia, S.; Charpentier, D.; Chi, K.; Powers, J.; Walsh, W.; Seymour, L., A phase I study of T900607 given once every 3 weeks in patients with advanced refractory cancers; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC-CTG) IND 130. *Invest New Drugs* **2005**, *23* (5), 445-453.
207. Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A., Medicinal chemistry of combretastatin A4: Present and future directions. *J Med Chem* **2006**, *49* (11), 3033-3044.
208. Medina, J. C., Benzenesulfonamides and benzamides as therapeutic agents. *PCT Int. Appl. WO1999036391 A1*, **1999**, 19990722.
209. Li, Q.; Sham, H.; Woods, K. W.; Steiner, B. A.; Stephen, L. G. I. I.; Barr, K. J.; Imade, H. M.; Rosenberg, S., Cell proliferation inhibitors. US6521658 B1, **2003**, 20030218
210. (a) Hu, L.; Li, Z.-r.; Li, Y.; Qu, J.; Ling, Y.-H.; Jiang, J.-d.; Boykin, D. W., Synthesis and structure-activity relationships of carbazole sulfonamides as a novel class of antimitotic agents against solid tumors. *J Med Chem* **2006**, *49* (21), 6273-6282; (b) Wang, Y.-M.; Hu, L.-X.; Liu, Z.-M.; You, X.-F.; Zhang, S.-H.; Qu, J.-R.; Li, Z.-R.; Li, Y.; Kong, W.-J.; He, H.-W.; Shao, R.-G.; Zhang, L.-R.; Peng,

- Z.-G.; Boykin, D. W.; Jiang, J.-D., *N*-(2,6-dimethoxypyridine-3-yl)-9-methylcarbazole-3-sulfonamide as a novel tubulin ligand against human cancer. *Clin Cancer Res* **2008**, *14* (19), 6218-6227; (c) Chen, J.; Liu, T.; Wu, R.; Lou, J.; Cao, J.; Dong, X.; Yang, B.; He, Q.; Hu, Y., Design, synthesis, and biological evaluation of novel *N*-gamma-carboline arylsulfonamides as anticancer agents. *Bioorg Med Chem* **2010**, *18* (24), 8478-8484.
211. Huang, H. L.; Chao, M. W.; Chen, C. C.; Cheng, C. C.; Chen, M. C.; Lin, C. F.; Liou, J. P.; Teng, C. M.; Pan, S. L., LTP-1, a novel antimitotic agent and Stat3 inhibitor, inhibits human pancreatic carcinomas *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep* **2016**, *6*, 27794.
212. Wong, S. M.; Liu, F. H.; Lee, Y. L.; Huang, H. M., MPT0B169, a new antitubulin agent, inhibits Bcr-Abl expression and induces mitochondrion-mediated apoptosis in nonresistant and Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *PLoS One* **2016**, *11* (1), e0148093.
213. Yang, J.; Zhou, S.; Ji, L.; Zhang, C.; Yu, S.; Li, Z.; Meng, X., Synthesis and structure-activity relationship of 4-azaheterocycle benzenesulfonamide derivatives as new microtubule-targeting agents. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, *24* (21), 5055-5058.
214. Pegg, A. E., Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life* **2009**, *61* (9), 880-894.
215. Wallace, H. M.; Fraser, A. V.; Hughes, A., A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* **2003**, *376* (Pt 1), 1-14.
216. (a) Miller-Fleming, L.; Olin-Sandoval, V.; Campbell, K.; Ralser, M., Remaining mysteries of molecular biology: The role of polyamines in the cell. *J Mol Biol* **2015**, *427* (21), 3389-3406; (b) Ramani, D.; De Bandt, J. P.; Cynober, L., Aliphatic polyamines in physiology and diseases. *Clin Nutr* **2014**, *33* (1), 14-22.
217. Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S.; et al., Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J Med Chem* **1988**, *31* (12), 2235-2246.
218. (a) Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Budriesi, R.; Cacciaguerra, S.; Chiarini, A.; Spampinato, S.; Tumiatti, V.; Melchiorre, C., Universal template approach to drug design: polyamines as selective muscarinic receptor antagonists. *J Med Chem* **1998**, *41* (21), 4150-4160; (b) Melchiorre, C.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V., Polyamines in drug discovery: from the universal template approach to the multitarget-directed ligand design strategy. *J Med Chem* **2010**, *53* (16), 5906-5914; (c) Minarini, A.; Milelli, A.; Tumiatti, V.; Rosini, M.; Bolognesi, M. L.; Melchiorre, C., Synthetic polyamines: an overview of their multiple biological activities. *Amino Acids* **2010**, *38* (2), 383-392.
219. Birkholtz, L.-M.; Williams, M.; Niemand, J.; Louw, Abraham, I.; Persson, L.; Heby, O., Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. *Biochem J* **2011**, *438* (2), 229-244.
220. (a) da Costa, C. F.; Coimbra, E. S.; Braga, F. G.; dos Reis, R. C.; da Silva, A. D.; de Almeida, M. V., Preparation and antileishmanial activity of lipophilic *N*-alkyl diamines. *Biomed Pharmacother* **2009**, *63* (1), 40-42; (b) del Olmo, E.; Alves, M.; López, J. L.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Rojas de Arias, A.; San Feliciano, A., Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-alcohols. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12* (4), 659-662.
221. Bonnet, B.; Soulez, D.; Girault, S.; Maes, L.; Landry, V.; Davioud-Charvet, E.; Sergheraert, C., Trypanothione reductase inhibition/trypanocidal activity relationships in a 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine series. *Bioorg Med Chem* **2000**, *8* (1), 95-103.
222. Girault, S.; Grellier, P.; Berecibar, A.; Maes, L.; Mouray, E.; Lemiere, P.; Debrey, M. A.; Davioud-Charvet, E.; Sergheraert, C., Antimalarial, antitrypanosomal, and antileishmanial activities and cytotoxicity of bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): influence of the linker. *J Med Chem* **2000**, *43* (14), 2646-2654.
223. Oliveira, J.; Ralton, L.; Tavares, J.; Codeiro-da-Silva, A.; Bestwick, C. S.; McPherson, A.; Thoo Lin, P. K., The synthesis and the *in vitro* cytotoxicity studies of bisnaphthalimidopropyl polyamine derivatives against colon cancer cells and parasite *Leishmania infantum*. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15* (1), 541-545.
224. Sánchez-Moreno, M.; Marín, C.; Navarro, P.; Lamarque, L.; García-España, E.; Miranda, C.; Huertas, O.; Olmo, F.; Gómez-Contreras, F.; Pitarch, J.; Arrebola, F., *In vitro* and *in vivo* trypanosomicidal activity of pyrazole-containing macrocyclic and macrobicyclic polyamines: their action on acute and chronic phases of Chagas disease. *J Med Chem* **2012**, *55* (9), 4231-4243.

225. (a) Marín, C.; Clares, M. P.; Ramírez-Macías, I.; Blasco, S.; Olmo, F.; Soriano, C.; Verdejo, B.; Rosales, M. J.; Gómez-Herrera, D.; García-España, E.; Sánchez-Moreno, M., *In vitro* activity of scorpiand-like azamacrocyclic derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. *Eur J Med Chem* **2013**, *62*, 466-477; (b) Olmo, F.; Marín, C.; Clares, M. P.; Blasco, S.; Albelda, M. T.; Soriano, C.; Gutiérrez-Sánchez, R.; Arrebola-Vargas, F.; García-España, E.; Sánchez-Moreno, M., Scorpiand-like azamacrocyclics prevent the chronic establishment of *Trypanosoma cruzi* in a murine model. *Eur J of Med Chem* **2013**, *70*, 189-198; (c) Marín, C.; Inclán, M.; Ramírez-Macías, I.; Albelda, M. T.; Canas, R.; Clares, M. P.; González-García, J.; Rosales, M. J.; Urbanova, K.; García-España, E.; Sánchez-Moreno, M., *In vitro* antileishmanial activity of aza-scorpiand macrocycles. Inhibition of the antioxidant enzyme iron superoxide dismutase. *RSC Advances* **2016**, *6* (21), 17446-17455.
226. (a) Manni, A.; Grove, R.; Kunselman, S.; Aldaz, C. M., Involvement of the polyamine pathway in breast cancer progression. *Cancer Lett* **1995**, *92* (1), 49-57; (b) Gilmour, S. K., Polyamines and nonmelanoma skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **2007**, *224* (3), 249-56; (c) Russell, D. H., Clinical relevance of polyamines. *Crit Rev Clin Lab Sci* **1983**, *18* (3), 261-311; (d) Kubota, S.; Yamasaki, Z.; Yoshimoto, M.; Murata, N.; Wada, T.; Ohsawa, N.; Takaku, F., The value of urinary polyamine assay in stomach cancer comparison with serum carcinoembryonic antigen. *Cancer* **1985**, *56* (7), 1630-1635.
227. (a) Shantz, L. M.; Levin, V. A., Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential. *Amino Acids* **2007**, *33* (2), 213-223; (b) Ignatenko, N. A.; Babbar, N.; Mehta, D.; Casero, R. A., Jr.; Gerner, E. W., Suppression of polyamine catabolism by activated Ki-ras in human colon cancer cells. *Mol Carcinog* **2004**, *39* (2), 91-102; (c) Soda, K., The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J Exp Clin Cancer Res* **2011**, *30*, 95.
228. Minois, N.; Carmona-Gutiérrez, D.; Madeo, F., Polyamines in aging and disease. *Aging* **2011**, *3* (8), 716-732.
229. Prakash, N. J.; Schechter, P. J.; Grove, J.; Koch-Weser, J., Effect of α -difluoromethylornithine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, on L1210 Leukemia in Mice. *Cancer Res* **1978**, *38* (9), 3059-3062.
230. (a) Porter, C. W.; Bergeron, R. J., Regulation of polyamine biosynthetic activity by spermidine and spermine analogs. A novel antiproliferative strategy. In *Progress in Polyamine Research: Novel Biochemical, Pharmacological, and Clinical Aspects*, Zappia, V.; Pegg, A. E., Eds. Springer US: Boston, MA, **1988**, 677-690; (b) Porter, C. W.; Ganis, B.; Libby, P. R.; Bergeron, R. J., Correlations between polyamine analogue-induced increases in spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase activity, polyamine pool depletion, and growth inhibition in human melanoma cell lines. *Cancer Res* **1991**, *51* (14), 3715-3720.
231. Huang, Y.; Marton, L. J.; Woster, P. M.; Casero, R. A., Polyamine analogues targeting epigenetic gene regulation. *Essays Biochem* **2009**, *46*, 95-110.
232. Hampel, S. M.; Pepe, A.; Greulich-Bode, K. M.; Malhotra, S. V.; Reszka, A. P.; Veith, S.; Boukamp, P.; Neidle, S., Mechanism of the antiproliferative activity of some naphthalene diimide G-Quadruplex ligands. *Mol Pharmacol* **2013**, *83* (2), 470-480.
233. (a) Hyun, H. J.; Sohn, J. H.; Ha, D. W.; Ahn, Y. H.; Koh, J. Y.; Yoon, Y. H., Depletion of intracellular zinc and copper with TPEN results in apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2001**, *42*, 460-465; (b) Corcé, V.; Renaud, S.; Cannie, I.; Julienne, K.; Gouin, S. G.; Loréal, O.; Gaboriau, F.; Deniaud, D., Synthesis and biological properties of quilamines II, new iron chelators with antiproliferative activities. *Bioconjugate Chem* **2014**, *25* (2), 320-334; (c) Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C., Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev* **2014**, *114* (1), 815-862.
234. Soulet, D.; Gagnon, B.; Rivest, S.; Audette, M.; Poulin, R., A Fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *J Biol Chem* **2004**, *279* (47), 49355-49366.

3

Parte experimental

3.1. Síntesis y caracterización de compuestos orgánicos

3.1.1. Reactivos y disolventes

Todos los reactivos utilizados en la síntesis de las sulfonamidas **S1-S26** y de las poliaminas **L1-L5**, cuya preparación no haya sido descrita, fueron suministrados por Sigma-Aldrich y Acros.

La piridina, que precisó condiciones anhidras como disolvente, se secó sobre hidróxido sódico y se destiló en atmósfera inerte de argón.

El etanol, diclorometano y acetonitrilo utilizados en las reacciones se secaron mediante un sistema de purificación MB SPS-800 MBRAUN (*MBRAUN SPS Systems*), bajo atmósfera de nitrógeno, en columnas específicas para cada tipo de disolvente.

En la precipitación de las sales de clorhidrato de los derivados poliamínicos se utilizó etanol seco Seccosolv[®] (máx. 0.01% H₂O).

Los demás disolventes empleados (hexano, acetato de etilo, metanol) fueron del mejor grado comercialmente accesible y no se purificaron.

3.1.2. Técnicas instrumentales

3.1.2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se efectuaron en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia con espectrómetros de 300 (Bruker Advance DPX300), 400 (Bruker 400AV) y 500 (Bruker DRX500) MHz, operando a 299.95 MHz, 399.95 MHz y 499.95 MHz para el ¹H, y a 75.43 MHz, 100.58 MHz y 125.75 MHz para el ¹³C, respectivamente.

Los valores de los desplazamientos (δ) se expresan en ppm, tomando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS) en deuterocloroformo (CDCl₃) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆), y la sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico-2,2,3,3-*d*₄ (TSP) en agua deuterada (óxido de deuterio, D₂O). Las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en hertzios (Hz).

La visualización y procesado de los espectros se realizó con el software MestReNova 11.0.¹

3.1.2.2. Análisis elemental de C, H, N y S

Los análisis elementales se realizaron con un analizador elemental CE Instruments EA1110 CHNS-O disponible en el SCSIE de la Universidad de Valencia. Cada compuesto se analizó por duplicado.

3.1.2.3. Espectrometría de Masas

Los espectros de masas de alta resolución (EM-AR) se realizaron en el SCSIE de la Universidad de Valencia con diferentes espectrómetros: espectrómetro de masas de sector magnético de alta resolución V.G. Autospec, TRIO 1000 (fisons) en modalidad de impacto electrónico (EI *electron impact*) y bombardeo con átomos rápidos (FAB, *Fast Atom Bombardment*), espectrómetro de masas de trampa de iones, Esquire 3000 plus (Bruker) con fuente de *electrospray* (ESI, *Electrospray ionization*) y espectrómetro de masas híbrido con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF, *Quadrupole Time-of-Flight*) TRIPLETOF^T5600 (ABSciex).

3.1.2.4. Punto de fusión

Los puntos de fusión se determinaron en un microscopio de platina calefactora StuartTM *melting point apparatus*, SMP3 de la casa comercial Bibby. Los valores se presentan sin corregir.

3.1.2.5. Cromatografías

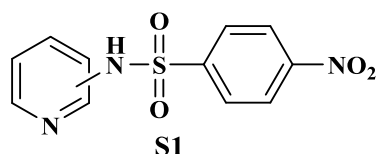
En la cromatografía en capa fina (CCF) analítica se emplearon cromatofolios de 20 x 20 cm de área y 0.2 mm de espesor en gel de sílice o alúmina neutra Merck 60 PF₂₅₄ sobre soporte de poliéster, con indicador fluorescente sensible a $\lambda = 254$ nm. En determinadas ocasiones se utilizó como revelador una solución de ninhidrina al 0.3 % en etanol o una disolución acuosa de CoCl₂ 2.5 % y H₂SO₄ 5%. Las cromatografías en columna se llevaron a cabo en columnas de vidrio utilizando como fase estacionaria gel de sílice o alúmina Merk 60, con un tamaño de partícula de 0.04-0.06 mm (sílice *flash*). Las mezclas de eluyentes empleadas se especifican en los procedimientos de síntesis para cada compuesto según corresponda.

3.1.3. Síntesis de las sulfonamidas S1-S26

Procedimiento General

A una disolución de la amina (20 mmol) en piridina (8 mL) sometida a agitación, se le adicionó lentamente gota a gota una disolución del cloruro de arilsulfonilo correspondiente (30 mmol) en piridina (6 mL). La reacción se llevó a cabo a 0 °C en atmósfera inerte de argón. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 2 horas hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación se vertió sobre agua (100 mL) provocando la precipitación de un sólido que se filtró y recristalizó de MeOH/CH₂Cl₂. Para determinados derivados la purificación se llevó a cabo por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol de polaridad creciente.

A continuación se detallan los rendimientos (Rdto., %), los puntos de fusión (p.f.), los datos espectroscópicos de RMN de ¹H y ¹³C y el análisis de EM-AR de las sulfonamidas sintetizadas.



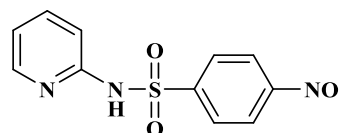
4-Nitro-*N*-(piridin-2-il)benzenosulfonamida (S1a)²

Fórmula Molecular: C₁₁H₉N₃O₄S

PM = 279.273 g/mol

Rdto: 40%

p.f.: 290-294 °C (293-295 °C)³



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.86 (ddd, *J* = 7.2, *J* = 6, *J* = 0.9, 1H), 7.27 (dt, *J* = 9, *J* = 1, 1H), 7.81 (ddd, *J* = 9, *J* = 7.2, *J* = 1.9, 1H), 7.94 (ddd, *J* = 6, *J* = 1.9, *J* = 0.7, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.34 (d, *J* = 8.8, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 114.4 (CH), 115.5 (CH), 124.6 (CH), 128.0 (CH), 140.3 (CH), 142.8 (CH), 149.0 (C), 149.4 (C), 154.6 (C).

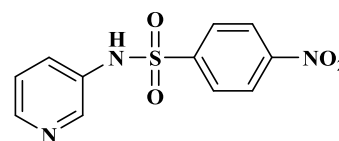
4-Nitro-*N*-(piridin-3-il)benzenosulfonamida (S1b)²

Fórmula Molecular: C₁₁H₉N₃O₄S

PM = 279.273 g/mol

Rdto: 88%

p.f.: 240-243 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.33 (dd, *J* = 8.2, *J* = 4.8, 1H), 7.51 (ddd, *J* = 8.2, *J* = 2.6, *J* = 1.5, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.29-8.32 (m, 2H), 8.37 (d, *J* = 8.8, 2H), 10.9 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 124.5 (CH), 125.2 (CH), 128.6 (CH), 128.7 (CH), 134.0 (C), 142.6 (CH), 144.7 (C), 146.3 (CH), 150.3 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₁H₉N₃O₄S: 279.0313, experimental: 279.0299.

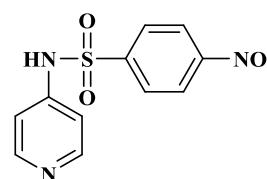
4-Nitro-*N*-(piridin-4-il)benzenosulfonamida (S1c)²

Fórmula molecular: C₁₁H₉N₃O₄S

PM = 279.273 g/mol

Rdto: 63%

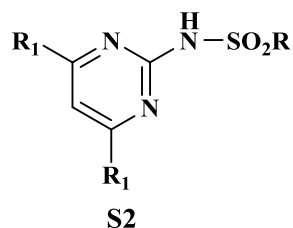
p.f.: 185-186 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.97 (d, *J* = 7.5, 2H), 8.02 (d, *J* = 7.5, 2H), 8.04 (d, *J* = 8.9, 2H), 8.31 (d, *J* = 9, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.4 (CH), 124.5 (CH), 127.8 (CH), 139.4 (C), 139.5 (CH), 149.1 (C), 150.0 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₁H₉N₃O₄S: 279.0313, experimental: 279.0314.



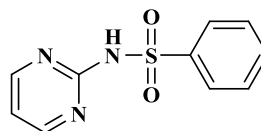
N-(Pirimidin-2-il)bencenosulfonamida (S2a)^{4,2}

Fórmula Molecular: C₁₀H₉N₃O₂S

PM = 235.263 g/mol

Rdto: 97%

p.f.: 227-229 °C (229-230 °C)⁵



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.03 (t, *J* = 4.9, 1H), 7.53-7.56 (m, 3H), 7.96 (dd, *J* = 7.9, *J* = 1.3, 2H), 8.47 (d, *J* = 4.9, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.0 (CH), 127.8 (CH), 129.2 (CH), 133.2 (CH), 140.0 (C), 157.4 (C), 158.6 (CH).

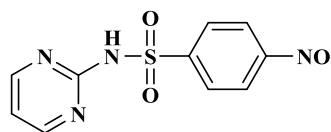
4-Nitro-*N*-(pirimidin-2-il)bencenosulfonamida (S2b)²

Fórmula Molecular: C₁₀H₈N₄O₄S

PM = 280.261 g/mol

Rdto: 68%

p.f.: 274-278 °C (278-280 °C)⁴



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.11 (t, *J* = 4.9, 1H), 8.24 (d, *J* = 9, 2H), 8.43 (d, *J* = 9, 2H), 8.56 (d, *J* = 4.9, 2H), 11.33 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.4 (CH), 124.5 (CH), 129.3 (CH), 146.8 (C), 150.0 (C), 157.9 (C), 158.6 (CH).

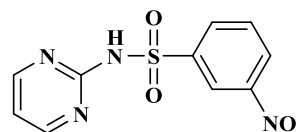
3-Nitro-*N*-(pirimidin-2-il)bencenosulfonamida (S2c)²

Fórmula Molecular: C₁₀H₈N₄O₄S

PM = 280.258 g/mol

Rdto: 50%

p.f.: 217-220 °C (217-219 °C)⁶



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.06 (t, *J* = 4.9, 1H), 7.89 (t, *J* = 8.1, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.52 (d, *J* = 4.9, 2H), 8.70 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 114.9 (CH), 122.7 (CH), 127.3 (CH), 131.1 (CH), 133.8 (CH), 143.4 (C), 147.9 (C), 157.4 (C), 158.5 (CH).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₀H₉N₄O₄S: 281.0344, experimental: 281.0356.

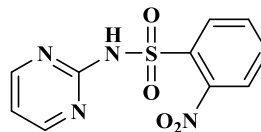
2-Nitro-*N*-(pirimidin-2-il)bencenosulfonamida (S2d)²

Fórmula Molecular: C₁₀H₈N₄O₄S

PM = 280.261 g/mol

Rdto: 93%

p.f.: 137-139 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.98 (t, *J* = 4.8, 1H), 7.24 (td, *J* = 8.4, *J* = 1.3, 1H), 7.71 (td, *J* = 8.4, *J* = 1.5, 1H), 8.05 (dd, *J* = 8.4, *J* = 1.5, 1H), 8.17 (dd, *J* = 8.4, *J* = 1.3, 1H), 8.51 (d, *J* = 4.8, 2H), 10.11 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 114.6 (CH), 123.0 (CH), 123.6 (CH), 125.8 (CH), 130.9 (C), 135.0 (CH), 139.7 (C), 158.5 (CH), 159.3 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₀H₉N₄O₄S: 281.0344, experimental: 281.0339.

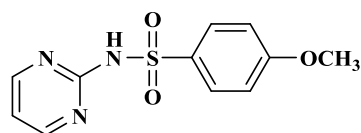
4-Metoxi-*N*-(pirimidin-2-il)bencenosulfonamida (S2e)^{4,2}

Fórmula Molecular: C₁₁H₁₁N₃O₃S

PM = 265.289 g/mol

Rdto: 90 %

p.f.: 193-195 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.78 (s, 3H), 7.03 (t, *J* = 4.8, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.9, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.9, 2H), 8.49 (d, *J* = 4.8, 2H), 11.62 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 56.0 (OCH₃), 114.3 (CH), 116.1 (CH), 130.2 (CH), 132.2 (C), 157.8 (C), 158.7 (CH), 162.8 (C).

EM-AR (FAB⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₁H₁₂N₃O₃S: 266.0599, experimental: 266.0607.

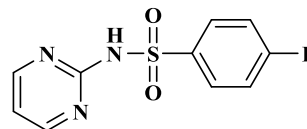
4-Fluoro-*N*-(pirimidin-2-il)bencenosulfonamida (S2f)²

Fórmula Molecular: C₁₀H₈FN₃O₂S

PM = 253.254 g/mol

Rdto: 80%

p.f.: 183-186 °C (184.5-185 °C)⁷



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.05 (t, *J* = 4.9, 1H), 7.41 (t, *J* = 9.0, 2H), 8.03 (dd, *J* = 9.0, *J* = 5.0, 2H), 8.50 (d, *J* = 4.9, 2H), 11.0 (s, 1H, NH).

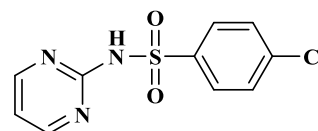
4-Cloro-*N*-(pirimidin-2-il)bencenosulfonamida (S2g)²

Fórmula Molecular: C₁₀H₈ClN₃O₂S

PM = 269.708 g/mol

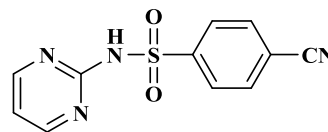
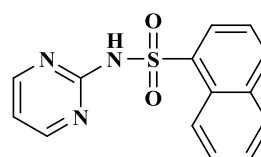
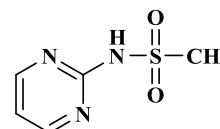
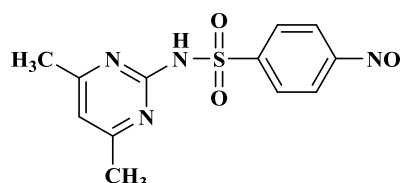
Rdto: 80%

p.f.: 199-202 °C (203-204 °C)⁸



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.06 (t, *J* = 4.9, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.1, 2H), 7.98 (d, *J* = 8.1, 2H), 8.51 (d, *J* = 4.9, 2H), 12.03 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.1 (CH), 129.4 (CH), 129.8 (CH), 138.1 (C), 139.7 (C), 157.0 (C), 158.7 (CH).

4-Ciano-*N*-(pirimidin-2-il)bencenosulfonamida (S2h)**Fórmula Molecular:** C₁₁H₈N₄O₂S**PM** = 260.273 g/mol**Rdto:** 40%**p.f.:** 132-133 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.05 (t, *J* = 5, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.7, 2H), 8.11 (d, *J* = 8.7, 2H), 8.50 (d, *J* = 5, 2H).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.4 (CH), 118.1 (C), 126.8 (CN), 128.5 (CH), 133.4 (CH), 145.4 (C), 156.8 (C), 158.6 (CH).**EM-AR (EI⁺):** *m/z* [M+H] calculado para C₁₁H₉N₄O₂S: 261.0446, experimental: 261.0450.***N*-(pirimidin-2-il)naftalenosulfonamida (S2i)****Fórmula Molecular:** C₁₄H₁₁N₃O₂S**PM** = 285.322 g/mol**Rdto:** 40%**p.f.:** 199-202 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.93 (t, *J* = 5, 1H), 7.58-7.80 (m, 3H), 8.05 (d, *J* = 7.5, 1H), 8.22 (d, *J* = 8, 1H), 8.38-8.43 (m, 3H), 8.77 (d, *J* = 8, 1H).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.7 (CH), 124.6 (CH), 124.7 (CH), 127.1 (CH), 127.8 (C), 128.4 (CH), 129.3 (CH), 131.4 (CH), 133.9 (C), 134.6 (CH), 135.3 (C), 157.2 (C), 158.6 (CH).**EM-AR (EI⁺):** *m/z* [M + H] calculado para C₁₄H₁₂N₃O₂S: 286.0650, experimental: 286.0647.***N*-(pirimidin-2-il)metanosulfonamida (S2j)⁴****Fórmula Molecular:** C₅H₇N₃O₂S**PM** = 173.194 g/mol**Rdto:** 64 %**p.f.:** 240-244 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.36 (s, 3H), 7.13 (t, *J* = 4.9, 1H), 8.61 (d, *J* = 4.9, 2H), 11.33 (s.a, 1H, NH).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 41.6 (CH₃), 116.1 (CH), 157.9 (C), 158.9 (CH).**EM-AR (EI⁺):** *m/z* calculado para C₅H₇N₃O₂S: 173.0258, experimental: 173.0258.***N*-(4,6-dimetil-pirimidin-2-il)-4-nitrobencenosulfonamida (S2k)²****Fórmula Molecular:** C₁₂H₁₂N₄O₄S**PM** = 308.314 g/mol**Rdto:** 65%**p.f.:** 218-220 °C (215 °C)⁹**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.25 (s, 6H), 6.72 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.35 (d, *J* = 8.8, 2H).

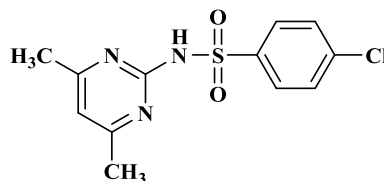
4-Cloro-*N*-(4,6-dimetil-pirimidin-2-il)bencenosulfonamida (S2I)²

Fórmula Molecular: C₁₂H₁₂ClN₃O₂S

PM = 297.761 g/mol

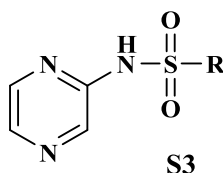
Rdto: 54%

p.f.: 185-187 °C (181-182 °C)¹⁰



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.25 (s, 6H), 6.75 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.5, 2H), 7.96 (d, *J* = 8.5, 2H), 12.14 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.9 (CH₃), 113.1 (CH), 128.8 (CH), 130.2 (C), 130.4 (CH), 137.4 (C), 140.5 (C), 156.2 (C).



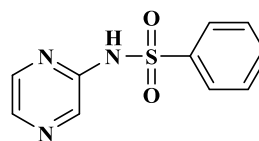
N-(pirazin-2-il)bencenosulfonamida (S3a)²

Fórmula Molecular: C₁₀H₉N₃O₂S

PM = 235.263 g/mol

Rdto: 70%

p.f.: 204-208 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.59 (d, *J* = 6.8, 1H), 7.61 (d, *J* = 6.8, 2H), 7.93 (d, *J* = 6.8, 2H), 8.21-8.22 (m, 2H), 8.35 (d, *J* = 1.3, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 127.4 (CH), 129.6 (CH), 133.6 (CH), 135.2 (CH), 139.2 (CH), 140.2 (C), 142.4 (CH), 148.4 (C).

EM-AR (FAB⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₀H₁₀N₃O₂S: 236.0493, experimental: 236.0495.

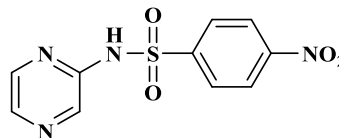
4-Nitro-*N*-(pirazin-2-il)bencenosulfonamida (S3b)²

Fórmula Molecular: C₁₀H₈N₄O₄S

PM = 279.273 g/mol

Rdto: 86%

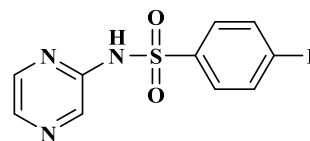
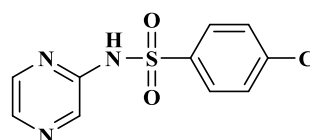
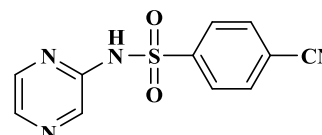
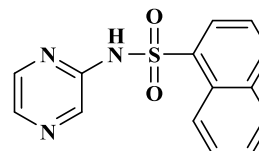
p.f.: 233-237 °C

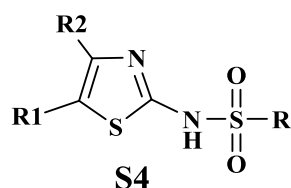


RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.16-8.20 (m, 4H), 8.38-8.41 (m, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 124.9 (CH), 129.2 (CH), 133.7 (CH), 139.5 (CH), 142.1 (CH), 145.8 (C), 148.1 (C), 150.3 (C).

EM-AR (FAB⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₀H₉N₄O₄S: 281.0344, experimental: 281.0351.

4-Fluoro-*N*-(pirazin-2-il)benzenosulfonamida (S3c)**Fórmula Molecular:** C₁₀H₈FN₃O₂S**PM** = 253.254 g/mol**Rdto:** 52%**p.f.:** 212-215 °C (180-181 °C)¹¹**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.42 (t, *J* = 9, 2H), 8.03 (dd, *J* = 9, *J* = 5.3, 2H), 8.22 (dd, *J* = 2.6, *J* = 1.3, 1H), 8.23 (d, *J* = 2.6, 1H), 8.36 (d, *J* = 1.3, 1H).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.6 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 130.7 (d, *J*_{C-F} = 9.75, CH), 135.3 (CH), 136.6 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 139.3 (CH), 142.4 (CH), 148.3 (C), 165.0 (d, *J*_{C-F} = 250.5, C).**4-Cloro-*N*-(pirazin-2-il)benzenosulfonamida (S3d)²****Fórmula Molecular:** C₁₀H₈ClN₃O₂S**PM** = 269.708 g/mol**Rdto:** 40%**p.f.:** 190-193 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.67 (d, *J* = 8.5, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.5, 2H), 8.22 (dd, *J* = 2.8, *J* = 1.5, 1H), 8.25 (d, *J* = 2.8, 1H), 8.60 (d, *J* = 1.5, 1H).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 129.5 (CH), 129.7 (CH), 135.5 (CH), 138.4 (C), 139.2 (CH), 139.3 (C), 142.3 (CH), 148.4 (C).**EM-AR (FAB⁺):** *m/z* [M + H] calculado para C₁₀H₉ClN₃O₂S: 270.0104, experimental: 270.0107.**4-Ciano-*N*-(pirazin-2-il)benzenosulfonamida (S3e)****Fórmula Molecular:** C₁₁H₈N₄O₂S**PM** = 260.273 g/mol**Rdto:** 20%**p.f.:** 107-110 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.08 (d, *J* = 8.3, 2H), 8.10 (d, *J* = 8.3, 2H), 8.15 (d, *J* = 2.7, 1H), 8.21 (d, *J* = 2.7, 1H), 8.35 (s, 1H).**EM-AR (ESI⁺):** *m/z* [M + H] calculado para C₁₁H₉N₄O₂S: 261.0446, experimental: 261.0446.***N*-(pirazin-2-il)naftalenosulfonamida (S3f)****Fórmula Molecular:** C₁₄H₁₁N₃O₂S**PM** = 285.322 g/mol**Rdto:** 99%**p.f.:** 207-210 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.62-7.77 (m, 3H), 8.06-8.13 (m, 3H), 8.25 (d, *J* = 8.2, 1H), 8.33 (d, *J* = 1.3, 1H), 8.4 (dd, *J* = 7.4, *J* = 1.1, 1H), 8.7 (d, *J* = 8.2, 1H).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 124.3 (CH), 124.9 (CH), 127.3 (CH), 127.6 (C), 128.7 (CH), 129.5 (CH), 131.0 (CH), 134.0 (C), 134.7 (CH), 134.8 (C), 135.1 (CH), 138.8 (CH), 142.2 (CH), 148.4 (C).**EM-AR (ESI⁺):** *m/z* [M+H] calculado para C₁₄H₁₂N₃O₂S: 286.0650, experimental: 286.0648.



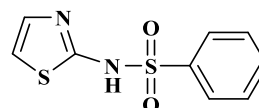
N-(tiazol-2-il)benzenosulfonamida (S4a)

Fórmula Molecular: C₉H₈N₂O₂S₂

PM = 240.304 g/mol

Rdto: 57%

p.f.: 167-170 °C (171.5-172.5 °C)¹²



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.83 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.45-7.62 (m, 3H), 7.75-7.90 (m, 2H), 12.76 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 108.6 (CH), 124.8 (CH), 126.1 (CH), 129.3 (CH), 132.4 (CH), 142.7 (C), 169.3 (C).

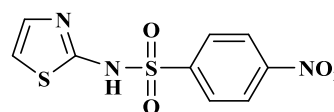
4-Nitro-*N*-(tiazol-2-il)benzenosulfonamida (S4b)²

Fórmula Molecular: C₉H₇N₃O₄S₂

PM = 285.302 g/mol

Rdto: 90%

p.f.: 263-265 °C (260-261 °C)¹³



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.95 (d, *J* = 3.3, 1H), 7.30 (d, *J* = 3.3, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.5, 2H), 8.40 (d, *J* = 8.5, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 109.4 (CH), 124.8 (CH), 125.2 (CH), 127.6 (CH), 148.1 (C), 149.6 (C), 169.7 (C).

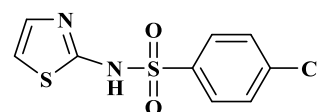
4-Cloro-*N*-(tiazol-2-il)benzenosulfonamida (S4c)²

Fórmula Molecular: C₉H₇ClN₂O₂S₂

PM = 274.749 g/mol

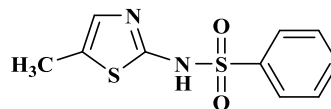
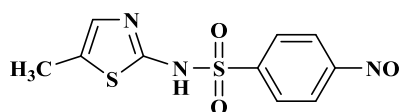
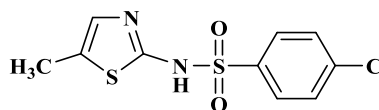
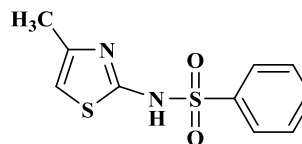
Rdto: 90%

p.f.: 198-200°C (201-202 °C)⁸



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.80 (d, *J* = 3.3, 1H), 7.25 (d, *J* = 3.3, 1H), 7.6 (d, *J* = 8.5, 2H), 8.80 (d, *J* = 8.5, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 109.0 (CH), 125.0 (CH), 128.0 (CH), 129.4 (CH), 137.1 (C), 141.6 (C), 169.4 (C).

N*-(5-metiltiazol-2-il)bencenosulfonamida (S4d)²*Fórmula Molecular:** C₁₀H₁₀N₂O₂S₂**PM** = 254.331 g/mol**Rdto:** 40%**p.f.:** 149.1-152 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.15 (s, 3H), 6.46 (s, 1H), 7.50-7.61 (m, 3H), 7.85 (d, *J* = 8.3, 2H).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.7 (CH₃), 102.6 (CH), 116.4 (C), 126.1 (CH), 129.2 (CH), 132.2 (CH), 135.0 (C), 165.8 (C).***N*-(4-nitro-5-metiltiazol-2-il)bencenosulfonamida (S4e)²****Fórmula Molecular:** C₁₀H₉N₃O₄S₂**PM** = 299.328 g/mol**Rdto:** 88%**p.f.:** 235-240 °C (255 °C)¹⁴**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.17 (s, 3H), 7.05 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.5, 2H), 8.35 (d, *J* = 8.5, 2H).***N*-(4-cloro-5-metiltiazol-2-il)bencenosulfonamida (S4f)²****Fórmula Molecular:** C₁₀H₉ClN₂O₂S₂**PM** = 288.775 g/mol**Rdto:** 50%**p.f.:** 102-104 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.06 (s, 3H), 6.33 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.5, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.5, 2H).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.4 (CH₃), 120.7 (CH), 121.1 (C), 128.0 (CH), 129.4 (CH), 137.1 (C), 141.7 (C), 168.5 (C).**EM-AR (EI⁺):** *m/z* [M+H] calculado para C₁₀H₉ClN₂O₂S₂: 287.9793, experimental: 287.9794.***N*-(4-metiltiazol-2-il)bencenosulfonamida (S4g)²****Fórmula Molecular:** C₁₀H₁₀N₂O₂S₂**PM** = 254.331 g/mol**Rdto:** 30%**p.f.:** 152-153 °C (mp 161-162 °C)¹⁵**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.15 (s, 3H), 6.46 (s, 1H), 7.56-7.70 (m, 3H), 7.86 (dd, *J* = 1.7, *J* = 8.3, 2H).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.7 (CH₃), 102.6 (CH), 116.4 (C), 126.1 (CH), 129.2 (CH), 132.2 (CH), 135.0 (C), 168.0 (C).

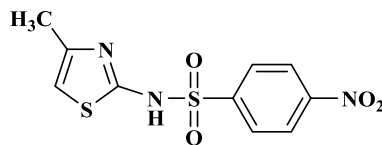
***N*-(4-metiltiazol-2-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S4h)²**

Fórmula Molecular: C₁₀H₉N₃O₄S₂

PM = 299.328 g/mol

Rdto: 70%

p.f.: 189-193°C (197-199 °C)¹⁶



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.10 (s, 3H), 6.45 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.5, 2H), 8.37 (d, *J* = 8.5, 2H).

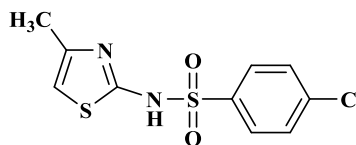
4-Cloro-*N*-(4-metiltiazol-2-il)benzenosulfonamida (S4i)

Fórmula Molecular: C₁₀H₉ClN₂O₂S₂

PM = 288,775 g/mol

Rdto: 50%

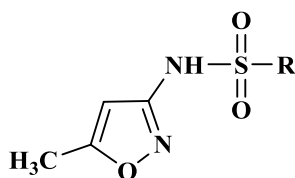
p.f.: 106-108 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.06 (s, 3H), 6.33 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.7, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.6 (CH₃), 102.9 (CH), 128.1 (CH), 129.4 (CH), 134.3 (C), 137.1 (C), 148.6 (C).168.0 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₀H₉ClN₂O₂S₂: 287.9793, experimental: 287.9794.



S5

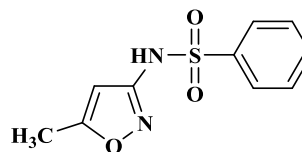
***N*-(5-metilisoxazol-3-il)benzenosulfonamida (S5a)²**

Fórmula Molecular: C₁₀H₁₀N₂O₃S

PM = 238.264 g/mol

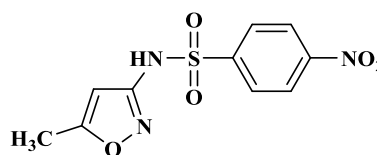
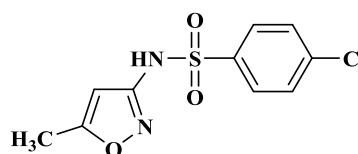
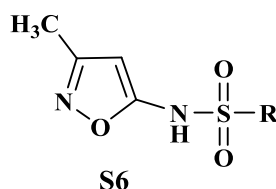
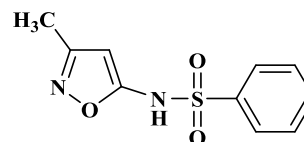
Rdto: 90%

p.f.: 105-108 °C ¹⁷



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.29 (s, 3H), 6.14 (s, 1H), 7.58-7.74 (m, 3H), 7.87 (d, *J* = 8.2, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.4 (CH₃), 95.7 (CH), 127.0 (CH), 129.8 (CH), 133.8 (CH), 139.7 (C), 157.6 (C), 171.0 (C).

N*-(5-metilisoxazol-3-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S5b)²*Fórmula Molecular:** C₁₀H₉N₃O₅S**PM** = 283.262 g/mol**Rdto:** 90%**p.f.:** 194-195 °C¹⁸**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.29 (s, 3H), 6.16 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 9.2, 2H), 8.42 (d, *J* = 9.2, 2H).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.4 (CH₃), 95.8 (CH), 125.2 (CH), 128.8 (CH), 144.9 (C), 149.5 (C), 157.4 (C), 171.0 (C).***N*-(5-metilisoxazol-3-il)benzenosulfonamida (S5c)²****Fórmula Molecular:** C₁₀H₉ClN₂O₃S**PM** = 272.709 g/mol**Rdto:** 60%**p.f.:** 158.5-159.9 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.29 (s, 3H), 6.14 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.8, 2H), 7.85 (d, *J* = 8.8, 2H), 11.5 (s.a, 1H, NH).**RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.4 (CH₃), 95.8 (CH), 129.0 (CH), 129.9 (CH), 138.6 (C), 138.7 (C), 157.6 (C), 171.0 (C).**EM-AR (EI⁺):** *m/z* calculado para C₁₀H₉ClN₂O₃S: 272.0022, experimental: 272.0019.***N*-(3-metilisoxazol-5-il)benzenosulfonamida (S6a)****Fórmula Molecular:** C₁₀H₁₀N₂O₃S**PM** = 238.264 g/mol**Rdto:** 80%**p.f.:** 146-152 °C**RMN ¹H** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.95 (s, 3H), 5.74 (s, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.6, 2H), 7.70 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.6, 2H).

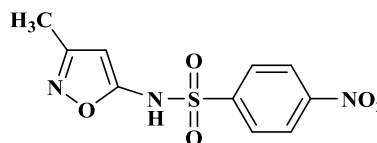
***N*-(3-metilisoxazol-5-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S6b)**

Fórmula Molecular: C₁₀H₉N₃O₅S

PM = 283.262 g/mol

Rdto: 54%

p.f.: 148-153 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.03 (s, 3H), 5.49 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 9.1, 2H), 8.35 (d, *J* = 9.1, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.8 (CH₃), 86.9 (CH), 124.8 (CH), 128.3 (CH), 147.5 (C), 149.7 (C), 160.8 (C), 165.2 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₀H₉N₃O₅S: 283.0262, experimental: 283.0264.

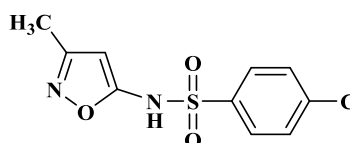
***N*-(3-metilisoxazol-5-il)benzenosulfonamida (S6c)**

Fórmula Molecular: C₁₀H₉ClN₂O₃S

PM = 272.709 g/mol

Rdto: 45%

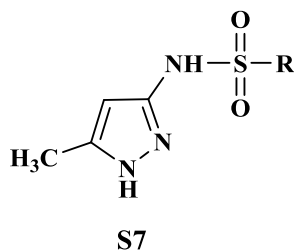
p.f.: 158-160 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.29 (s, 3H), 6.14 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.8, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.8, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.4 (CH₃), 95.8 (CH), 129.0 (CH), 129.9 (CH), 138.6 (C), 138.7 (C), 157.6 (C), 170.9 (C).

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₀H₁₀ClN₂O₃S: 273.0101, experimental: 273.0105.



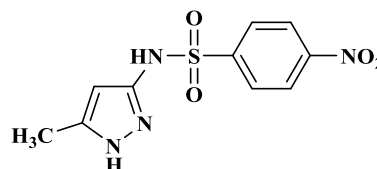
***N*-(5-metil-1*H*-pirazol-3-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S7a)²**

Fórmula Molecular: C₁₀H₁₀N₄O₄S

PM = 282.277 g/mol

Rdto: 95%

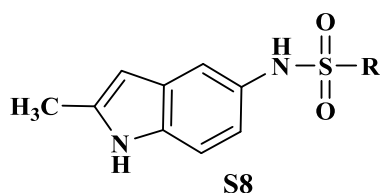
p.f.: 167-171 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.94 (s, 3H), 5.15 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.40 (d, *J* = 8.8, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 14.2 (CH₃), 89.4 (CH), 125.3 (CH), 129.1 (CH), 142.3 (C), 146.0 (C), 152.6 (C), 152.8 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₀H₁₀N₄O₄S: 282.0422, experimental: 282.0423.



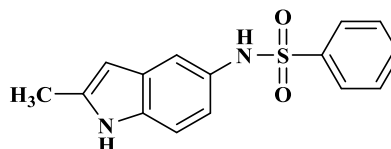
***N*-(2-metil-1*H*-indol-5-il)bencenosulfonamida (S8a)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₄N₂O₂S

PM = 286.350 g/mol

Rdto: 84%

p.f.: 182-184 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.31 (s, 3H), 6.00 (s, 1H), 6.71 (dd, *J* = 8.5, *J* = 2, 1H), 7.06 (d, *J* = 2, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.5, 1H), 7.47-7.66 (m, 3H), 7.65 (d, *J* = 7.2, 2H), 9.72 (s, 1H, NH), 10.85 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.7 (CH₃), 99.5 (CH), 110.9 (CH), 113.4 (CH), 116.4 (CH), 124.3 (C), 127.0 (CH), 128.9 (C), 129.3 (CH), 132.7 (CH), 134.2 (C), 137.0 (C), 140.1 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₄N₂O₂S: C, 61.94; H, 5.02; N, 9.63; S, 11.02, experimental: C, 62.22; H, 4.89; N, 9.23; S, 10.66.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₅N₂O₂S: 287.0854, experimental: 287.0844.

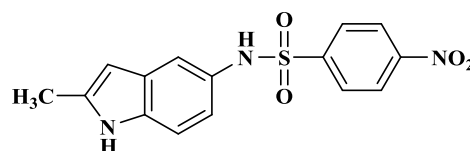
***N*-(2-metil-1*H*-indol-5-il)bencenosulfonamida (S8b)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₃N₃O₄S

PM = 331.347 g/mol

Rdto: 94%

p.f.: 184-186 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.31 (s, 3H), 6.02 (s, 1H), 6.69 (dd, *J* = 8.5, *J* = 2, 1H), 7.08-7.15 (m, 2H), 7.88 (d, *J* = 9, 2H), 8.32 (d, *J* = 9, 2H), 10.08 (s.a, 1H, NH), 10.91 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.7 (CH₃), 99.6 (CH), 111.1 (CH), 114.0 (CH), 116.7 (CH), 124.7 (CH), 128.0 (C), 128.7 (CH), 129.0 (C), 134.4 (C), 137.3 (C), 145.5 (C), 149.9 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₃N₃O₄S: C, 54.37; H, 3.95; N, 12.68; S, 9.68; experimental: C, 54.52; H, 4.21; N, 12.35; S, 9.47.

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₅H₁₃N₃O₄S: 331.0626, experimental: 331.0623.

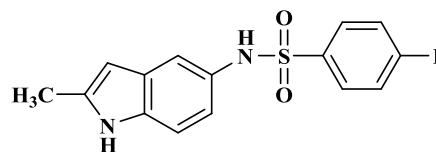
4-Fluoro-*N*-(2-metil-1*H*-indol-5-il)bencenosulfonamida (S8c)

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₃FN₂O₂S

PM = 304.340 g/mol

Rdto: 92%

p.f.: 155-157 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.50 (s, 3H), 6.01 (s, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.7, *J* = 2, 1H), 7.06 (d, *J* = 2, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.33 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.68 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.1, 2H), 9.74 (s, 1H, NH), 10.86 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.7 (CH₃), 99.5 (CH), 111.0 (CH), 113.7 (CH), 116.3 (CH), 116.6 (d, *J*_{C-F} = 18, CH), 124.5 (C), 128.7 (C), 130.1 (d, *J*_{C-F} = 9.75, CH), 134.3 (C), 136.3 (C), 137.1 (C), 162 (d, *J*_{C-F} = 260, C).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₃FN₂O₂S(H₂O)_{0.3}: C, 58.16; H, 4.42; N, 9.04; S, 10.35, experimental: C, 58.10; H, 4.34; N, 9.16; S, 10.22.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₄FN₂O₂S: 305.0760, experimental: 305.0766

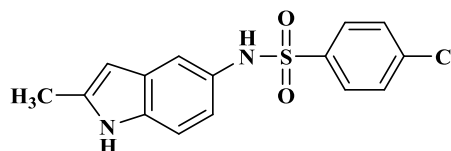
4-Cloro-*N*-(2-metil-1*H*-indol-5-il)bencenosulfonamida (S8d)

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₃ClN₂O₂S

PM = 320.795 g/mol

Rdto: 87%

p.f.: 188-190 °C

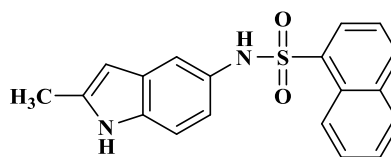


RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.39 (s, 3H), 6.20 (s, 1H), 6.95 (dd, *J* = 8.7, *J* = 2, 1H), 7.06 (d, *J* = 2, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.8, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.8, 2H), 9.8 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.7 (CH₃), 99.5 (CH), 111.0 (CH), 113.7 (CH), 116.5 (CH), 128.6 (C), 129.0 (CH), 129.5 (CH), 134.3 (2C), 137.1 (C), 137.7 (C), 138.9 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₃ClN₂O₂S(H₂O)_{0.4}: C, 54.93; H, 4.24; N, 8.54; S, 9.78; experimental: C, 54.70; H, 3.94; N, 8.78; S, 9.51.

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₄ClN₂O₂S 321.0459, experimental: 321.0459.

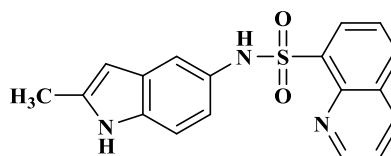
N*-(2-metil-1*H*-indol-5-il)naftalenosulfonamida (S8e)*Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₆N₂O₂S**PM** = 336.409 g/mol**Rdto:** 44%**p.f.:** 189-190 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.27 (s, 3H), 5.92 (s, 1H), 6.59 (dd, *J* = 8.7, *J* = 2, 1H), 6.96-7.01 (m, 2H), 7.50 (t, *J* = 8.1, 1H), 7.66 (td, *J* = 7, *J* = 1.3, 1H), 7.71 (td, *J* = 7, *J* = 1.5, 1H), 8.01-8.06 (m, 2H), 8.13 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.80 (d, *J* = 8.7, 1H), 10.10 (s, 1H, NH), 10.78 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.7 (CH₃), 99.4 (CH), 110.9 (CH), 112.8 (CH), 115.9 (CH), 124.7 (CH), 125.0 (CH), 127.1 (CH), 128.0 (C), 128.2 (CH), 128.7 (C), 128.9 (C), 129.3 (CH), 130.0 (CH), 134.0 (C), 134.2 (CH), 135.2 (C), 137.0 (C), 145.7 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₉H₁₆N₂O₂S: C, 67.83; H, 4.79; N, 8.33; S, 9.53, experimental: C, 67.96; H, 5.12; N, 8.15; S, 9.32.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₉H₁₇N₂O₂S: 337.1011, experimental: 337.1013.

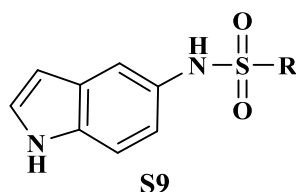
N*-(2-metil-1*H*-indol-5-il)-quinolil-8-sulfonamida (S8f)*Fórmula Molecular:** C₁₈H₁₅N₃O₂S**PM** = 337.397 g/mol**Rdto:** 58%**p.f.:** 192-194 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.25 (s, 3H), 5.88 (s, 1H), 6.60 (dd, *J* = 8.6, *J* = 2, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.6, 1H), 6.98 (d, *J* = 2, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.7, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.4, *J* = 4.2, 1H), 8.19 (dd, *J* = 7.7, *J* = 1.4, 1H), 8.21 (dd, *J* = 7.7, *J* = 1.4, 1H), 8.52 (dd, *J* = 8.4, *J* = 1.7, 1H), 9.21 (dd, *J* = 4.2, *J* = 1.7, 1H), 9.39 (s.a, 1H, NH), 10.76 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.6 (CH₃), 99.3 (CH), 110.6 (CH), 113.0 (CH), 116.1 (CH), 122.9 (CH), 126.0 (CH), 128.4 (C), 128.7 (C), 129.1 (C), 132.0 (CH), 134.0 (C), 134.1 (CH), 135.8 (C), 136.9 (C), 137.4 (CH), 143.4 (C), 151.7 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₁₈H₁₅N₃O₂S: C, 64.08; H, 4.48; N, 12.45; S, 9.50, experimental: C, 63.97; H, 4.64; N, 12.01; S, 9.12.

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₈H₁₆N₃O₂S: 338.0958, experimental: 338.0934.



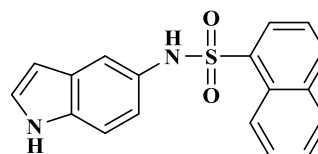
***N*-(1*H*-indol-5-il)naftalenosulfonamida (S9a)**

Fórmula Molecular: C₁₈H₁₄N₂O₂S

PM = 322.382 g/mol

Rdto: 56%

p.f.: 107-108 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.26-6.30 (m, 1H), 6.76 (dd, *J* = 8.6, *J* = 2, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.6, 1H), 7.21 (d, *J* = 2, 1H), 7.26 (t, *J* = 2.7, 1H), 7.51 (t, *J* = 7.8, 1H), 7.64 (td, *J* = 8.6, *J* = 1, 1H), 7.74 (td, *J* = 8.6, *J* = 1.4, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.8, 1H), 8.09-8.14 (m, 2H), 8.87 (d, *J* = 8.6, 1H), 10.22 (s, 1H, NH), 11.01 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 101.4 (CH), 111.9 (CH), 113.6 (CH), 117.0 (CH), 124.7 (CH), 125.0 (CH), 126.6 (CH), 127.2 (CH), 127.9 (C), 128.1 (C), 128.2 (C), 129.0 (CH), 129.3 (CH), 130.0 (CH), 133.9 (C), 134.0 (C), 134.3 (CH), 135.2 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₈H₁₄N₂O₂S: C, 67.06; H, 4.38; N, 8.69; S, 9.94, experimental: C, 66.86; H, 4.65; N, 8.48; S, 9.59.

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₈H₁₅N₂O₂S: 323.0849, experimental: 323.0826.

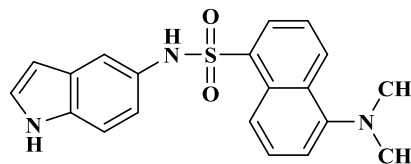
5-(Dimetilamino)-*N*-(1*H*-indol-5-il)naftalenosulfonamida (S9b)

Fórmula Molecular: C₂₀H₁₉N₃O₂S

PM = 365.450 g/mol

Rdto: 74%

p.f.: 118-121 °C

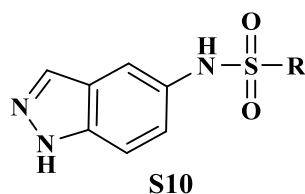


RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.49 (s, 6H), 6.24-6.25 (m, 1H), 6.73 (dd, *J* = 8.6, *J* = 2.1, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.6, 1H), 7.15 (d, *J* = 2, 1H), 7.23-7.26 (m, 2H), 7.49 (dd, *J* = 8.6, *J* = 7.4, 1H), 7.61 (dd, *J* = 8.6, *J* = 7.4, 1H), 8.05 (dd, *J* = 7.3, *J* = 1.1, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.6, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.6, 1H), 10.13 (s, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.4 (CH₃), 101.3 (CH), 111.9 (CH), 113.2 (CH), 115.5 (CH), 116.7 (CH), 119.4 (CH), 123.8 (CH), 126.6 (CH), 127.9 (C), 128.2 (CH), 129.1 (C), 129.2 (C), 129.6 (C), 129.9 (CH), 130.0 (CH), 133.7 (C), 135.7 (C), 151.7 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₀H₁₉N₃O₂S: C, 65.73; H, 5.24; N, 11.50; S, 8.77, experimental: C, 65.52; H, 5.35; N, 11.27; S, 8.60.

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₂₀H₂₀N₃O₂S: 366.1271, experimental: 366.1248.



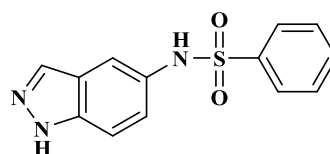
N-(1*H*-indazol-5-il)benzenosulfonamida (S10a)

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₁N₃O₂S

PM = 273.311 g/mol

Rdto: 78%

p.f.: 166-168 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.10 (dd, *J* = 9, *J* = 2, 1H), 7.35-7.45 (m, 2H), 7.46-7.65 (m, 3H), 7.69 (dd, *J* = 7, *J* = 1.7, 2H), 7.99 (s, 1H), 10.07 (s, 1H, NH), 13.02 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.0 (CH), 113.2 (CH), 122.6 (CH), 123.1 (C), 127.0 (CH), 129.4 (CH), 130.5 (C), 133.0 (CH), 133.8 (CH), 138.0 (C), 139.7 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₃H₁₁N₃O₂S: C, 57.13; H, 4.06; N, 15.37; S, 11.73, experimental: C, 57.28; H, 4.33; N, 15.09; S, 11.65.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₃H₁₂N₃O₂S: 274.0650, experimental: 274.0645.

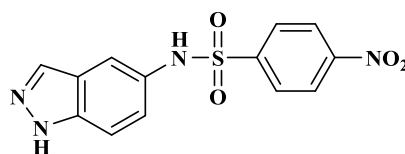
N-(1*H*-indazol-5-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S10b)²

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₀N₄O₄S

PM = 318.309 g/mol

Rdto: 73%

p.f.: 234-236 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.08 (d, *J* = 8.8, 1H), 7.40-7.50 (m, 2H), 7.93 (d, *J* = 8.7, 2H), 8.00 (s, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.7, 2H), 10.5 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.2 (CH), 114.1 (CH), 122.9 (CH), 123.2 (C), 124.9 (CH), 128.7 (CH), 129.6 (C), 133.9 (CH), 138.2 (C), 145.1 (C), 150.0 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₃H₁₀N₄O₄S: 318.0422, experimental: 318.0429.

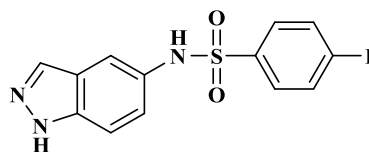
4-Fluoro-*N*-(1*H*-indazol-5-il)benzenosulfonamida (S10c)

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₀FN₃O₂S

PM = 291.302 g/mol

Rdto: 89%

p.f.: 214-218 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.06 (dd, *J* = 9, *J* = 2, 1H), 7.32 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.41 (d, *J* = 2, 1H), 7.42 (d, *J* = 9, 1H), 7.73 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.2, 2H), 7.99 (s, 1H), 10.0 (s.a, 1H, NH), 13.1 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.1 (CH), 113.6 (CH), 116.5 (d, *J*_{C-F} = 18, CH), 122.8 (CH), 123.2 (C), 130.0 (d, *J*_{C-F} = 6, CH), 130.3 (C), 133.8 (CH), 136.0 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 138.1 (C), 164.5 (d, *J*_{C-F} = 250, C).

Análisis elemental: calculado para C₁₃H₁₀FN₃O₂S: C, 53.60; H, 3.46; N, 14.42; S, 11.01, experimental: C, 53.61; H, 3.30; N, 14.49; S, 10.63.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₃H₁₁FN₃O₂S: 292.0556, experimental: 292.0559.

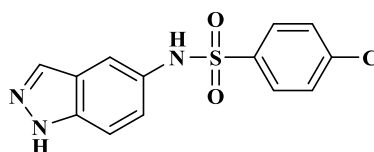
4-Cloro-*N*-(1*H*-indazol-5-il)benzenosulfonamida (S10d)¹⁹

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₀ClN₃O₂S

PM = 307.756 g/mol

Rdto: 20%

p.f.: 171-173 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.71-6.85 (m, 4H), 7.25 (dd, *J* = 8.8, *J* = 0.9, 2H), 7.72-7.75 (m, 2H), 12.57 (s.a, 1H, NH), 13.06 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 100.9 (CH), 110.6 (CH), 118.5 (CH), 124.2 (C), 129.0 (CH), 129.6 (CH), 131.7 (CH), 135.0 (C), 137.9 (C), 138.6 (C), 142.4 (C).

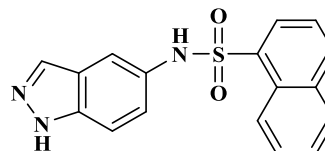
N-(1*H*-indazol-5-il)naftalenosulfonamida (S10e)

Fórmula Molecular: C₁₇H₁₃N₃O₂S

PM = 323.370 g/mol

Rdto: 91%

p.f.: 196-199 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.98 (dd, *J* = 9, *J* = 2, 1H), 7.30-7.34 (m, 2H), 7.53 (t, *J* = 7.8, 1H), 7.63-7.68 (m, 2H), 7.91 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.8, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.3, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.4, 1H), 8.77 (d, *J* = 8.4, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.1 (CH), 112.3 (CH), 121.9 (CH), 123.1 (C), 124.7 (CH), 124.8 (CH), 127.3 (CH), 127.9 (C), 128.4 (CH), 129.4 (CH), 130.1 (CH), 130.3 (C), 133.7 (CH), 134.0 (C), 134.5 (CH), 134.8 (C), 137.8 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₇H₁₃N₃O₂S: C, 63.14; H, 4.05; N, 12.99; S, 9.92, experimental: C, 63.30; H, 4.39; N, 13.20; S, 9.53.

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₇H₁₄N₃O₂S: 324.0801, experimental: 324.0808.



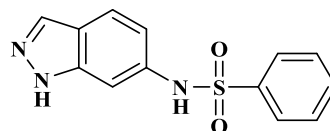
N-(1*H*-indazol-6-il)benzenosulfonamida (S11a)

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₁N₃O₂S

PM = 273.311 g/mol

Rdto: 93%

p.f.: 180-184 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.91 (dd, *J* = 8.6, *J* = 2, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.48-7.58 (m, 3H), 7.60 (d, *J* = 8.6, 1H), 7.78 (dd, *J* = 8.1, *J* = 1.5, 2H), 7.94 (s, 1H), 10.43 (s.a, 1H, NH), 12.87 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 100.4 (CH), 115.2 (CH), 120.2 (C), 121.6 (CH), 127.0 (CH), 129.6 (CH), 133.3 (CH), 133.8 (CH), 136.4 (C), 139.8 (C), 140.5 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₃H₁₁N₃O₂S: C, 56.02; H, 4.19; N, 15.08; S, 11.50, experimental: C, 56.01; H, 4.46; N, 14.80; S, 11.52.

EM-AR (TOF⁺): m/z [M + H] calculado para C₁₃H₁₂N₃O₂S: 274.0645, experimental: 274.0645.

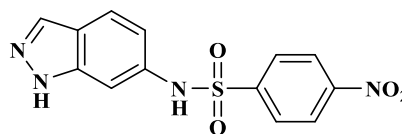
N-(1*H*-indazol-6-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S11b)

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₀N₄O₄S

PM = 318.309 g/mol

Rdto: 65%

p.f.: 185-188 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.9 (dd, *J* = 8.7, *J* = 1.7, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.95 (s, 1H), 8.0 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.35 (d, *J* = 8.8, 2H), 10.72 (s.a, 1H, NH), 12.91 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 101.3 (CH), 115.5 (CH), 120.6 (C), 121.9 (CH), 125.0 (CH), 128.6 (CH), 133.8 (CH), 135.5 (C), 140.4 (C), 145.2 (C), 150.2 (C).

EM-AR (TOF⁺): m/z [M + H] calculado para C₁₃H₁₁N₄O₄S: 319.0496, experimental: 319.0486.

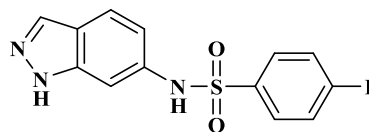
4-Fluoro-*N*-(1*H*-indazol-6-il)benzenosulfonamida (S11c)

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₀FN₃O₂S

PM = 291.302 g/mol

Rdto: 96%

p.f.: 159-162 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.88 (dd, *J* = 8.7, *J* = 1.8, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.37 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.81 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.3, 2H), 7.95 (s, 1H), 10.44 (s, 1H, NH), 12.89 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 100.7 (CH), 115.3 (CH), 116.8 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 120.3 (C), 121.7 (CH), 130.0 (d, *J*_{C-F} = 7.5, CH), 130.3 (C), 133.9 (CH), 136.0 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 140.4 (C), 164.5 (d, *J*_{C-F} = 247.5, C).

Análisis elemental: calculado para C₁₃H₁₀FN₃O₂S(H₂O)_{0.4}: C, 52.31; H, 3.65; N, 14.08; S, 10.74; experimental: C, 52.11; H, 3.24; N, 13.72; S, 11.00.

EM-AR (TOF⁺): m/z [M + H] calculado para C₁₃H₁₁FN₃O₂S 292.0551, experimental: 292.0549.

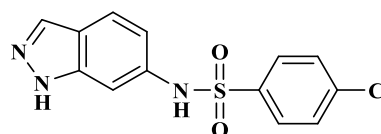
4-Cloro-*N*-(1*H*-indazol-6-il)benzenosulfonamida (S11d)

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₀ClN₃O₂S

PM = 307.756 g/mol

Rdto: 95%

p.f.: 187-191 °C

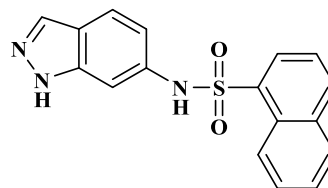


RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.89 (dd, *J* = 8.7, *J* = 1.7, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.62 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.95 (s, 1H), 10.48 (s.a, 1H, NH), 12.90 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 100.9 (CH), 115.4 (CH), 120.4 (C), 121.7 (CH), 128.9 (CH), 129.8 (CH), 133.8 (CH), 136.0 (C), 138.2 (C), 138.6 (C), 140.4 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₃H₁₀ClN₃O₂S: C, 50.73; H, 3.27; N, 13.65; S, 10.42, experimental: C, 50.49; H, 3.01; N, 13.31; S, 10.10.

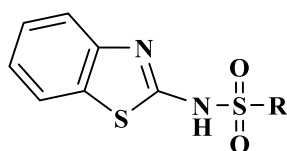
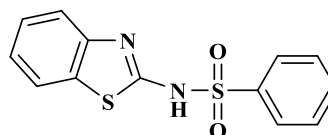
EM-AR (TOF⁺): m/z [M + H] calculado para C₁₃H₁₁ClN₃O₂S: 308.0255, experimental: 308.0251.

N*-(1*H*-indazol-6-il)naftalenosulfonamida (S11e)*Fórmula Molecular:** C₁₇H₁₃N₃O₂S**PM** = 323.370 g/mol**Rdto:** 75%**p.f.:** 207-210 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.88 (dd, *J* = 8.7, *J* = 1.7, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.59 (t, *J* = 7.8, 1H), 7.65 (dd, *J* = 7.7, *J* = 7.2, 1H), 7.75 (ddd, *J* = 8.5, *J* = 6.8, *J* = 1.3, 1H), 7.88 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.5, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.6, 1H), 8.78 (d, *J* = 8.7, 1H), 10.80 (s, 1H, NH), 12.77 (s, 1H, NH).

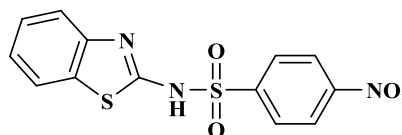
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 99.3 (CH), 114.5 (CH), 120.3 (C), 121.6 (CH), 124.6 (CH), 124.8 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (C), 128.6 (CH), 129.5 (CH), 130.2 (CH), 133.7 (CH), 134.1 (C), 134.6 (C), 134.8 (CH), 136.1 (C), 140.4 (C).

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₇H₁₄N₃O₂S 324.0801, experimental: 324.0798.

**S12*****N*-(benzotiazol-2-il)benzenosulfonamida (S12a)****Fórmula Molecular:** C₁₃H₁₀N₂O₂S₂**PM** = 290.363 g/mol**Rdto:** 87%**p.f.:** 262-267 °C (288-289)²⁰

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.20 (td, *J* = 7.9, *J* = 1.5, 1H), 7.35-7.47 (m, 2H), 7.58-7.65 (m, 3H), 7.75 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.88 (dd, *J* = 7.9, *J* = 0.4, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 113.2 (CH), 123.1 (CH), 124.1 (CH), 125.1 (C), 126.1 (CH), 127.6 (CH), 129.5 (CH), 132.8 (CH), 136.5 (C), 142.3 (C), 167.4 (C).

N*-(benzotiazol-2-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S12b)¹⁸*Fórmula Molecular:** C₁₃H₉N₃O₄S₂**PM** = 335.360 g/mol**Rdto:** 67%**p.f.:** 244-247 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.32 (td, *J* = 8.1, *J* = 2, 1H), 7.41-7.52 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 9, 2H), 7.89 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.20 (d, *J* = 9, 2H), 9.50 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 114.8 (CH), 123.3 (CH), 123.7 (CH), 124.5 (CH), 124.7 (C), 127.3 (CH), 127.8 (CH), 140.1 (C), 147.6 (C), 154.5 (C), 169.4 (C).

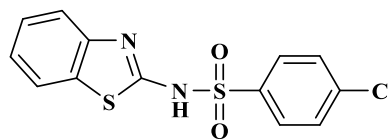
4-cloro-*N*-(benzotiazol-2-il)benzenosulfonamida (S12c)²¹

Fórmula Molecular: C₁₃H₉ClN₂O₂S₂

PM = 324.807 g/mol

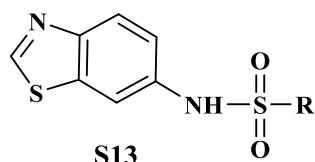
Rdto: 47%

p.f.: 212-216 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.28 (td, *J* = 7.9, *J* = 1.5, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.35-7.51 (m, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.88 (dd, *J* = 7.9, *J* = 0.4, 1H), 9.38 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.1 (CH), 123.2 (CH), 124.2 (CH), 125.2 (C), 127.6 (CH), 127.8 (CH), 128.0 (CH), 133.3 (C), 140.1 (C), 147.6 (C), 169.2 (C).



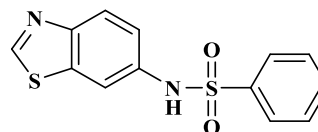
***N*-(benzotiazol-6-il)benzenosulfonamida (S13a)**

Fórmula Molecular: C₁₃H₁₀N₂O₂S₂

PM = 290.363 g/mol

Rdto: 96%

p.f.: 204-208 °C

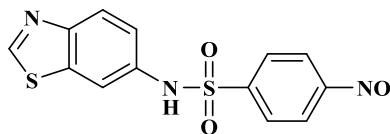


RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.26 (dd, *J* = 8.8, *J* = 2, 1H), 7.52-7.59 (m, 3H), 7.79 (d, *J* = 7, 2H), 7.87 (d, *J* = 2, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.8, 1H), 9.25 (s, 1H), 10.55 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 113.5 (CH), 120.1 (CH), 123.8 (CH), 127.0 (CH), 129.7 (CH), 133.4 (CH), 134.9 (C), 135.7 (C), 139.6 (C), 150.3 (C), 155.9 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₁₃H₁₀N₂O₂S₂: C, 53.77; H, 3.47; N, 9.65; S, 22.09, experimental: C, 53.77; H, 2.96; N, 9.49; S, 22.45.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* calculado para C₁₃H₁₁N₂O₂S₂: 291.0262, experimental: 291.0260.

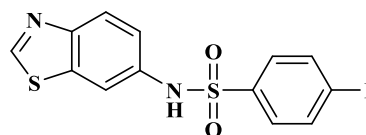
N*-(benzotiazol-6-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S13b)*Fórmula Molecular:** C₁₃H₉N₃O₄S₂**PM** = 335.360 g/mol**Rdto:** 99%**p.f.:** 242-247 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.26 (dd, *J* = 8.7, *J* = 2, 1H), 7.91 (d, *J* = 2, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.7, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.35 (d, *J* = 8.8, 2H), 9.28 (s, 1H), 10.86 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 114.5 (CH), 120.7 (CH), 124.0 (CH), 125.1 (CH), 128.7 (CH), 134.9 (C), 136.5 (C), 145.0 (C), 150.2 (C), 150.7 (C), 156.4 (CH).

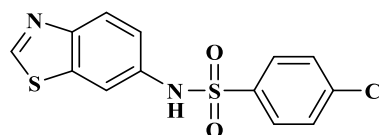
Análisis elemental: calculado para C₁₃H₉N₃O₄S₂: C, 46.56; H, 2.70; N, 12.53; S, 19.12; experimental: C, 46.81; H, 2.75; N, 12.82; S, 18.76.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₃H₁₀N₃O₄S₂: 336.0113, experimental: 336.0110.

N*-(benzotiazol-6-il)-4-fluorobenzenosulfonamida (S13c)*Fórmula Molecular:** C₁₃H₉FN₂O₂S₂**PM** = 308.353 g/mol**Rdto:** 97%**p.f.:** 231-233 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.25 (dd, *J* = 8.8, *J* = 2.1, 1H), 7.37 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.84 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.3, 2H), 7.88 (d, *J* = 2.1, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.8, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.60 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 113.8 (CH), 116.8 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 120.4 (CH), 123.8 (CH), 130.1 (d, *J*_{C-F} = 9.75, CH), 134.9 (C), 135.6 (C), 136.0 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 150.4 (C), 156.0 (CH), 164.7 (d, *J*_{C-F} = 255, C).

N*-(benzotiazol-6-il)-4-clorobenzenosulfonamida (S13d)*Fórmula Molecular:** C₁₃H₉ClN₂O₂S₂**PM** = 324.807 g/mol**Rdto:** 88%**p.f.:** 221-223 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.24 (dd, *J* = 8.8, *J* = 2, 1H), 7.61 (d, *J* = 6.8, 2H), 7.77 (d, *J* = 6.8, 2H), 7.88 (d, *J* = 2, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.8, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.60 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 114.0 (CH), 120.4 (CH), 123.9 (CH), 129.0 (CH), 129.8 (CH), 134.9 (C), 135.3 (C), 138.3 (C), 138.4 (C), 150.5 (C), 156.1 (CH).

EM-AR (ESI⁺): *m/z* calculado para C₁₃H₉ClN₂O₂S₂: 324.9872, experimental: 324.9879.

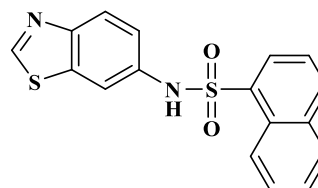
***N*-(benzotiazol-6-il)naftalenosulfonamida (S13e)**

Fórmula Molecular: C₁₇H₁₂N₂O₂S₂

PM = 340.421 g/mol

Rdto: 98%

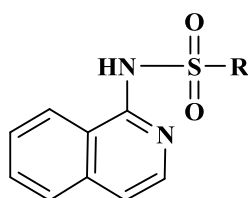
p.f.: 201-203 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.19 (dd, *J* = 8, *J* = 2, 1H), 7.60-7.93 (m, 5 H), 8.06 (d, *J* = 7, 1H), 8.20 (d, *J* = 8, 1H), 8.28 (dd, *J* = 7, *J* = 1.2, 1H), 8.78 (d, *J* = 8, 1H), 9.20 (s, 1H), 10.96 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 112.3 (CH), 119.2 (CH), 123.7 (CH), 124.6 (CH), 124.8 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (C), 128.6 (CH), 129.5 (CH), 130.4 (CH), 134.1 (C), 134.5 (C), 134.8 (C), 134.9 (CH), 135.6 (C), 149.9 (C), 155.6 (CH).

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₇H₁₃N₂O₂S₂: 341.0413, experimental: 341.0422.



S14

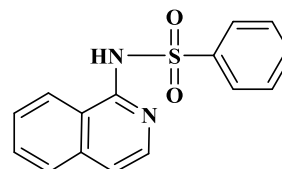
***N*-(isoquinolin-1-il)benzenosulfonamida (S14a)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₂N₂O₂S

PM = 284.334 g/mol

Rdto: 51%

p.f.: 174-176 °C

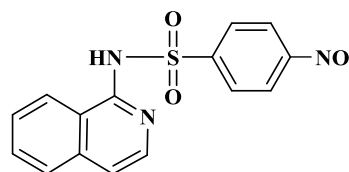


RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.07 (d, *J* = 7, 1H), 7.51-7.70 (m, 5H), 7.80-7.85 (m, 2H), 7.98 (dd, *J* = 1.6, *J* = 8.1, 2H), 8.38 (d, *J* = 8.3, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 110.5 (CH), 124.3 (C), 126.1 (CH), 127.1 (CH), 127.2 (CH), 128.4 (CH), 129.4 (CH), 132.4 (CH), 134.1 (CH), 137.1 (C), 148.0 (C), 152.8 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₂N₂O₂S: C, 63.36; H, 4.25; N, 9.85; S, 11.28, experimental: C, 63.15; H, 4.13; N, 9.72; S, 11.08.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₃N₂O₂S: 285.0698, experimental: 285.0693.

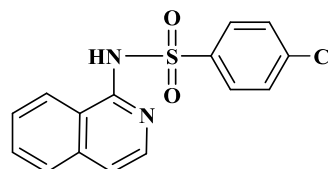
N*-(isoquinolin-1-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S14b)*Fórmula Molecular:** C₁₅H₁₁N₃O₄S**PM** = 329.332 g/mol**Rdto:** 54%**p.f.:** 195-200 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.24 (d, *J* = 6.2, 1H), 7.65 (d, *J* = 6.8, 1H), 7.77-7.78 (m, 1H), 7.87 (d, *J* = 8, 2H), 7.95-7.96 (m, 2H), 8.20 (d, *J* = 8, 2H), 8.54 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.95 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.7 (CH), 117.9 (C), 123.7 (CH), 124.8 (CH), 125.8 (CH), 127.2 (CH), 128.0 (CH), 129.0 (CH), 135.1 (CH), 137.3 (C), 147.7 (C), 154.3 (C), 154.4 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₁N₃O₄S(H₂O)_{0.6}: C, 52.97; H, 3.61; N, 12.35; S, 9.43, experimental: C, 52.85; H, 3.89; N, 12.37; S, 9.11.

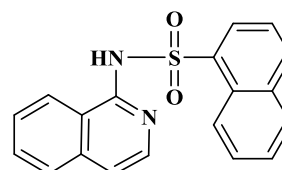
EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₂N₃O₄S: 330.0549, experimental: 330.0547.

4-Cloro-*N*-(isoquinolin-1-il)benzenosulfonamida (S14c)**Fórmula Molecular:** C₁₅H₁₁ClN₂O₂S**PM** = 318.779 g/mol**Rdto:** 60%**p.f.:** 183-188 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.10 (d, *J* = 7, 1H), 7.49-7.62 (m, 4H), 7.69-7.91 (m, 2H), 7.98 (d, *J* = 8.6, 2H), 8.26 (d, *J* = 8.3, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 110.9 (CH), 124.2 (C), 127.1 (CH), 127.2 (CH), 128.1 (CH), 128.5 (CH), 128.7 (CH), 129.5 (CH), 134.2 (CH), 137.2 (C), 142.4 (C), 148.0 (C), 152.8 (C).

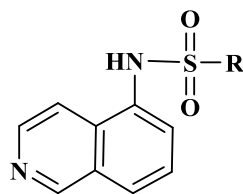
EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₂ClN₂O₂S: 319.0308, experimental: 319.0313.

N*-(isoquinolin-1-il)naftalenosulfonamida (S14d)*Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₄N₂O₂S**PM** = 334.393 g/mol**Rdto:** 87%**p.f.:** 255-258 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.23 (d, *J* = 7, 1H), 7.44-7.50 (m, 3H), 7.67 (d, *J* = 7, 1H), 7.71-7.77 (m, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.3, 2H), 7.88-7.99 (m, 3H), 8.54 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.85 (d, *J* = 8.5, 1H), 8.99 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.7 (CH), 117.9 (C), 124.7 (CH), 124.8 (CH), 125.8 (CH), 126.0 (CH), 126.1 (CH), 127.9 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 129.0 (CH), 129.3 (C), 129.9 (CH), 133.9 (C), 135.1 (CH), 137.3 (C), 144.0 (C), 154.2 (C).

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₉H₁₅N₂O₂S: 335.0854, experimental: 335.0848.



S15

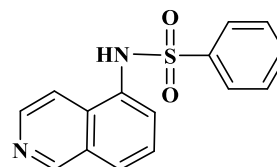
***N*-(isoquinolin-5-il)benzenosulfonamida (S15a)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₂N₂O₂S

PM = 284.334 g/mol

Rdto: 40%

p.f.: 198-200 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.40-7.52 (m, 2H), 7.55-7.63 (m, 2H), 7.65-7.73 (m, 2H), 7.80 (dd, *J* = 8.8, *J* = 3, 2H), 7.97 (d, *J* = 8, 1H), 8.39 (d, *J* = 6, 1H), 9.26 (s, 1H), 10.44 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.0 (CH), 127.0 (CH), 127.6 (CH), 128.7 (CH), 129.2 (C), 129.6 (CH), 130.1 (CH), 131.9 (C), 133.3 (CH), 135.5 (C), 140.0 (C), 143.2 (CH), 152.8 (CH). **EM-AR (ESI⁺):** *m/z* [M⁺ H] calculado para C₁₅H₁₃N₂O₂S: 285.0698, experimental: 285.0697.

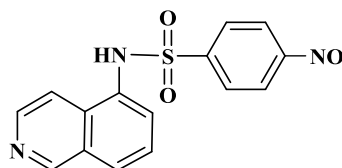
***N*-(isoquinolin-5-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S15b)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₁N₃O₄S

PM = 329.332 g/mol

Rdto: 36%

p.f.: 265-268 °C (270 °C)²²



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.35 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.2, 1H), 7.70-7.85 (m, 2H), 8.26 (d, *J* = 8.9, 2H), 8.59 (d, *J* = 8.9, 2H), 8.62 (d, *J* = 6.7, 1H), 8.65 (d, *J* = 6.7, 1H), 9.76 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.9 (CH), 117.4 (CH), 120.7 (CH), 123.7 (CH), 126.7 (C), 127.7 (CH), 128.4 (C), 129.4 (C), 132.2 (CH), 145.1 (C), 147.4 (CH), 150.0 (C), 154.6 (CH).

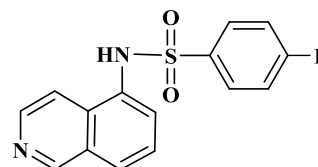
4-Fluoro-*N*-(isoquinolin-5-il)benzenosulfonamida (S15c)

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₁FN₂O₂S

PM = 302.324 g/mol

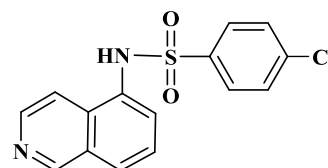
Rdto: 95%

p.f.: 233-237 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.35 (t, *J* = 8.7, 2H), 7.46 (d, *J* = 8, 1H), 7.61 (t, *J* = 8, 1H), 7.72 (dd, *J* = 8.7, *J* = 5.2, 2H), 7.80 (d, *J* = 6, 1H), 8.00 (d, *J* = 8, 1H), 8.43 (d, *J* = 6, 1H), 9.28 (s, 1H), 10.49 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.9 (CH), 116.8 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 126.8 (CH), 127.6 (CH), 127.7 (CH), 129.2 (C), 130.1 (d, *J*_{C-F} = 9.75, CH), 131.8 (C), 132.0 (C), 136.2 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 143.3 (CH), 152.8 (CH), 164.7 (d, *J*_{C-F} = 250.5, C). **EM-AR (TOF⁺):** *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₂FN₂O₂S: 303.0598, experimental: 303.0605.

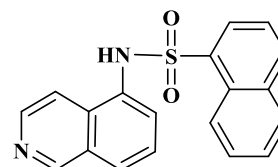
4-Cloro-N-(isoquinolin-5-il)bencenosulfonamida (S15d)**Fórmula Molecular:** C₁₅H₁₁ClN₂O₂S**PM** = 318.779 g/mol**Rdto:** 84%**p.f.:** 205-207 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.58-7.60 (m, 3H), 7.65-7.79 (m, 3H), 7.99 (d, *J* = 6, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.2, 1H), 8.51 (d, *J* = 6, 1H), 9.46 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 117.4 (CH), 127.7 (CH), 128.6 (CH), 128.9 (C), 129.0 (CH), 129.1 (CH), 129.8 (CH), 132.0 (C), 133.0 (C), 138.3 (C), 138.5 (C), 140.4 (CH), 151.6 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₁ClN₂O₂S(H₂O)_{0.3}: C, 55.57; H, 3.61; N, 8.64; S, 9.89, experimental: C, 55.24; H, 3.48; N, 8.79; S, 10.27.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₂ClN₂O₂S: 319.0308, experimental: 319.0301.

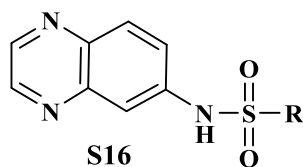
N-(isoquinolin-5-il)naftalenosulfonamida (S15e)**Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₄N₂O₂S**PM** = 334.393g/mol**Rdto:** 81%**p.f.:** 196-200 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.43 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.1, 1H), 7.52-7.60 (m, 2H), 7.62-7.70 (m, 2H), 7.72 (d, *J* = 6.5, 1H), 7.90 (d, *J* = 8, 1H), 8.02 (d, *J* = 6.5, 1H), 8.04 (d, *J* = 8, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.24 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.1, 1H), 8.78 (d, *J* = 8.3, 1H), 9.20 (s, 1H), 10.79 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 124.8 (CH), 126.3 (CH), 126.5 (CH), 127.3 (CH), 127.6 (CH), 128.0 (C), 128.4 (CH), 128.8 (CH), 129.4 (CH), 129.8 (CH), 129.9 (CH), 131.6 (C), 131.9 (C), 132.7 (C), 134.1 (C), 134.8 (CH), 134.9 (C), 143.0 (CH), 152.7 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₁₉H₁₄N₂O₂S: C, 68.24; H, 4.22; N, 8.38; S, 9.59, experimental: C, 68.54; H, 4.00; N, 8.72; S, 9.34.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₉H₁₅N₂O₂S: 335.0854, experimental: 335.0862.



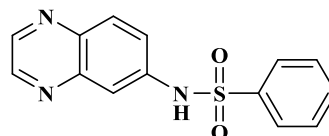
***N*-(quinoxalin-6-il)benzenosulfonamida (S16a)**

Fórmula Molecular: C₁₄H₁₁N₃O₂S

PM = 285.322 g/mol

Rdto: 46%

p.f.: 195-200 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.52-7.55 (m, 3H), 7.62 (dd, *J* = 9, *J* = 2.4, 1H), 7.68 (d, *J* = 2.4, 1H), 7.87 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.7, 2H), 7.94 (d, *J* = 9, 1H), 8.6 (s.a, 1H, NH), 8.78 (d, *J* = 1.8, 1H), 8.83 (d, *J* = 1.8, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.3 (CH), 123.8 (CH), 127.1 (CH), 129.9 (CH), 130.7 (CH), 133.7 (CH), 139.5 (C), 139.7 (C), 143.0 (C), 144.7 (CH), 146.6 (CH), 150.0 (C).

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₄H₁₂N₃O₂S: 286.0650, experimental: 286.0647.

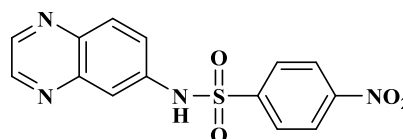
4-Nitro-*N*-(quinoxalin-6-il)benzenosulfonamida (S16b)

Fórmula Molecular: C₁₄H₁₀N₄O₄S

PM = 330.320 g/mol

Rdto: 98%

p.f.: 251-254 °C

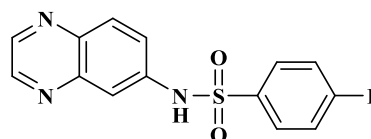


RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.64 (dd, *J* = 9, *J* = 2.4, 1H), 7.72 (d, *J* = 2.4, 1H), 8.01 (d, *J* = 9, 1H), 8.11 (d, *J* = 9, 2H), 8.37 (d, *J* = 9, 2H), 8.58 (s.a, 1H, NH), 8.81 (d, *J* = 1.9, 1H), 8.85 (d, *J* = 1.9, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.2 (CH), 124.0 (CH), 125.2 (CH), 128.7 (CH), 131.0 (CH), 138.9 (C), 139.8 (C), 143.0 (C), 144.8 (C), 145.1 (CH), 146.7 (CH), 150.4 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₄H₁₀N₄O₄S: C, 50.90; H, 3.05; N, 16.96; S, 9.71, experimental: C, 51.02; H, 3.31; N, 17.31; S, 9.53.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₄H₁₁N₄O₄S: 331.0501, experimental: 331.0506.

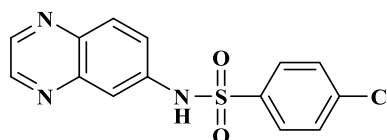
4-Fluoro-*N*-(quinoxalin-6-il)benzenosulfonamida (S16c)**Fórmula Molecular:** C₁₄H₁₀FN₃O₂S**PM** = 303.311 g/mol**Rdto:** 78%**p.f.:** 186-190 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.41 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.63 (dd, *J* = 9, *J* = 2.3, 1H), 7.70 (d, *J* = 2.3, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.1, 2H), 8.01 (d, *J* = 9, 1H), 8.80 (d, *J* = 1.7, 1H), 8.84 (d, *J* = 1.7, 1H), 11.1 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.6 (CH), 117.1 (d, *J*_{C-F} = 23.25, CH), 123.9 (CH), 130.2 (d, *J*_{C-F} = 9.75, CH), 130.8 (CH), 135.8 (C), 139.5 (C), 139.6 (C), 143.0 (C), 144.8 (CH), 146.6 (CH), 164.8 (d, *J*_{C-F} = 251.25, C).

Análisis elemental: calculado para C₁₄H₁₀FN₃O₂S: C, 55.44; H, 3.32; N, 13.85; S, 10.57, experimental: C, 55.58; H, 3.69; N, 13.96; S, 10.22.

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₄H₁₁FN₃O₂S: 304.0551, experimental: 304.0661.

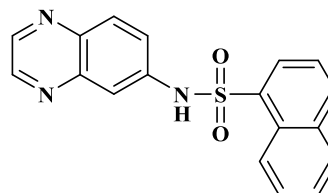
4-Cloro-*N*-(quinoxalin-6-il)benzenosulfonamida (S16d)**Fórmula Molecular:** C₁₄H₁₀ClN₃O₂S**PM** = 319.767 g/mol**Rdto:** 99%**p.f.:** 190-192 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.62-7.66 (m, 4H), 7.85 (d, *J* = 9, 2H), 8.01 (d, *J* = 9, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 11.2 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.7 (CH), 123.9 (CH), 129.0 (CH), 130.1 (CH), 130.9 (CH), 138.3 (C), 138.6 (C), 139.4 (C), 139.0 (C), 143.0 (C), 144.9 (CH), 146.6 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₁₄H₁₀ClN₃O₂S: C, 52.58; H, 3.15; N, 13.14; S, 10.03, experimental: C, 52.63; H, 3.27; N, 13.10; S, 10.04.

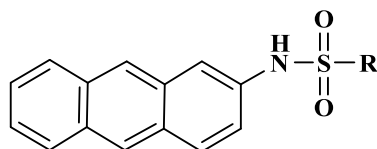
EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₄H₁₁ClN₃O₂S: 320.0261, experimental: 320.0264.

N*-(quinoxalin-6-il)naftalenosulfonamida (S16e)*Fórmula Molecular:** C₁₈H₁₃N₃O₂S**PM** = 335.381 g/mol**Rdto:** 99%**p.f.:** 115-119 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.30-7.42 (m, 1H), 7.55-7.71 (m, 4H), 7.78 (td, *J* = 7, *J* = 1.5, 1H), 7.92 (d, *J* = 9, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.40 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.3, 1H), 8.58 (s.a, 1H, NH), 8.73 (d, *J* = 2, 1H), 8.78 (d, *J* = 2, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 114.1 (CH), 123.0 (CH), 124.3 (CH), 124.9 (CH), 127.5 (CH), 127.6 (C), 128.8 (CH), 129.6 (CH), 130.7 (CH), 134.0 (C), 134.1 (C), 135.3 (CH), 139.2 (C), 139.4 (C), 143.0 (C), 144.5 (CH), 146.5 (CH), 149.9 (CH).

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₈H₁₄N₃O₂S: 336.0807, experimental: 336.0805.



S17

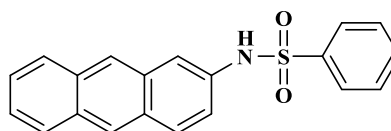
***N*-(antracén-2-il)benzenosulfonamida (S17a)**

Fórmula Molecular: C₂₀H₁₅NO₂S

PM = 333.405 g/mol

Rdto: 97%

p.f.: 195-197 °C (184 °C)²³



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.31 (dd, *J* = 9, *J* = 2, 1H), 7.34-7.41 (m, 1H), 7.42-7.52 (m, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.96-8.05 (m, 3H), 8.42 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 10.70 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.4 (CH), 121.4 (CH), 125.5 (CH), 125.6 (CH), 126.2 (CH), 126.4 (CH), 128.0 (CH), 128.4 (CH), 128.9 (C), 129.0 (CH), 129.4 (CH), 129.8 (CH), 130.1 (CH), 131.0 (C), 132.1 (C), 134.9 (C), 138.3 (C), 138.7 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₀H₁₅NO₂S: C, 72.05; H, 4.53; N, 4.20; S, 9.62, experimental: C, 71.77; H, 4.17; N, 3.95; S, 9.44.

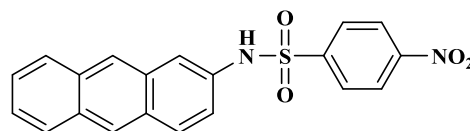
***N*-(antracén-2-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S17b)**

Fórmula Molecular: C₂₀H₁₄N₂O₄S

PM = 378.402 g/mol

Rdto: 58%

p.f.: 183-187 °C

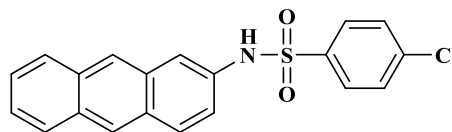


RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.05 (dd, *J* = 9, *J* = 2, 1H), 7.25-7.41 (m, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.78-7.92 (m, 2H), 8.09 (d, *J* = 9, 2H), 8.35 (d, *J* = 9, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.46 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.6 (CH), 123.4 (CH), 125.0 (CH), 125.5 (CH), 125.6 (CH), 126.2 (CH), 126.4 (CH), 126.9 (CH), 127.4 (C), 128.0 (CH), 128.4 (CH), 130.1 (C), 132.0 (CH), 132.3 (C), 134.0 (C), 145.7 (C), 146.4 (C), 150.1 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₀H₁₄N₂O₄S: C, 63.48; H, 3.73; N, 7.40; S, 8.47, experimental: C, 63.95; H, 4.04; N, 7.45; S, 8.95.

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M-H] calculado para C₂₀H₁₃N₂O₄S: 377.0596, experimental: 377.0593.

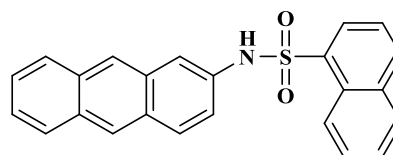
N*-(antracén-2-il)-4-clorobenzenosulfonamida (S17c)*Fórmula Molecular:** C₂₀H₁₄ClNO₂S**PM** = 367.849 g/mol**Rdto:** 53%**p.f.:** 160-161 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.31 (dd, *J* = 9, *J* = 2, 1H), 7.45-7.48 (m, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.9, 2H), 7.70 (d, *J* = 2, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.9, 2H), 7.98-8.02 (m, 3H), 8.42 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 10.69 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.4 (CH), 121.4 (CH), 125.5 (CH), 125.6 (CH), 126.2 (CH), 126.4 (CH), 128.0 (CH), 128.4 (CH), 128.9 (C), 129.0 (CH), 129.9 (CH), 130.1 (CH), 131.0 (C), 131.5 (C), 132.1 (C), 134.9 (C), 138.3 (C), 138.7 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₀H₁₄ClNO₂S: C, 65.30; H, 3.83; N, 3.80; S, 8.71, experimental: C, 65.19; H, 3.53; N, 3.45; S, 8.90.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₂₀H₁₅ClNO₂S: 368.0512, experimental: 368.0511.

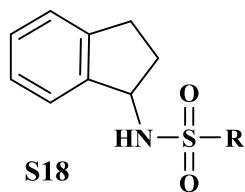
N*-(antracén-2-il)-naftalenosulfonamida (S17d)*Fórmula Molecular:** C₂₄H₁₇NO₂S**PM** = 383.463 g/mol**Rdto:** 99%**p.f.:** 105-109 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.26 (dd, *J* = 9, *J* = 2.1, 1H), 7.37-7.45 (m, 2H), 7.64 (t, *J* = 8, 2H), 7.65-7.73 (m, 2H), 7.91 (d, *J* = 9, 1H), 7.95 (dd, *J* = 6.8, *J* = 2.4, 2H), 8.04 (d, *J* = 7.7, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 1.7, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.83 (d, *J* = 8.5, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 113.5 (CH), 120.6 (CH), 124.6 (CH), 124.8 (CH), 125.1 (CH), 125.5 (CH), 126.2 (CH), 126.3 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (C), 127.9 (CH), 128.4 (CH), 128.6 (CH), 129.5 (CH), 129.9 (CH), 130.6 (CH), 130.8 (C), 131.4 (C), 132.0 (C), 134.1 (C), 134.6 (C), 134.9 (CH), 135.0 (C), 138.8 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₄H₁₇NO₂S: C, 75.17; H, 4.47; N, 3.65; S, 8.36; experimental: C, 75.77; H, 4.17; N, 3.95; S, 8.44.

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₂₄H₁₈NO₂S: 384.1053, experimental: 384.1047.



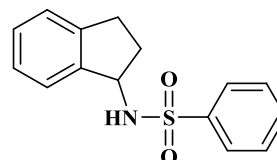
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)benzenosulfonamida(S18a)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₅NO₂S

PM = 273.350 g/mol

Rdto: 97%

p.f.: 118-119 °C²⁴



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.56-1.74 (m, 1H), 1.98-2.14 (m, 1H), 2.58-2.70 (m, 1H), 2.67-2.85 (m, 1H), 4.67-4.70 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 7.0, 1H), 7.15-7.22 (m, 3H), 7.61-7.67 (m, 3H), 7.90 (dd, *J* = 8.3, *J* = 1.7, 2H), 8.17 (d, *J* = 8, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 29.8 (CH₂), 33.7 (CH₂), 58.3 (CH), 124.3 (CH), 124.9 (CH), 126.7 (CH), 126.8 (CH), 128.0 (CH), 129.6 (CH), 132.7 (CH), 142.4 (C), 142.8 (C), 143.2 (C).

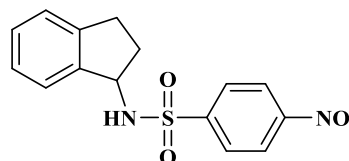
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S18b)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₄N₂O₄S

PM = 318.347 g/mol

Rdto: 99%

p.f.: 166-170 °C (168 °C)²⁵



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.57-1.64 (m, 1H), 1.98-2.19 (m, 1H), 2.60-2.72 (m, 1H), 2.66-2.88 (m, 1H), 4.70-4.78 (m, 1H), 7.12-7.25 (m, 4H), 8.13 (d, *J* = 9.0, 2H), 8.45 (d, *J* = 9.0, 2H), 8.56 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 29.8 (CH₂), 33.6 (CH₂), 58.5 (CH), 124.3 (CH), 125.0 (CH), 125.1 (CH), 126.8 (CH), 128.2 (CH), 128.4 (CH), 142.7 (C), 142.8 (C), 148.0 (C), 150.0 (C).

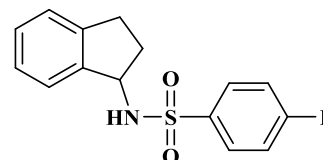
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)-4-fluorobenzenosulfonamida (S18c)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₄FN₂O₂S

PM = 291.340 g/mol

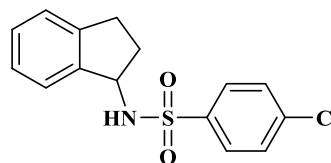
Rdto: 93%

p.f.: 146-147 °C²⁶



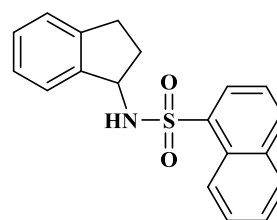
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.51-1.53 (m, 1H), 1.97-2.10 (m, 1H), 2.51-2.63 (m, 1H), 2.80 (ddd, *J* = 16.0, *J* = 8.8, *J* = 3.2, 1H), 4.65-4.78 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 7.0, 1H), 7.12-7.21 (m, 3H), 7.50 (t, *J* = 9.0, 2H), 7.95 (dd, *J* = 9.2, *J* = 5.3, 2H), 8.22 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 29.8 (CH₂), 33.6 (CH₂), 58.3 (CH), 116.8 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 124.3 (CH), 124.9 (CH), 126.7 (CH), 128.1 (CH), 129.8 (d, *J*_{C-F} = 9, CH), 138.8 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 142.8 (C), 143.0 (C), 164.4 (d, *J*_{C-F} = 249, C).

4-Cloro-N-(2,3-dihidro-1H-inden-1-il)bencenosulfonamida (S18d)**Fórmula Molecular:** C₁₅H₁₄ClNO₂S**PM** = 307.792 g/mol**Rdto:** 35%**p.f.:** 147-149 °C²⁶

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.61 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 2.68 (m, 1H), 2.79 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 7.15 (m, 4H), 7.70 (d, *J* = 8.5, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.5, 2H), 8.26 (d, *J* = 7, 1H, NH).

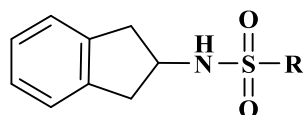
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 29.8 (CH₂), 33.6 (CH₂), 58.4 (CH), 124.3 (CH), 124.9 (CH), 126.8 (CH), 128.1 (CH), 128.8 (CH), 129.7 (CH), 137.5 (C), 141.3 (C), 142.8 (C), 143.0 (C).

N-(2,3-dihidro-1H-inden-1-il)naftalenosulfonamida (S18e)**Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇NO₂S**PM** = 323.410 g/mol**Rdto:** 46%**p.f.:** 164-165 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.54 (dddd, *J* = 12.6, *J* = 8.7, *J* = 8.1, *J* = 7.8, 1H), 1.92 (dddd, *J* = 12.6, *J* = 8.1, *J* = 7.8, *J* = 3.2, 1H), 2.59 (ddd, *J* = 15.8, *J* = 8.7, *J* = 3.2, 1H), 2.74 (ddd, *J* = 15.8, *J* = 7.8, *J* = 7.8, 1H), 4.66 (*pt*, *J* = 8.1, 1H), 6.87 (d, *J* = 7.7, 1H), 7.04 (td, *J* = 7.7, *J* = 2.9, 1H), 7.11-7.17 (m, 2H), 7.64-7.76 (m, 3H), 8.13 (dd, *J* = 7.3, *J* = 2, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.3, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.5, 1H), 8.49 (d, *J* = 9, 1H, NH), 8.73 (d, *J* = 8.5, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 29.7 (CH₂), 33.8 (CH₂), 58.2 (CH), 124.3 (CH), 124.8 (CH), 124.9 (CH), 125.3 (CH), 126.6 (CH), 127.2 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (CH), 129.1 (CH), 129.3 (CH), 134.2 (CH), 136.8 (C), 142.2 (C), 142.8 (C), 143.0 (C), 143.4 (C).

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₉H₁₈NO₂S: 324.1053, experimental: 324.1037.



S19

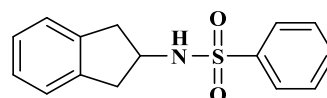
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)benzenosulfonamida (S19a)²⁷**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₅NO₂S

PM = 273.350 g/mol

Rdto: 96%

p.f.: 103-106 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.71 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.3, 2H), 2.93 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.3, 2H), 3.98 (sex, *J* = 7.3, 1H), 7.07-7.15 (m, 4H), 7.58-7.71 (m, 3H), 7.87 (dd, *J* = 8.0, *J* = 1.6, 2H), 8.05 (d, *J* = 7.0, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 39.5 (CH₂), 54.3 (CH), 124.6 (CH), 126.9 (CH), 129.6 (CH), 132.8 (CH), 140.7 (C), 141.6 (C).

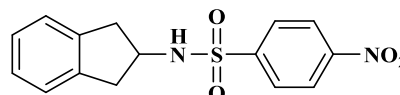
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S19b)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₄N₂O₄S

PM = 318.347 g/mol

Rdto: 30%

p.f.: 153-154 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.71 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.0, 2H), 2.98 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.0, 2H), 3.98 (sex, *J* = 7.0, 1H), 7.08-7.15 (m, 4H), 8.10 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.44 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.45 (d, *J* = 7.0, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 39.5 (CH₂), 54.4 (CH), 124.6 (CH), 125.0 (CH), 126.9 (CH), 128.5 (CH), 140.5 (C), 147.2 (C), 149.9 (C).

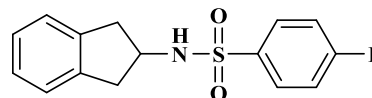
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)-4-fluorobenzenosulfonamida (S19c)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₄FNO₂S

PM = 291.340 g/mol

Rdto: 51%

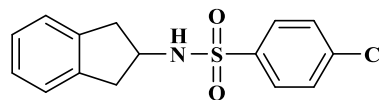
p.f.: 116-118 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.71 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.0, 2H), 2.95 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.0, 2H), 3.90 (sex, *J* = 7.0, 1H), 7.05-7.15 (m, 4H), 7.46 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.92 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.2, 2H), 8.11 (d, *J* = 7.0, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 39.5 (CH₂), 54.3 (CH), 116.8 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 124.6 (CH), 126.9 (CH), 129.9 (d, *J*_{C-F} = 9, CH), 138.0 (d, *J*_{C-F} = 3.0, C), 140.7 (C), 164.5 (d, *J*_{C-F} = 249, C).

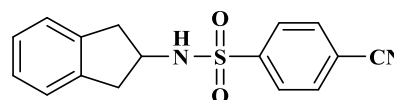
EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₅H₁₅FNO₂S: 292.0802, experimental: 292.0808.

4-Cloro-N-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)bencenosulfonamida (S19d)**Fórmula Molecular:** C₁₅H₁₄ClNO₂S**PM** = 307.792 g/mol**Rdto:** 87%**p.f.:** 135-140 °C²⁷

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.71 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.5, 2H), 2.97 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.5, 2H), 3.91 (sex, *J* = 7.5, 1H), 7.05-7.20 (m, 4H), 7.69 (d, *J* = 8.3, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.3, 2H), 8.14 (d, *J* = 7.0, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 39.5 (CH₂), 54.3 (CH), 124.6 (CH), 126.0 (CH), 128.9 (CH), 129.8 (CH), 137.6 (C), 140.5 (C), 140.6 (C).

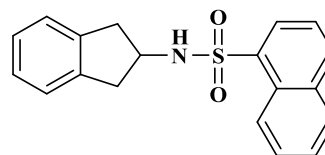
EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₅H₁₅ClNO₂S: 308.0512, experimental: 308.0513.

4-Ciano-N-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il) bencenosulfonamida (S19e)**Fórmula Molecular:** C₁₆H₁₄N₂O₂S**PM** = 298.360 g/mol**Rdto:** 89%

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.70 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.5, 2H), 2.96 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.5, 2H), 3.88-4.05 (m, 1H), 7.15-7.20 (m, 4H), 8.02 (d, *J* = 8.3, 2H), 8.11 (d, *J* = 8.3, 2H), 8.36 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 39.5 (CH₂), 54.3 (CH), 115.2 (C), 124.7 (CH), 126.9 (CH), 127.7 (CH), 133.9 (CH), 140.6 (C), 145.81 (C).

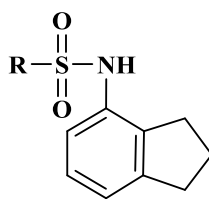
EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M-H] calculado para C₁₆H₁₃N₂O₂S: 297.0703, experimental: 297.0697.

N-(2,3-dihidro-1H-inden-2-il)naftalenosulfonamida (S19f)**Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇NO₂S**PM** = 323.410 g/mol**Rdto:** 51%**p.f.:** 184-187 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.65 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.3, 2H), 2.83 (dd, *J* = 15.8, *J* = 7.3, 2H), 3.91 (sex, *J* = 7.3, 1H), 7.12-7.20 (m, 4H), 7.25-7.57 (m, 3H), 8.11 (d, *J* = 7.7, 1H), 8.21 (dd, *J* = 7.7, *J* = 1.1, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.38 (d, *J* = 7.5, 1H, NH), 8.70 (d, *J* = 8.3, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 37.7 (CH₂), 50.2 (CH), 124.6 (CH), 125.0 (CH), 125.1 (CH), 126.8 (CH), 127.2 (CH), 127.9 (C), 128.2 (CH), 129.1 (CH), 129.3 (CH), 134.2 (CH), 134.2 (C), 136.3 (C), 140.6 (C).

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₉H₁₈NO₂S: 324.1053, experimental: 324.1032.



S20

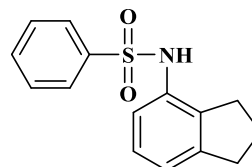
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)benzenosulfonamida (S20a)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₅NO₂S

PM = 273.351 g/mol

Rdto: 96%

p.f.: 140-143 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.77 (q, *J* = 7.5, 2H), 2.50 (t, *J* = 7.5, 2H), 2.75 (t, *J* = 7.5, 2H), 6.87 (dd, *J* = 6.6, *J* = 2.5, 1H), 6.98-7.07 (m, 2H), 7.49-7.55 (m, 3H), 7.66 (dd, *J* = 7.0, *J* = 1.5, 2H), 9.67 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 24.9 (CH₂), 30.4 (CH₂), 33.0 (CH₂), 122.2 (CH), 122.5 (CH), 126.9 (CH), 127.2 (CH), 129.5 (CH), 133.0 (CH), 133.1 (C), 139.0 (C), 140.7 (C), 145.6 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₅NO₂S: C, 65.91; H, 5.53; N, 5.12; S, 11.73, experimental: C, 65.67; H, 5.57; N, 5.13; S, 11.72.

EM-AR (TOF⁺): m/z [M + H] calculado para C₁₅H₁₆NO₂S: 274.0896, experimental: 274.0902.

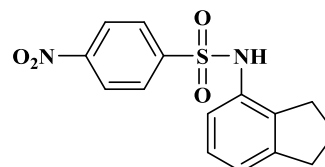
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S20b)**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₄N₂O₄S

PM = 318.348 /mol

Rdto: 70%

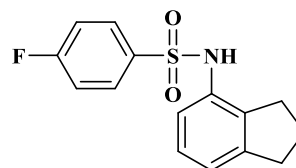
p.f.: 175-178 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.82 (q, *J* = 7.5, 2H), 2.57 (t, *J* = 7.5, 2H), 2.77 (t, *J* = 7.5, 2H), 6.83 (dd, *J* = 5.5, *J* = 3.5, 1H), 7.03 (d, *J* = 3.5, 1H), 7.05 (d, *J* = 5.5, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.34 (d, *J* = 8.8, 2H), 10.05 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 24.9 (CH₂), 30.6 (CH₂), 33.0 (CH₂), 122.7 (CH), 122.8 (CH), 124.9 (CH), 127.4 (CH), 128.5 (CH), 132.4 (C), 139.5 (C), 146.0 (C), 146.2 (C), 150.1 (C).

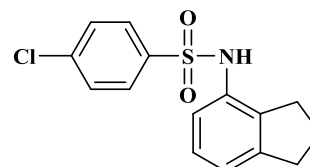
Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₄N₂O₄S: C, 56.59; H, 4.43; N, 8.80; S, 10.07, experimental: C, 56.83; H, 4.51; N, 8.91; S, 9.68.

N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)-4-fluorobenzenosulfonamida (S20c)*Fórmula Molecular:** C₁₅H₁₄FNO₂S**PM** = 291.342 g/mol**Rdto:** 97%**p.f.:** 115-117 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.80 (q, *J* = 7.5, 2H), 2.52 (t, *J* = 7.5, 2H), 2.77 (t, *J* = 7.5, 2H), 6.85 (dd, *J* = 6, *J* = 2.8, 1H), 7.02 (m, 2H), 7.40 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.72 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.2, 2H), 9.71 (s.a, 1H, NH).

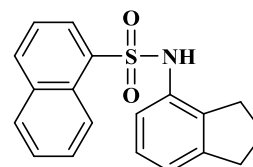
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 24.9 (CH₂), 30.5 (CH₂), 33.0 (CH₂), 116.6 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 122.4 (CH), 122.6 (CH), 127.2 (CH), 130.0 (d, *J*_{C-F} = 9.7, CH), 133.0 (C), 137.1 (d, *J*_{C-F} = 3, C) 139.2 (C), 145.7 (C), 164.5 (d, *J*_{C-F} = 247.5, C).

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₅FNO₂S: 292.0802, experimental: 292.0808.

N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)benzenosulfonamida (S20d)*Fórmula:** C₁₅H₁₄ClNO₂S**PM** = 307.792 g/mol**Rdto:** 57%**p.f.:** 127-130 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.82 (q, *J* = 7.5, 2H), 2.57 (t, *J* = 7.5, 2H), 2.78 (t, *J* = 7.5, 2H), 6.85 (dd, *J* = 5.6, *J* = 3.2, 1H), 7.01-7.06 (m, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.8, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.8, 2H), 9.78 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 24.9 (CH₂), 30.5 (CH₂), 33.0 (CH₂), 122.4 (CH), 122.5 (CH), 127.3 (CH), 128.9 (CH), 129.6 (CH), 132.9 (C), 137.9 (C), 139.2 (C), 139.6 (C), 145.7 (C). **EM-AR (TOF⁺):** *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₅ClNO₂S: 308.0507, experimental: 308.0499.

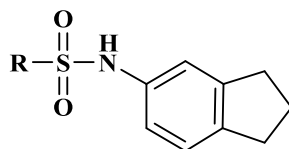
N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)naftalenosulfonamida (S20e)*Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇NO₂S**PM** = 323.410 g/mol**Rdto:** 63%**p.f.:** 185-186 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.65 (q, *J* = 7.4, 2H), 2.39 (t, *J* = 7.4, 2H), 2.66 (t, *J* = 7.4, 2H), 6.86 (dd, *J* = 7.3, *J* = 1.8, 1H), 6.92 (d, *J* = 7.3, 1H), 6.96 (t, *J* = 7.3, 1H), 7.57 (t, *J* = 8.2, 1H), 7.63-7.70 (m, 2H), 8.03-8.09 (m, 2H), 8.21 (d, *J* = 8.2, 1H), 8.67-8.72 (m, 1H), 9.98 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 24.7 (CH₂), 30.3 (CH₂), 32.9 (CH₂), 121.6 (CH), 121.8 (CH), 124.8 (CH), 125.0 (CH), 127.1 (CH), 127.2 (C), 127.9 (C), 128.1 (C), 129.3 (CH), 129.6 (C), 133.0 (CH), 134.1 (C), 134.5 (C), 135.7 (CH), 138.3 (CH), 145.7 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₁₉H₁₇NO₂S: C, 70.56; H, 5.30; N, 4.33; S, 9.91, experimental: C, 70.3; H, 5.31; N, 4.46; S, 9.55.

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₉H₁₈NO₂S: 324.1053, experimental: 324.1039.



S21

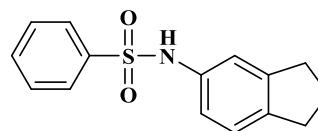
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)benzenosulfonamida (S21a)²**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₅NO₂S

PM = 273.351 g/mol

Rdto: 91%

p.f.: 150-154°C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.92 (q, *J* = 7.3, 2H), 2.48-2.53 (m, 4H), 6.84 (dd, *J* = 8.1, *J* = 2.1, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.1, 1H), 7.49-7.60 (m, 3H), 7.72 (d, *J* = 7.9, 2H), 10.1 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.4 (CH₂), 31.9 (CH₂), 32.6 (CH₂), 117.1 (CH), 118.9 (CH), 124.9 (CH), 127.0 (CH), 129.5 (CH), 134.0 (CH), 136.0 (C), 139.9 (C), 140.0 (C), 145.4 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₅NO₂S: C, 65.91; H, 5.53; N, 5.12; S, 11.73, experimental: C, 66.07; H, 5.48; N, 5.15; S, 11.46.

EM-AR (TOF⁺): *m/z* calculado para C₁₅H₁₅NO₂S: 273.0823, experimental: 273.0826.

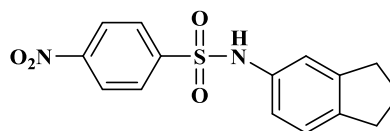
***N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)-4-nitrobenzenosulfonamida (S21b)²**

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₄N₂O₄S

PM = 318.349 g/mol

Rdto: 91%

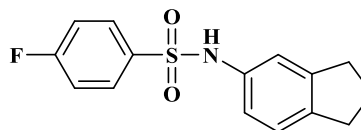
p.f.: 150-154°C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.94 (q, *J* = 7.3, 2H), 2.72-2.76 (m, 4H), 6.85 (dd, *J* = 8, *J* = 2.1, 1H), 6.97 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.7, 2H), 8.35 (d, *J* = 8.7, 2H), 10.1 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.4 (CH₂), 32.0 (CH₂), 32.6 (CH₂), 117.7 (CH), 119.5 (CH), 124.9 (CH), 125.10 (CH), 128.6 (CH), 133.2 (C), 140.8 (C), 145.3 (C), 145.4 (C), 150.1 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₅H₁₄N₂O₄S: 318.0674, experimental: 318.0677.

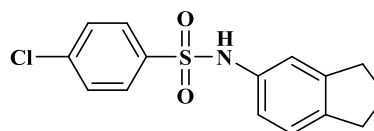
N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)-4-fluorobenzenosulfonamida (S21c)*Fórmula Molecular:** C₁₅H₁₄FNO₂S**PM** = 291.341 g/mol**Rdto:** 87%**p.f.:** 134-136 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.93 (q, *J* = 7, 2H), 2.72-2.74 (m, 4H), 6.82 (dd, *J* = 8, *J* = 2, 1H), 6.94 (d, *J* = 2, 1H), 7.03 (d, *J* = 8, 1H), 7.38 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.72 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.1, 2H), 10.13 (s.a, NH, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.4 (CH₂), 32.0 (CH₂), 32.6 (CH₂), 116.8 (d, *J*_{C-F} = 22, CH), 117.4 (CH), 119.2 (CH), 125.0 (CH), 130.0 (d, *J*_{C-F} = 9.75, CH), 135.8 (C), 136.3 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 140.3 (C), 145.1 (C), 164.5 (d, *J*_{C-F} = 249.7, C).

Análisis elemental: calculado para C₁₅H₁₄FNO₂S: C, 61.84; H, 4.85; N, 4.81; S, 11.00, experimental: C, 61.72; H, 4.88; N, 4.78; S, 10.95.

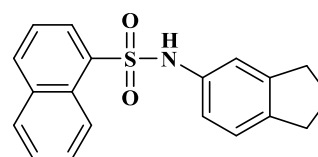
EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₅H₁₅FNO₂S: 292.0808, experimental: 292.0805.

N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)benzenosulfonamida (S21d)²*Fórmula Molecular:** C₁₅H₁₄ClNO₂S**PM** = 307.796 g/mol**Rdto:** 84%**p.f.:** 121-123 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.75-1.82 (m, 2H), 2.64-2.71 (m, 4H), 6.78 (dd, *J* = 7.9, *J* = 1.3, 1H), 6.90 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 7.9, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.2, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.2, 2H), 10.1 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.4 (CH₂), 32.0 (CH₂), 32.6 (CH₂), 117.4 (CH), 119.5 (CH), 125.0 (CH), 129.0 (CH), 129.7 (CH), 135.7 (C), 137.9 (C), 138.8 (C), 140.4 (C), 145.1 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₅H₁₄ClNO₂S: 307.0433, experimental: 307.0439.

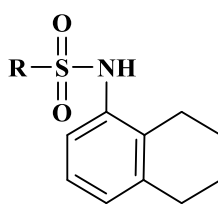
N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)naftalenosulfonamida (S21e)*Fórmula Molecular:** C₁₉H₁₇NO₂S**PM** = 323.410 g/mol**Rdto:** 88%**p.f.:** 112-115 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.86 (q, *J* = 7.5, 2H), 2.65 (t, *J* = 7.5, 4H), 6.67 (dd, *J* = 8, *J* = 2.1, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.94 (d, *J* = 8, 1H), 7.64-7.73 (m, 3H), 8.06 (d, *J* = 8, 1H), 8.11-8.18 (m, 2H), 8.74 (d, *J* = 8, 1H), 10.48 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.3 (CH₂), 31.9 (CH₂), 32.6 (CH₂), 116.1 (CH), 117.9 (CH), 124.7 (CH), 124.8 (CH), 124.9 (CH), 127.3 (CH), 127.9 (C), 128.4 (CH), 129.4 (CH), 130.1 (CH), 134.1 (C), 134.6 (CH), 135.0 (C), 136.0 (C), 139.5 (C), 144.9 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₉H₁₇NO₂S: C, 70.78; H, 5.00; N, 4.34; S, 9.94, experimental: C, 70.40; H, 5.25; N, 4.38; S, 9.69.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M+Na] calculado para C₁₉H₁₇NNaO₂S: 346.0878, experimental: 346.0883.



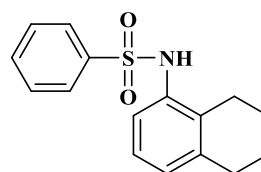
S22

***N*-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-il)benzenosulfonamida (S22a)**

Fórmula Molecular: C₁₆H₁₇NO₂S

PM = 287.380 g/mol

Rdto: 54 %



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.42-1.61 (m, 4H), 2.39 (t, *J* = 6, 2H), 2.64 (t, *J* = 6, 2H), 6.75 (d, *J* = 6.8, 1H), 6.87-7.10 (m, 2H), 7.51-7.70 (m, 5H), 9.42 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.5 (CH₂), 22.6 (CH₂), 24.7 (CH₂), 29.4 (CH₂), 124.0 (CH), 125.7 (CH), 126.8 (CH), 127.7 (CH), 129.5 (CH), 133.0 (CH), 133.8 (C), 134.8 (C), 138.3 (C), 141.1 (C).

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₆H₁₈NO₂S: 288.1053, experimental: 288.1045.

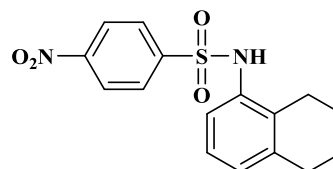
4-Nitro-*N*-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-il)benzenosulfonamida (S22b)

Fórmula Molecular: C₁₆H₁₆N₂O₄S

PM = 332.374 g/mol

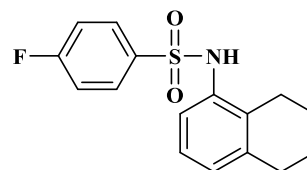
Rdto: 83%

p.f.: 171-174 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.54-1.58 (m, 4H), 2.42-2.46 (m, 2H), 2.64-2.66 (m, 2H), 6.68 (dd, *J* = 7.2, *J* = 2.1, 1H), 6.92-7.10 (m, 2H), 7.92 (d, *J* = 9, 2H), 8.40 (d, *J* = 9, 2H), 9.84 (s, 1H, NH).

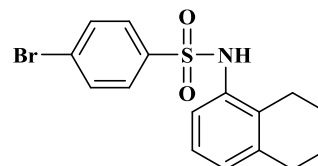
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.5 (CH₂), 22.6 (CH₂), 24.8 (CH₂), 29.3 (CH₂), 124.2 (CH), 124.9 (CH), 126.0 (CH), 128.2 (CH), 128.5 (CH), 134.2 (C), 134.3 (C), 138.7 (C), 146.67 (C), 150.0 (C).

4-Fluoro-N-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-il)bencenosulfonamida (S22c)**Fórmula Molecular:** C₁₆H₁₆FNO₂S**PM** = 305.367 g/mol**Rdto:** 78 %**p.f.:** 132-135 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.54-1.57 (m, 4H), 2.41 (t, *J* = 6, 2H), 2.65 (t, *J* = 6, 2H), 6.74 (d, *J* = 7.5, 1H), 6.91 (d, *J* = 7.5, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.5, 1H), 7.40 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.71 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.3, 2H), 9.47 (s, 1H, NH).

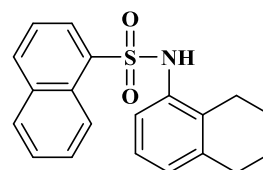
RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.5 (CH₂), 22.6 (CH₂), 24.7 (CH₂), 29.4 (CH₂), 116.7 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 124.1 (CH), 125.7 (CH), 127.8 (CH), 129.9 (d, *J*_{C-F} = 9.75, CH), 133.9 (C), 134.7 (C), 137.6 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 138.4 (C), 166.5 (d, *J*_{C-F} = 249.75, C).

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₁₆H₁₇FNO₂S: 306.0959, experimental: 306.0950.

4-Bromo-N-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-il)bencenosulfonamida (S22d)**Fórmula Molecular:** C₁₆H₁₆BrNO₂S**PM** = 366.273 g/mol**Rdto:** 70%

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.56-1.58 (m, 4H), 2.43 (t, *J* = 6, 2H), 2.66 (t, *J* = 6, 2H), 6.71 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.5, 1H), 6.92 (t, *J* = 7.5, 1H), 6.97 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.5, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.7, 2H), 9.55 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.5 (CH₂), 22.6 (CH₂), 24.8 (CH₂), 29.4 (CH₂), 124.0 (CH), 125.8 (CH), 126.8 (C), 127.9 (CH), 128.9 (CH), 132.6 (CH), 133.9 (C), 134.6 (C), 138.5 (C), 140.3 (C).

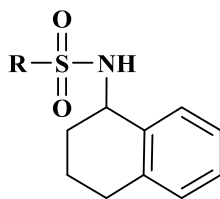
N-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-il)naftalenosulfonamida (S22e)**Fórmula Molecular:** C₂₀H₁₉NO₂S**PM** = 337.436 g/mol**Rdto:** 45%**p.f.:** 187-189 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.33-1.37 (m, 2H), 1.46-1.48 (m, 2H), 2.34 (t, *J* = 6.2, 2H), 3.38 (t, *J* = 6.2, 2H), 6.63 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.5, 1H), 6.84 (d, *J* = 7.5, 1H), 6.89 (d, *J* = 7.5, 1H), 7.57 (dd, *J* = 8.2, *J* = 7.4, 1H), 8.03 (dd, *J* = 7.4, *J* = 1.3, 1H), 8.05-8.10 (m, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.65-8.69 (m, 1H), 9.75 (s.a, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.4 (CH₂), 22.5 (CH₂), 24.6 (CH₂), 29.3 (CH₂), 123.7 (CH), 124.9 (CH), 125.1 (CH), 125.6 (CH), 127.2 (CH), 127.6 (CH), 127.9 (C), 128.0 (CH), 129.2 (CH), 129.3 (CH), 133.7 (C), 134.1 (C), 134.4 (CH), 134.8 (C), 136.4 (C), 138.3 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₀H₁₉NO₂S: C, 71.19; H, 5.68; N, 4.14; S, 9.48, experimental: C, 71.77; H, 4.17; N, 3.95; S, 9.44.

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M+H] calculado para C₂₀H₂₀NO₂S: 338.1209, experimental: 338.1202.



S23

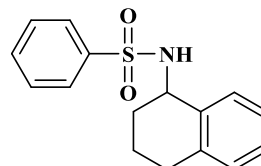
***N*-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)benzenosulfonamida (S23a)**

Fórmula Molecular: C₁₆H₁₇NO₂S

PM = 287.377 g/mol

Rdto: 98%

p.f.: 151-154 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.54-1.57 (m, 3H), 1.72-1.85 (m, 1H), 2.61-2.70 (m, 2H), 4.32-4.46 (m, 1H), 7.02-7.16 (m, 4H), 7.53-7.70 (m, 3H), 7.89 (dd, *J* = 8, *J* = 2, 2H), 8.10 (d, *J* = 8.5, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.6 (CH₂), 28.8 (CH₂), 30.4 (CH₂), 51.6 (CH), 126.0 (CH), 126.7 (CH), 127.3 (CH), 128.8 (CH), 129.1 (CH), 129.6 (CH), 132.6 (CH), 136.9 (C), 137.4 (C), 142.7 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₆H₁₇NO₂S: 287.0980, experimental: 287.0973.

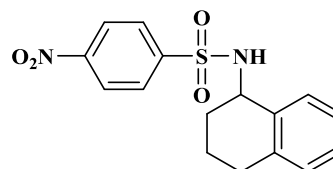
4-Nitro-*N*-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)benzenosulfonamida (S23b)

Fórmula Molecular: C₁₆H₁₆N₂O₄S

PM = 332.374 g/mol

Rdto: 83%

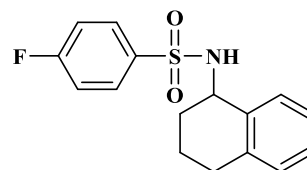
p.f.: 157-160 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.42-1.59 (m, 3H), 1.74-1.80 (m, 1H), 2.55-2.76 (m, 2H), 4.43-4.48 (m, 1H), 7.05-7.20 (m, 4H), 8.13 (d, *J* = 9.0, 2H), 8.45 (d, *J* = 9.0, 2H), 8.50 (d, *J* = 8.5, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.5 (CH₂), 28.7 (CH₂), 30.4 (CH₂), 51.8 (CH), 125.0 (CH), 126.2 (CH), 127.5 (CH), 128.2 (CH), 128.8 (CH), 129.2 (CH), 136.4 (C), 137.5 (C), 148.3 (C), 149.8 (C).

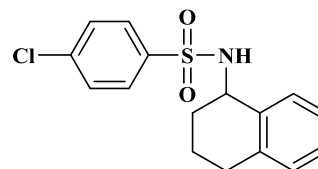
EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₆H₁₆N₂O₄S: 332.0831, experimental: 332.0829.

4-Fluoro-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)benzenosulfonamida (S23c)**Fórmula Molecular:** C₁₆H₁₆FNO₂S**PM** = 305.367 g/mol**Rdto:** 76%**p.f.:** 125-126 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.52-1.69 (m, 3H), 1.74-1.92 (m, 1H), 2.52-2.80 (m, 2H), 4.31-4.42 (m, 1H), 6.95-7.10 (m, 4H), 7.46 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.93 (dd, *J* = 8.8, *J* = 5.3, 2H), 8.13 (d, *J* = 8.5, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.5 (CH₂), 28.7 (CH₂), 30.4 (CH₂), 51.6 (CH), 116.7 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 126.1 (CH), 127.4 (CH), 128.8 (CH), 129.1 (CH), 129.7 (d, *J*_{C-F} = 9.7, CH), 136.7 (C), 137.4 (C), 139.1 (C), 164.3 (d, *J*_{C-F} = 247.5, C).

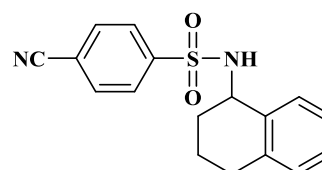
EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₆H₁₆FNO₂S: 305.0885, experimental: 305.0855.

4-Cloro-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)benzenosulfonamida (S23d)**Fórmula Molecular:** C₁₆H₁₆ClNO₂S**PM** = 321.819 g/mol**Rdto:** 34%**p.f.:** 172-174 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.50-1.57 (m, 3H), 1.58-1.71 (m, 1H), 2.57-2.71 (m, 2H), 3.78-3.88 (m, 1H), 6.98-7.16 (m, 4H), 7.65 (d, *J* = 8.3, 2H), 7.9 (d, *J* = 8.3, 2H), 8.15 (d, *J* = 7.0, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.6 (CH₂), 28.7 (CH₂), 30.4 (CH₂), 51.7 (CH), 126.1 (CH), 127.4 (CH), 128.7 (CH), 128.8 (CH), 129.1 (CH), 129.7 (CH), 136.7 (C), 137.4 (C), 137.5 (C), 141.7 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* calculado para C₁₆H₁₆ClNO₂S: 321.0590, experimental: 321.0604.

4-Ciano-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)benzenosulfonamida (S23e)**Fórmula Molecular:** C₁₇H₁₆N₂O₂S**PM** = 312.387 g/mol**Rdto:** 49%**p.f.:** 156-158 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.51-1.62 (m, 3H), 1.64-1.73 (m, 1H), 2.61-2.64 (m, 2H), 4.41-4.43 (m, 1H), 6.93-7.19 (m, 4H), 8.04 (d, *J* = 8.7, 2H), 8.12 (d, *J* = 8.7, 2H), 8.44 (d, *J* = 8.5, 1H, NH).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.5 (CH₂), 28.7 (CH₂), 30.4 (CH₂), 51.8 (CH), 115.1 (C), 118.2 (CN), 126.2 (CH), 127.4 (CH), 127.5 (CH), 128.8 (CH), 129.2 (CH), 133.8 (CH), 136.5 (C), 137.5 (C), 146.9 (C).

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M-H] calculado para C₁₇H₁₅N₂O₂S: 311.0854, experimental: 311.0858.

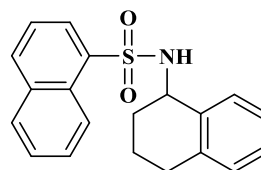
***N*-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)naftalenosulfonamida (S23f)**

Fórmula Molecular: C₂₀H₁₉NO₂S

PM = 337.440 g/mol

Rdto: 51%

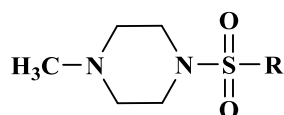
p.f.: 150-153 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.41-1.52 (m, 3H), 1.65-1.69 (m, 1H), 2.54-2.58 (m, 2H), 4.23-4.31 (m, 1H), 6.87-6.94 (m, 1H), 7.05 (dd, *J* = 7.0, *J* = 2.0, 1H), 7.47 (t, *J* = 7.0, 1H), 7.54-7.80 (m, 2H), 7.88 (t, *J* = 7.5, 1H), 8.10-8.15 (m, 2H), 8.26 (d, *J* = 7.5, 1H), 8.44 (d, *J* = 9, 1H), 8.62 (s.a, 1H, NH), 8.67-8.90 (m, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.5 (CH₂), 28.7 (CH₂), 30.5 (CH₂), 51.5 (CH), 124.9 (CH), 125.3 (CH), 125.9 (CH), 127.2 (CH), 127.5 (CH), 127.9 (C), 128.1 (CH), 128.8 (CH), 129.0 (CH), 129.3 (CH), 134.2 (CH), 136.7 (C), 136.9 (C), 137.5 (C), 137.7 (C), 149.1 (CH).

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M+Na] calculado para C₂₀H₁₉NNaO₂S: 360.1034, experimental: 360.1039.



S24

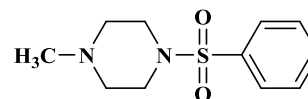
4-Fenilsulfonil-1-metil-piperazina (S24a)

Fórmula Molecular: C₁₁H₁₆N₂O₂S

PM = 240.323 g/mol

Rdto: 60%

p.f.: 130-134 °C (129-130 °C)²⁸



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.14 (s, 3H), 2.36 (t, *J* = 5, 4H), 2.88 (t, *J* = 5, 4H), 7.68-7.71 (m, 5H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.5 (CH₃), 46.0 (2CH₂), 53.8 (2CH₂), 127.9 (CH), 129.7 (CH), 133.6 (CH), 135.1 (C).

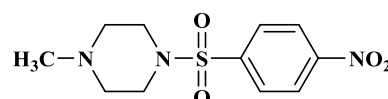
1-Metil-4-[(4-nitrofenil)sulfonil]piperazina (S24b)²⁹

Fórmula Molecular: C₁₁H₁₅N₃O₄S

PM = 285.321 g/mol

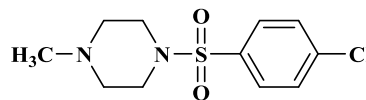
Rdto: 42%

p.f.: 159-160 °C



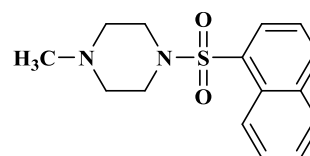
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.14 (s, 3H), 2.36 (t, *J* = 4.7, 4H), 2.97 (t, *J* = 4.7, 4H), 8.00 (d, *J* = 9, 2H), 8.45 (d, *J* = 9, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.6 (CH₃), 46.0 (CH₂), 53.8 (CH₂), 125.1 (CH), 129.4 (CH), 141.1 (C), 150.4 (C).

1-Metil-4-[(4-clorofenil)sulfonil]piperazina (S24c)**Fórmula Molecular:** C₁₁H₁₅ClN₂O₂S**PM** = 274.768 g/mol**Rdto:** 49%**p.f.:** 109-100 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.26 (s, 3H), 2.53 (m, 4H), 2.80-2.96 (m, 4H), 7.73-7.76 (m, 4H). **RMN ¹³C** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.0 (CH₃), 45.6 (CH₂), 53.5 (CH₂), 129.8 (CH), 130.0 (CH), 134.1 (C), 138.7 (C).

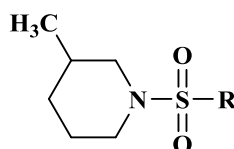
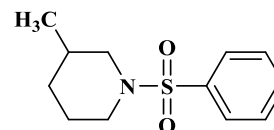
EM-AR (EI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₁H₁₆ClN₂O₂S: 275.0621, experimental: 275.0621.

1-Metil-4-(naftalen-1-il-sulfonil)piperazina (S24d)**Fórmula Molecular:** C₁₅H₁₈N₂O₂S**PM** = 290.382 g/mol**Rdto:** 99%**p.f.:** 121-124 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.06 (s, 3H), 2.23-2.27 (m, 4H), 3.04-3.09 (m, 4H), 7.59-7.79 (m, 3H), 8.13 (dd, *J* = 8.1, *J* = 1.5, 1H), 8.15 (dd, *J* = 7.3, *J* = 1.3, 1H), 8.29 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.66 (d, *J* = 8.5, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.5 (CH₃), 45.6 (CH₂), 54.1 (CH₂), 124.9 (CH), 125.0 (CH), 127.3 (CH), 128.5 (CH), 129.4 (CH), 130.6 (CH), 132.3 (C), 134.3 (C), 135.0 (CH).

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₉N₂O₂S: 291.1167, experimental: 291.1169.

**S25****1-Fenilsulfonil-3-metil-piperidina (S25a)****Fórmula Molecular:** C₁₂H₁₇NO₂S**PM** = 239.335 g/mol**Rdto:** 74%**p.f.:** 98-100 °C

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.82 (d, *J* = 6.4, 3H + m, 1H), 1.42-1.46 (m, 1H), 1.61-1.63 (m, 3H), 1.85 (t, *J* = 11, 1H), 2.17 (td, *J* = 11.5, *J* = 3, 1H), 3.46-3.51 (m, 2H), 7.69-7.72 (m, 5H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.1 (CH₃), 24.5 (CH₂), 30.5 (CH), 31.6 (CH₂), 46.5 (CH₂), 53.0 (CH₂), 127.7 (CH), 129.7 (CH), 133.6 (CH), 135.9 (C).

Análisis elemental: calculado para C₁₂H₁₇NO₂S: C, 60.22; H, 7.16; N, 5.85; S, 13.40, experimental: C, 60.60; H, 7.51; N, 5.66; S, 13.45.

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₂H₁₈NO₂S: 240.1058, experimental: 240.1061.

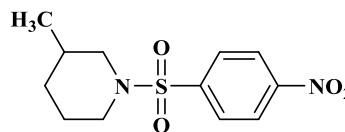
3-Metil-1-[(4-nitrofenil)sulfonil]piperidina (S25b)

Fórmula Molecular: C₁₂H₁₆N₂O₄S

PM = 284.332 g/mol

Rdto: 81%

p.f.: 147-150 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.83 (d, *J* = 6.4, 3H), 0.85-0.89 (m, 1H), 1.43-1.45 (m, 1H), 1.63-1.66 (m, 3H), 1.99 (t, *J* = 11, 1H), 2.30 (td, *J* = 11.5, *J* = 2.4, 1H), 3.53 (t, *J* = 10.5, 2H), 8.0 (d, *J* = 9, 2H), 8.44 (d, *J* = 9, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.0 (CH₃), 24.5 (CH₂), 30.6 (CH), 31.5 (CH₂), 46.4 (CH₂), 52.8 (CH₂), 125.0 (CH), 129.3 (CH), 141.8 (C), 150.3 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₂H₁₇N₂O₄S: 285.0909, experimental: 285.0902.

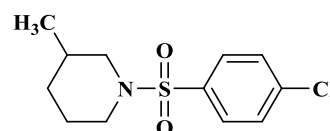
3-Metil-1-[(4-clorofenil)sulfonil]piperidina (S25c)

Fórmula Molecular: C₁₂H₁₆ClNO₂S

PM = 273.780 g/mol

Rdto: 43%

p.f.: 111-113 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.83 (d, *J* = 6.4, 3H), 0.82-0.84 (m, 1H), 1.42-1.46 (m, 1H), 1.60-1.63 (m, 3H), 1.91 (t, *J* = 10.5, 1H), 2.21 (td, *J* = 11.5, *J* = 3, 1H), 3.43-3.48 (m, 2H), 7.69-7.72 (m, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.0 (CH₃), 24.4 (CH₂), 30.5 (CH), 31.5 (CH₂), 46.4 (CH₂), 52.9 (CH₂), 129.7 (CH), 129.9 (CH), 134.8 (C), 138.3 (C).

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₂H₁₇ClNO₂S: 274.0669, experimental: 274.0663.

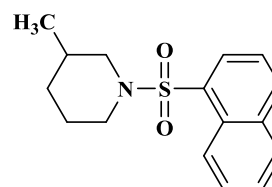
3-Metil-4-(naftalen-1-il-sulfonil)piperidina (S25d)

Fórmula Molecular: C₁₆H₁₉NO₂S

PM = 289.394 g/mol

Rdto: 84%

p.f.: 65-69 °C

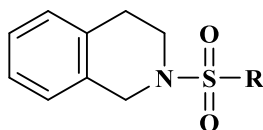


RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.78 (d, *J* = 6.4, 3H), 0.8-0.7 (m, 1H), 1.35-1.38 (m, 1H), 1.61-1.64 (m, 3H), 2.2 (t, *J* = 10.2, 1H), 2.53-2.56 (m, 1H), 3.57-3.61 (m, 2H), 7.69-7.72 (m, 3H), 8.10 (dd, *J* = 8.7, *J* = 1.5, 1H), 8.15 (dd, *J* = 7.5, *J* = 1.1, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.67 (d, *J* = 8.7, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 18.9 (CH₃), 24.7 (CH₂), 30.7 (CH), 31.7 (CH₂), 45.9 (CH₂), 52.4 (CH₂), 125.0 (CH), 125.0 (CH), 127.3 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (C), 129.4 (CH), 130.2 (CH), 133.3 (C), 134.3 (C), 134.7 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₁₆H₁₉NO₂S(H₂O)_{0.4}: C, 64.79; H, 6.73; N, 4.72; S, 10.81, experimental: C, 65.06; H, 7.02; N, 5.07; S, 10.65.

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₆H₂₀NO₂S: 290.1215, experimental: 290.1212.



S26

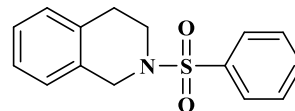
2-(fenilsulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (S26a)

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₅NO₂S

PM = 273.351 g/mol

Rdto: 97%

p.f.: 156-158 °C (158-159 °C)³⁰



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.84 (t, *J* = 5.7, 2H), 3.22 (t, *J* = 5.7, 2H), 4.20 (s, 2H), 7.12-7.14 (m, 4H), 7.64 (t, *J* = 7, 2H), 7.69 (d, *J* = 7, 1H), 7.82 (d, *J* = 7, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.3 (CH₂), 43.9 (CH₂), 47.6 (CH₂), 126.5 (CH), 126.8 (CH), 127.0 (CH), 127.8 (CH), 129.0 (CH), 129.8 (CH), 131.9 (C), 133.3 (C), 133.6 (CH), 136.3 (C).

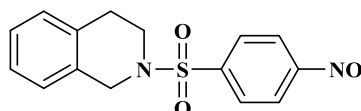
2-[(4-nitrofenil)sulfonil]-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (S26b)

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₄N₂O₄S

PM = 318.349 g/mol

Rdto: 45%

p.f.: 171 °C (161 °C)³¹



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.86 (t, *J* = 6, 2H), 3.40 (t, *J* = 6, 2H), 4.30 (s, 2H), 7.14-7.17 (m, 4H), 8.10 (d, *J* = 9, 2H), 8.41 (d, *J* = 9, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.2 (CH₂), 43.8 (CH₂), 47.4 (CH₂), 125.0 (CH), 126.5 (CH), 126.7 (CH), 127.1 (CH), 129.1 (CH), 129.3 (CH), 131.7 (C), 133.2 (C), 142.2 (C), 150.4 (C).

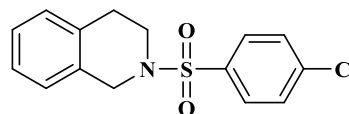
2-[(4-clorofenil)sulfonil]-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (S26c)

Fórmula Molecular: C₁₅H₁₄ClNO₂S

PM = 307.796 g/mol

Rdto: 99%

p.f.: 154-156 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.85 (t, *J* = 6, 2H), 3.35 (t, *J* = 6, 2H), 4.22 (s, 2H), 7.12-7.15 (m, 4H), 7.70 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.84 (d, *J* = 8.7, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.3 (CH₂), 43.8 (CH₂), 47.5 (CH₂), 126.5 (CH), 126.8 (CH), 127.0 (CH), 129.0 (CH), 129.7 (CH), 129.9 (CH), 131.8 (C), 133.3 (C), 135.3 (C), 138.5 (C).

EM-AR (TOF⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₁₅H₁₅ClNO₂S: 308.0507, experimental: 308.0504.

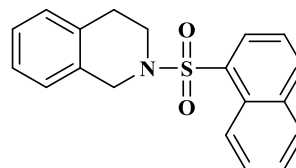
2-(naftalen-1-il-sulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (S26d)

Fórmula Molecular: C₁₉H₁₇NO₂S

PM = 323.410 g/mol

Rdto: 94%

p.f.: 135-137 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.81 (t, *J* = 6, 2H), 3.52 (t, *J* = 6, 2H), 4.40 (s, 2H), 7.10-7.13 (m, 4H), 7.65-7.71 (m, 3H), 8.1 (dd, *J* = 8, *J* = 1.3, 1H), 8.2 (dd, *J* = 7.3, *J* = 1.3, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.65 (d, *J* = 8.3, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.5 (CH₂), 43.2 (CH₂), 46.8 (CH₂), 121.0 (C), 124.8 (CH), 125.0 (CH), 126.4 (CH), 126.7 (CH), 127.0 (CH), 127.3 (CH), 128.3 (C), 128.6 (CH), 129.1 (CH), 129.5 (CH), 130.2 (CH), 132.2 (C), 133.4 (C), 134.3 (C), 134.9 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₁₉H₁₇NO₂S: C, 70.56; H, 5.30; N, 4.33; S, 9.91, experimental: C, 70.43; H, 5.45; N, 4.34; S, 9.90.

EM-AR (EI⁺): *m/z* [M + Na] calculado para C₁₉H₁₈NNaO₂S: 346.0872, experimental: 346.0890.

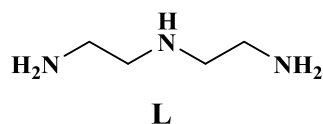
3.1.4. Síntesis de las poliaminas L1-L5

La obtención de los derivados **L1(a-e)**, **L2(a, c-e)**, **L3a** y **L5a** se llevó cabo mediante una secuencia sintética en cuatro pasos: 1) protección de la amina precursora **L** (3.1.4.1); 2) alquilación de la amina protegida **L-ft** (3.1.4.2); 3) desprotección de **L1-ft**, **L2-ft**, **L3-ft** y **L4-ft** (3.1.4.3) y 4) funcionalización, por aminación reductiva para la obtención de las poliaminas **L1(a-d)**, **L2(a, c-d)**, **L3a** y **L5a** (3.1.4.4) y, por reacción con los correspondientes ésteres heterociclos para la obtención de las amidas **L1e** y **L2e**. El derivado **L4** se obtuvo de fuentes comerciales y posteriormente se funcionalizó, de manera análoga a los derivados anteriormente enumerados, por aminación reductiva para la obtención de las poliaminas **L4a** y **L4c** (3.1.4.4).

3.1.4.1. Protección de la amina precursora (L)

Procedimiento

A una disolución de anhídrido ftálico (50.22 g; 339.1 mmol) en ácido acético glacial (160 mL) sometida a agitación, se le añadió lentamente, con ayuda de un embudo de adición, la amina precursora, 1,5-diamino-3-azapentano **L** (17.03 g; 165.4 mmol). Tras 45 min de adición, la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 1.5 horas, en agitación y atmósfera inerte de N₂. Transcurrido el tiempo de reacción se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose como crudo de reacción un aceite de color marrón que, posteriormente, se recristalizó de etanol. El sólido blanco precipitado se aisló por filtración y se lavó con etanol frío. Finalmente, el producto **L-ft** (51.08 g, 140.7 mmol) se secó a 60 °C y a presión reducida durante 24 horas.



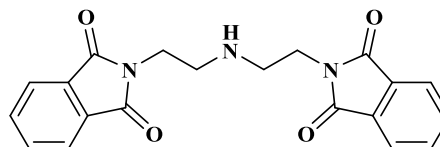
1,5-Diftalimido-3-azapentano (**L-ft**)³²

Fórmula Molecular: C₂₀H₁₇N₃O₄

PM = 363.122 g/mol

Rdto: 83%

p.f.: 181-182 °C (180 °C)^{32b}



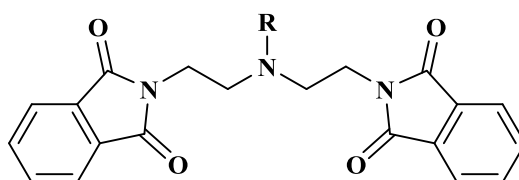
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.46 (s.a, 1H, NH), 2.95 (t, *J* = 6.1, 4H), 3.77 (t, *J* = 6.2, 4H), 7.70 – 7.80 (m, 8H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ = 37.9 (CH₂), 47.6 (CH₂), 123.5 (CH), 132.5 (C), 134.1 (CH), 168.8 (C).

3.1.4.2. *N*-alquilación

Procedimiento general

Una disolución de **L-ft**, el haluro de alquilo/arilsulfonilo correspondiente y un exceso de K_2CO_3 , en 300 mL MeCN seco en agitación, se sometió a reflujo en atmósfera inerte de N_2 . Transcurrido el tiempo de reacción, seguida por CCF y, una vez alcanzada la temperatura ambiente, se eliminó el K_2CO_3 por filtración y el disolvente a presión reducida. A continuación, el crudo de reacción seco se disolvió en H_2O (100 mL) y se realizó una extracción con CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). Tras el secado de la fase orgánica con Na_2SO_4 y posterior filtración, se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose un aceite que se recrystalizó de EtOH. Posteriormente, la disolución se mantuvo a temperatura ambiente facilitando la precipitación de un sólido blanco que se aisló por filtración y se lavó con etanol frío. Finalmente, el producto alquilado correspondiente (**L1-ft**, **L2-ft**, **L3-ft** o **L5-ft**) se secó a 60 °C y a presión reducida durante 24 horas.



3-(2-Naftilmetil)-1,5-difalimido-3-azapentano (**L1-ft**)³³

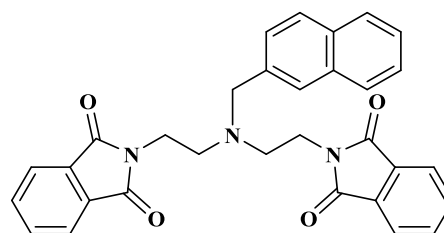
Siguiendo el procedimiento general de síntesis, una disolución de **L-ft** (14.02 g; 38.6 mmol), 2-(bromometil)naftaleno (13.66 g; 61.8 mmol), K_2CO_3 (8.56 g; 61.8 mmol) y una punta de espátula de KI, en 500 mL de MeCN seco en agitación, se sometió a reflujo en atmósfera inerte de N_2 durante 72 horas. El sólido blanco obtenido (16.14 g) no precisó purificación alguna, obteniéndose 16.18 g un producto puro que se caracterizó como **L1-ft**.

Fórmula Molecular: $C_{31}H_{25}N_3O_4$

PM = 503.558 g/mol

Rdto: 83%

p.f.: 177-178 °C



RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.87 (t, J = 6, 4H), 3.79 (t, J = 6, 4H), 3.76 (s, 2H), 7.16 (d, J = 8, 1H), 7.20 (d, J = 8, 1H), 7.23-7.49 (m, 2H), 7.45-7.55 (m, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.58-7.61 (m, 1H), 7.62-7.69 (m, 8H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 36.2 (CH_2), 52.2 (CH), 58.8 (CH_2), 123.3 (CH), 125.7 (CH), 126.1 (CH), 127.5 (C), 127.9 (CH), 128.0 (CH), 128.0 (CH), 132.7 (C), 132.9 (C), 133.5 (CH), 134.0 (C), 136.8 (CH), 168.5 (C).

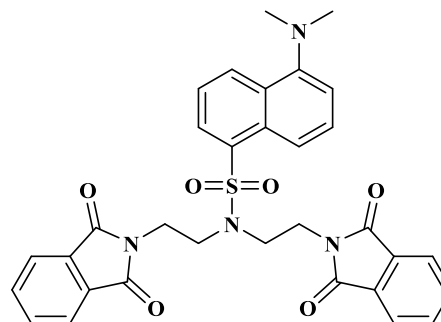
3-Dansil-1,5-difalimido-3-azapentano (L2-ft)³⁴

Siguiendo el procedimiento general de síntesis, una disolución de **L-ft** (11.0 g; 30.3 mmol), cloruro de dansilo (13.07 g; 48.4 mmol) y K₂CO₃ (6.67 g; 48.4 mmol), en 300 mL de MeCN seco en agitación, se sometió a reflujo en atmósfera inerte de N₂ durante 24 horas. El sólido amarillo obtenido no precisó purificación, obteniéndose 16.97 g de un producto puro que se caracterizó como **L2-ft**.

Fórmula Molecular: C₃₂H₂₈N₄O₆S

PM = 596.173 g/mol

Rdto: 94 %



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.63 (s, 6H), 3.78–3.88 (m, 8H), 6.61 (d, *J* = 7, 1H), 7.12–7.18 (dd, *J* = 9, 1H), 7.28–7.33 (dd, *J* = 9, 1H), 7.55 (s, 8H), 7.70 (d, *J* = 9, 1H), 8.03–8.06 (dd, *J* = 7, 1H), 8.85 (d, *J* = 8, 1H).

3-(Naftil-1-sulfonil)-1,5-difalimido-3-azapentano (L3-ft)

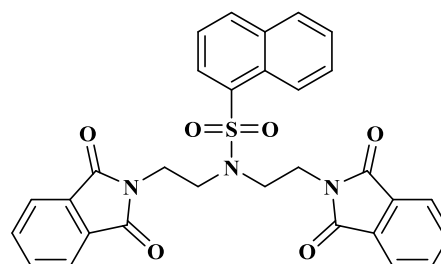
Siguiendo el procedimiento general de síntesis, una disolución de **L-ft** (0.67 g; 1.85 mmol), cloruro de sulfonil-1-naftaleno (0.67 g; 2.96 mmol) y K₂CO₃ (0.5 g; 3.62 mmol), en 300 mL de MeCN seco en agitación, se sometió a reflujo en atmósfera inerte de N₂ durante 24 horas. El sólido blanco obtenido no precisó purificación, obteniéndose 0.93 g de un producto puro que se caracterizó como **L3-ft**.

Fórmula Molecular: C₃₀H₂₃N₃O₆S

PM = 553.131g/mol

Rdto: 91%

p.f.: 206–208 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.81 (s, 8H), 7.18 (ddd, *J* = 8.2, *J* = 6.9, *J* = 1, 1H), 7.41 (ddd, *J* = 8.7, *J* = 6.9, *J* = 1.4, 1H), 7.44 (dd, *J* = 8.2, *J* = 7.4, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.2, 1H), 7.61–7.64 (m, 4H), 7.72–7.75 (m, 4H), 7.84 (d, *J* = 8.2, 1H), 7.96 (dd, *J* = 7.4, *J* = 1.2, 1H), 7.95 (dd, *J* = 8.7, *J* = 1, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 34.6 (CH₂), 42.5 (CH₂), 123.3 (CH), 123.8 (CH), 124.5 (CH), 126.8 (CH), 127.1 (C), 128.2 (CH), 129.1 (CH), 130.4 (CH), 131.6 (C), 133.6 (C), 133.7 (C), 134.4 (CH), 134.63 (CH), 167.82 (C).

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₃₀H₂₄N₃O₆S: 554.1380, experimental: 554. 1398.

3-(Quinolil-8-sulfonil)-1,5-difalimido-3-azapentano (L5-ft)

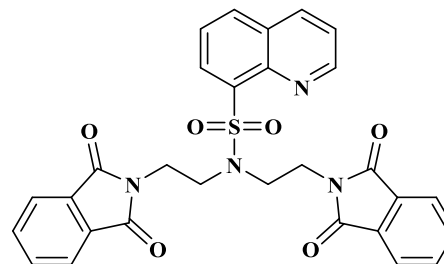
Siguiendo el procedimiento general de síntesis, una disolución de **L-ft** (0.65 g; 1.78 mmol), cloruro de sulfonil-8-quinolina (0.65 g; 2.85 mmol) y K_2CO_3 (0.5 g; 3.62 mmol), en 300 mL de MeCN seco en agitación, se sometió a reflujo en atmósfera inerte de N_2 durante 24 horas. El sólido blanco obtenido no precisó purificación, obteniéndose 0.66 g de un producto puro que se caracterizó como **L5-ft**.

Fórmula Molecular: $C_{29}H_{22}N_4O_6S$

PM = 554.126g/mol

Rdto: 67 %

p.f.: 229-230 °C



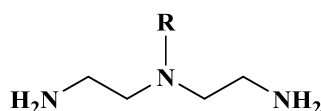
RMN 1H (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 3.79 (t, J = 5.7, 4H), 3.99 (t, J = 5.7, 4H), 7.39-7.43 (m, 2H), 7.56-7.60 (m, 4H), 7.70 (dd, J = 8.3, J = 1.5, 1H), 7.72-7.77 (m, 4H), 7.96 (dd, J = 8.3, J = 1.8, 1H), 8.05 (dd, J = 7.3, J = 1.5, 1H), 8.88 (dd, J = 4.2, J = 1.8, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 34.9 (CH_2), 43.6 (CH_2), 122.4 (CH), 123.3 (CH), 125.4 (CH), 128.4 (C), 131.5 (C), 131.7 (CH), 133.7 (CH), 134.3 (CH), 136.7 (CH), 137.5 (C), 142.6 (C), 151.4 (CH), 167.8 (C).

EM-AR (ESI $^+$): m/z [M + H] calculado para $C_{29}H_{22}N_4O_6S$: 555.1333, experimental: 555. 1357.

3.1.4.3. Desprotección**Procedimiento general**

A una disolución de la amina protegida **L-ft**, en EtOH seco (300 mL) en agitación, se le adicionó lentamente, gota a gota, hidracina monohidratada ($N_2H_4 \cdot H_2O$) en exceso, sometiéndose la mezcla de reacción a reflujo durante 24 horas en atmósfera inerte de N_2 . Finalizada la reacción y alcanzada la temperatura ambiente, se eliminó el precipitado formado por filtración y el disolvente a presión reducida. El aceite obtenido se disolvió en $CHCl_3$ (200 mL) y se mantuvo en agitación durante 12 horas, realizándose ciclos sucesivos de filtración y disolución en cloroformo hasta no observarse la formación de precipitado. Finalmente, se eliminó el disolvente obteniéndose un aceite amarillo que se identificó como la amina correspondiente **L1**, **L2**, **L3** o **L5**.



4-(2-Naftilmetil)-1,4,7-triazaheptano (L1)^{33a}

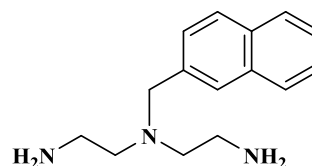
Siguiendo el procedimiento general de síntesis, a una disolución de **L1-ft** (7.08 g, 14.1 mmol) en EtOH seco (300 mL) se le adicionó lentamente $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (13.7 mL, 281.2 mmol).

Tras tres lavados con cloroformo y eliminación del disolvente a presión reducida, se obtuvieron 2.75 g de un aceite amarillo, que no precisó purificación, caracterizado como **L1**.

Fórmula Molecular: $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3$

PM = 243.354 g/mol

Rdto: 81%



RMN ¹H (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.56 (s, 4H, NH), 2.48 (t, J = 6.1, 4H), 2.69 (t, J = 6.1, 4H), 3.68 (s, 2H), 7.42–7.38 (m, 3H), 7.65 (s, 1H), 7.70–7.77 (m, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl_3): δ = 40.1 (CH_2), 57.7 (CH_2), 59.8 (CH_2), 126.0 (CH), 126.4 (CH), 127.5 (CH), 127.7 (CH), 128.0 (CH), 128.0 (CH), 128.4 (CH), 133.1 (C), 133.7 (C), 137.6 (C).

4-Dansil-1,4,7-triazaheptano (L2)³⁴

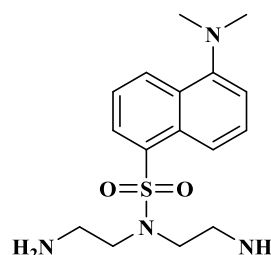
Siguiendo el procedimiento general de síntesis, a una disolución de **L2-ft** (5.10 g, 8.5 mmol) en EtOH seco (300 mL) se le adicionó lentamente $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8.32 mL, 171.1 mmol).

Tras dos lavados con cloroformo y eliminación del disolvente a presión reducida, se obtuvieron 2.73 g de un aceite amarillo, que no precisó purificación, caracterizado como **L2**.

Fórmula Molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$

PM = 336.454 g/mol

Rdto: 95 %



RMN ¹H (300 MHz, CDCl_3): δ = 2.03 (s, 4H, NH), 2.82 (m, 10H), 3.31 (t, J = 6.3, 4H), 7.12 (dd, J = 7.4, J = 0.4, 1H), 7.45–7.53 (m, 2H), 8.13 (dd, J = 7.4, J = 1.2, 1H), 8.26 (d, J = 8.7, 1H), 8.49 (d, J = 8.7, 1H).

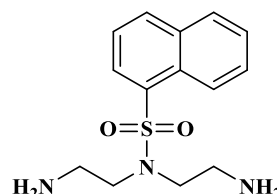
4-(Naftil-1-sulfonil)-1,4,7-triazaheptano (L3)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis, a una disolución de **L3-ft** (0.53 g, 0.96 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.93 mL, 19.2 mmol). Tras tres lavados con cloroformo y eliminación del disolvente a presión reducida, se obtuvieron 0.21 g de un aceite amarillo, que no precisó purificación, caracterizado como **L3**.

Fórmula Molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$

PM = 293.120 g/mol

Rdto: 75%



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 2.33 (t, J = 6.4, 4H), 3.34 (t, J = 6.4, 4H), 7.53 (dd, J = 8.3, J = 7.4, 1H), 7.60 (ddd, J = 8.3, J = 6.9, J = 1.3, 1H), 7.66 (ddd, J = 8.6, J = 6.9, J = 1.5, 1H), 7.93 (dd, J = 8.3, J = 1.1, 1H), 8.06 (d, J = 8.3, 1H), 8.21 (dd, J = 7.4, J = 1.3, 1H), 8.66 (dd, J = 8.6, J = 1.1, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 40.8 (CH_2), 51.4 (CH_2), 124.5 (CH), 125.1 (CH), 127.3 (CH), 128.6 (CH), 129.0 (C), 129.5 (CH), 130.1 (CH), 134.7 (CH), 134.8 (C), 134.9 (C).

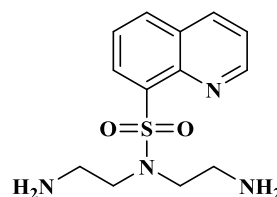
4-(Quinolil-8-sulfonil)-1,4,7-triazaheptano (L5)

Siguiendo el procedimiento general de síntesis, a una disolución de **L5-ft** (0.51 g, 0.92 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.89 mL, 18.40 mmol). Tras tres lavados con cloroformo y eliminación del disolvente a presión reducida, se obtuvieron 0.20 g de un aceite amarillo, que no precisó purificación, caracterizado como **L5**.

Fórmula Molecular: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$

PM = 294.373 g/mol

Rdto: 76%



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.68 (s.a, 4H, NH), 2.79 (t, J = 6.4, 4H), 3.42 (t, J = 6.4, 4H), 7.45 (dd, J = 8.3, J = 4.2, 1H), 7.54 (t, J = 7.8, 1H), 7.95 (d, J = 8.2, 1H), 8.16 (dd, J = 8.3, J = 1.5, 1H), 8.44 (dd, J = 7.8, J = 1.4, 1H), 8.98 (dd, J = 4.2, J = 1.5, 1H).

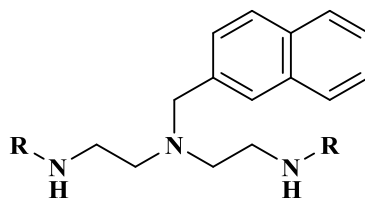
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ = 40.2 (CH_2), 51.7 (CH_2), 121.1 (CH), 124.5 (CH), 128.0 (CH), 132.4 (CH), 132.5 (C), 135.6 (CH), 136.4 (C), 142.9 (C), 150.1 (CH).

3.1.4.4. Funcionalización por aminación reductiva

Procedimiento general

A una disolución del derivado 1,4,7-triazaheptano *N*-4 sustituido (**L1-L5**) en EtOH seco (100-200 mL), manteniéndose en agitación y bajo atmósfera inerte de N₂, se le adicionó lentamente, gota a gota, una solución del correspondiente carbaldehído (1.1 equivalentes por grupo amino) en 50-100 mL de EtOH seco. Tras 1 hora de adición, la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Posteriormente, se adicionaron 10 equivalentes de NaBH₄, manteniendo la mezcla de reacción durante 6-12 horas a temperatura ambiente en agitación. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y se realizó una extracción H₂O/CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). La fase orgánica se concentró a sequedad, obteniéndose un aceite amarillo que se fraccionó por cromatografía en columna con el eluyente apropiado en cada caso.

Finalmente, se precipitó el hidrocloreto de la amina correspondiente en CH₂Cl₂ seco por adición de ácido clorhídrico/dioxano 1M (3 mL). El sólido se aisló por filtración y se secó a 60 °C a presión reducida durante 48 horas. Para determinados derivados, tras la obtención del clorhidrato se procedió a su recrystalización de EtOH.



L1

1,7-Bis(2-piridilmetil)-4-(2-naftilmetil)-1,4,7-triazaheptano (L1a)³⁵

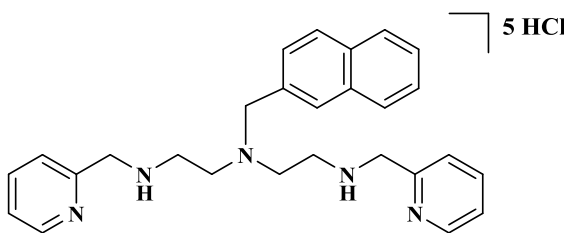
A una disolución de L1 (1.30 g, 5.3 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente 2-piridinacetaldehído (1.26 g, 11.7 mmol) disuelta en el mismo disolvente (50 mL). La reacción se mantuvo durante 4 horas en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N₂. Posteriormente, se adicionó de manera fraccionada NaBH₄ (0.61 g, 16.0 mmol) y, al cabo de 6 horas de reducción *in situ*, se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito. A continuación, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina neutra (CHCl₃/MeOH 95:5), obteniéndose 1.25 g de un aceite puro que, posteriormente, se precipitó en forma clorhidrato.

Fórmula Molecular: C₂₇H₃₆Cl₅N₅

PM = 607.872 g/mol

Rdto: 55%

p.f.: 167-169 °C



RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ = 3.26 (m, 8H), 4.10 (s, 2H), 4.29 (s, 4H), 7.47 (dd, *J* = 8.5, *J* = 1.8, 1H), 7.50-7.54 (m, 2H), 7.59 (d, *J* = 7.8, 2H), 7.64 (ddd, *J* = 7.8, *J* = 5.4, *J* = 1.2, 2H), 7.77-7.84 (m, 3H), 7.87 (s, 1H), 8.11 (td, *J* = 7.8, *J* = 1.7, 2H), 8.51 (ddd, *J* = 5.4, *J* = 1.7, *J* = 0.8, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ = 44.2 (CH₂), 48.9 (CH₂), 50.7 (CH₂), 59.2 (CH₂), 126.7 (CH), 126.9 (CH), 127.6 (CH), 127.6 (CH), 128.3 (CH), 128.3 (CH), 129.4 (CH), 129.6 (CH), 130.0 (CH), 131.1 (C), 133.1 (C), 133.2 (C), 144.7 (CH), 145.2 (CH), 147.3 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₇H₃₆Cl₅N₅(H₂O)_{0.8}: C, 52.11; H, 6.09; N, 11.25, experimental: C, 52.39; H, 6.04; N, 11.25.

1,7-Bis(3-piridilmetil)-4-(2-naftilmetil)-1,4,7-triazaheptano (L1b)

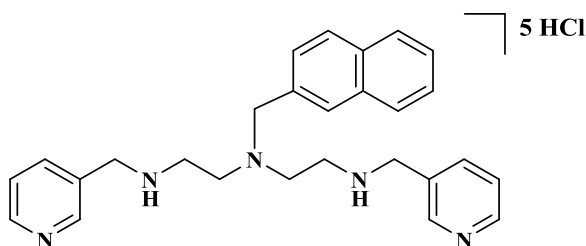
A una disolución de L1 (1.52 g, 6.2 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente 3-piridinacetaldehído (1.47 g, 13.7 mmol) disuelta en el mismo disolvente (50 mL). La reacción se mantuvo durante 4 horas en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N₂. Posteriormente se adicionó de manera fraccionada NaBH₄ (0.71 g, 18.7 mmol) y, al cabo de 6 horas de reducción *in situ*, se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito, obteniéndose 1.83 g de un aceite puro que se precipitó en forma clorhidrato.

Fórmula Molecular: C₂₇H₃₆Cl₅N₅

PM = 607.872 g/mol

Rdto: 69%

p.f.: 181-182 °C



RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ = 3.28 (m, 8H), 4.07 (s, 2H), 4.38 (s, 4H), 7.51 (dd, *J* = 8.5, *J* = 1.8, 1H), 7.52-7.57 (m, 3H), 7.81-7.86 (m, 3H), 8.0 (ddd, *J* = 8.1, *J* = 6.0, *J* = 0.7, 2H), 8.55 (td, *J* = 8.1, *J* = 1.8, 2H), 8.75 (d, *J* = 6.0, 2H), 8.79 (d, *J* = 1.8, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ = 44.7 (CH₂), 47.4 (CH₂), 50.8 (CH₂), 59.4 (CH₂), 127.4 (CH), 127.7 (CH), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 128.2 (CH), 129.1 (CH), 129.4 (CH), 130.2 (CH), 131.0 (C), 132.9 (C), 133.1 (C), 133.2 (C), 142.5 (CH), 142.6 (CH), 148.5 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₂₇H₃₆Cl₅N₅(H₂O)₂: C, 50.36; H, 6.26; N, 10.87, experimental: C, 50.35; H, 6.04; N, 10.62.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₂₇H₃₁N₅: 426.2652, experimental: 426.2662.

1,7-Bis(4-piridilmetil)-4-(2-naftilmetil)-1,4,7-triazaheptano (L1c)^{33a}

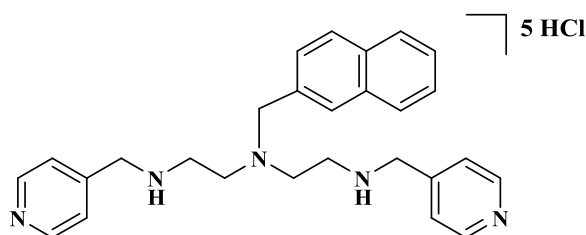
A una disolución de L1 (1.03 g, 4.2 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente 4-piridinacetaldehído (1 g, 9.3 mmol) disuelta en el mismo disolvente (50 mL). La reacción se mantuvo durante 4 horas en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N₂. Posteriormente, se adicionó de manera fraccionada NaBH₄ (0.48 g, 12.7 mmol) y, al cabo de 6 horas de reducción *in situ*, se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito, obteniéndose 1.46 g de un aceite puro que se precipitó en forma clorhidrato. Finalmente L1c(HCl)₅ se recristalizó de etanol.

Fórmula Molecular: C₂₇H₃₆Cl₅N₅

PM = 607.872 g/mol

Rdto: 81%

p.f.: 176-177 (177-178 °C)^{33a}



RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ = 3.19 (t, *J* = 6.4, 4H), 3.31 (t, *J* = 6.4, 4H), 3.98 (s, 2H), 4.33 (s, 4H), 7.49-7.52 (m, 4H), 7.75-7.79 (m, 3H), 7.86 (d, *J* = 6.9, 4H), 8.65 (d, *J* = 6.9, 4H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ = 45.3 (CH₂), 49.4 (CH₂), 50.4 (CH₂), 59.2 (CH₂), 127.4 (CH), 127.5 (CH), 127.9 (CH), 128.2 (CH), 128.3 (CH), 129.3 (CH), 129.3 (CH), 133.0 (C), 133.2 (C), 134.0 (C), 142.1 (CH), 151.35 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₇H₃₆Cl₅N₅(H₂O): C, 51.81; H, 6.12; N, 11.20, experimental: C, 51.64; H, 6.58; N, 11.10.

1,7-Bis(4-quinolilmetil)-4-(2-naftilmetil)-1,4,7-triazaheptano (L1d)

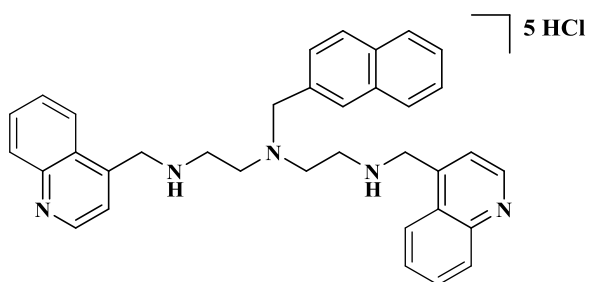
A una disolución de **L1** (1.48 g, 6.1 mmol) en EtOH seco (150 mL) se le añadió lentamente 4-quinolinacetaldehído (2.10 g, 13.4 mmol) disuelta en 100 mL de EtOH seco y 40 mL de MeCN seco. La reacción se mantuvo durante 12 horas en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N₂. Posteriormente, se adicionó de manera fraccionada NaBH₄ (0.70 g, 18.24 mmol). y al cabo de 24 horas de reducción *in situ*, se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito. A continuación, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina neutra (CHCl₃/MeOH 70:30), obteniéndose 1.98 g de un aceite puro que se precipitó en forma clorhidrato.

Fórmula Molecular: C₃₅H₄₀Cl₅N₅

PM = 707.989 g/mol

Rdto: 62%

p.f.: 202-205 °C

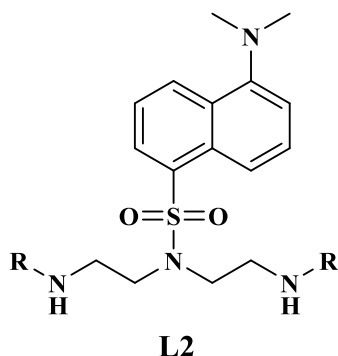


RMN ¹H (500 MHz, D₂O): δ = 3.26 (t, *J* = 6.4, 4H), 3.58 (t, *J* = 6.4, 4H), 3.94 (s, 2H), 4.67 (s, 4H), 7.07-7.12 (m, 1H), 7.18-7.23 (m, 2H), 7.48-7.54 (m, 3H), 7.84 (s, 1H), 7.93-8.10 (m, 6H), 8.17-8.27 (m, 4H), 9.12 (d, *J* = 5.7, 2H).

RMN ¹³C (125 MHz, D₂O): δ = 45.9 (CH₂), 45.9 (CH₂), 49.5 (CH₂), 58.6 (CH₂), 120.0 (CH), 121.8 (CH), 124.2 (CH), 126.8 (CH), 126.9 (CH), 127.2 (CH), 127.4 (CH), 127.9 (CH), 129.2 (CH), 132.8 (C), 131.5 (CH), 132.4 (C), 132.8 (C), 135.8 (CH), 136.6 (C), 137.4 (CH), 144.1 (CH), 149.2 (C), 149.3 (C).

Análisis elemental: calculado para C₃₅H₄₀Cl₅N₅(H₂O)₂: C, 56.50; H, 5.96; N, 9.41, experimental: C, 56.57; H, 5.30; N, 9.37.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₃₅H₃₅N₅: 526.2965, experimental: 526.2987



1,7-Bis(2-piridilmetil)-4-dansil-1,4,7-triazaheptano (L2a)

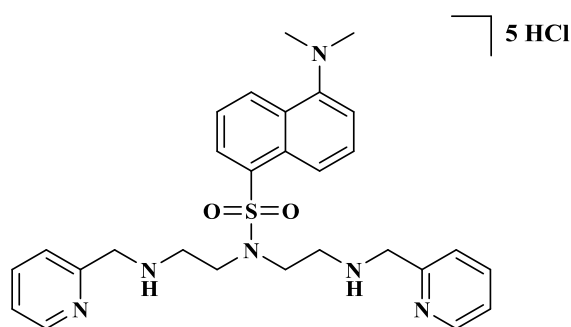
A una disolución de **L2** (0.65 g, 1.93 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente 2-piridinacetaldehído (0.45 g, 4.25 mmol) disuelta en el mismo disolvente (50 mL). La reacción se mantuvo durante 4 horas en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N₂. Posteriormente, se adicionó de manera fraccionada NaBH₄ (0.48 g, 12.7 mmol) y, al cabo de 6 horas de reducción *in situ*, se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito. A continuación, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina neutra (CHCl₃/MeOH 80:20), obteniéndose 1.28 g de un aceite puro que se precipitó en forma clorhidrato.

Fórmula Molecular: C₂₈H₃₉Cl₅N₆O₂S

PM = 700.978 g/mol

Rdto: 58%

p.f.: 179-180 (177-178°C)³⁴



RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ = 3.52-3.55 (m, 10H), 3.95 (t, *J* = 6, 4H), 4.65 (s, 4H), 7.81 (ddd, *J* = 7.8, *J* = 5.4, *J* = 1.1, 2H), 7.91 (d, *J* = 7.9, 2H), 7.94-7.97 (m, 2H), 8.15 (d, *J* = 7.5, 1H), 8.24 (d, *J* = 7.5, 1H), 8.34 (td, *J* = 7.9, *J* = 1.7, 2H), 8.52 (d, *J* = 8.8, 1H), 8.76 (ddd, *J* = 5.4, *J* = 1.7, *J* = 0.8, 2H), 8.85 (d, *J* = 8.8, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ = 47.0 (CH₂), 47.1 (CH₂), 47.2 (CH₃), 49.5 (CH₂), 120.3 (CH), 126.5 (CH), 126.5 (C), 126.7 (CH), 126.8 (CH), 127.0 (CH), 127.5 (CH), 129.0 (CH), 129.4 (C), 129.5 (CH), 134.1 (C), 138.9 (C), 143.8 (CH), 146.5 (CH), 147.3 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₈H₃₉Cl₅N₆O₂S(H₂O)₄: C, 43.50; H, 6.13; N, 10.87; S, 4.15, experimental: C, 43.13; H, 6.09; N, 10.69; S, 3.94.

1,7-Bis(3-piridilmetil)-4-dansil-1,4,7-triazaheptano (L2b)

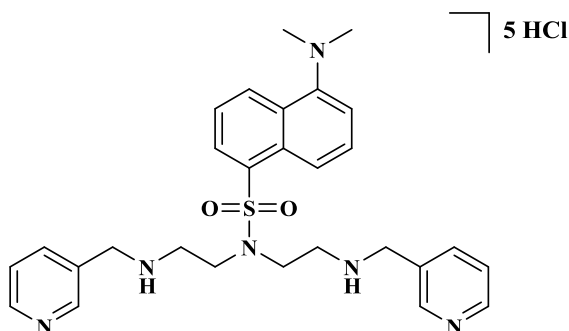
A una disolución de **L2** (0.55 g, 1.63 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente 3-piridinacetaldehído (0.38 g, 3.6 mmol) disuelta en el mismo disolvente (50 mL). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N₂. Tras 4 horas de reacción, se adicionó de manera fraccionada NaBH₄ (0.19 g, 4.5 mmol) y, al cabo de 6 horas de reducción *in situ*, se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito, obteniéndose 0.71 g de un aceite puro que se precipitó en forma clorhidrato. Finalmente **L2b**(HCl)₅ se recrystalizó de EtOH.

Fórmula Molecular: C₂₈H₃₉Cl₅N₆O₂S

PM = 700.978 g/mol

Rdto: 84%

pf: 198-200 °C

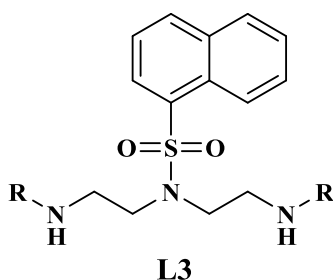


RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ = 3.53 (s, 6H), 3.61 (t, *J* = 6.2, 4H), 3.95 (t, *J* = 6.2, 4H), 4.66 (s, 4H), 7.91–7.93 (m, 2H), 8.14 (d, *J* = 7.8, 1H), 8.20 (d, *J* = 6.1, 1H), 8.22 (d, *J* = 6.4, 2H), 8.53 (d, *J* = 8.7, 1H), 8.81–8.87 (m, 3H), 8.93 (d, *J* = 6, 2H), 9.05 (d, *J* = 2, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ = 47.2 (CH₃), 47.3 (CH₂), 47.4 (CH₂), 47.8 (CH₂), 120.3 (CH), 126.5 (C), 126.7 (CH), 127.0 (CH), 127.4 (CH), 128.3 (CH), 128.9 (CH), 129.3 (CH), 129.4 (C), 131.4 (C), 134.0 (C), 139.7 (C), 143.0 (CH), 143.1 (CH), 148.7 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₂₈H₃₉Cl₅N₆O₂S(H₂O)₃: C, 44.54; H, 6.01; N, 11.13; S, 4.25, experimental: C, 44.66; H, 6.21; N, 11.05; S, 3.79.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₂₈H₃₅N₆O₂S: 519.2537, experimental: 519.2550.



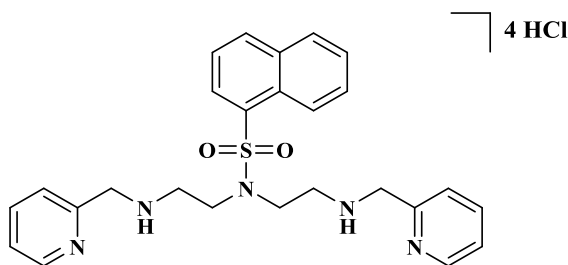
1,7-Bis(2-piridilmetil)-4-(naftil-1-sulfonil)-1,4,7-triazaheptano (L3a)

A una disolución de **L3** (1.0 g, 3.4 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente 2-piridinacetaldehído (0.80 g, 7.5 mmol) disuelta en el mismo disolvente (50 mL). La reacción se mantuvo durante 4 horas en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N₂. A continuación, se adicionó de manera fraccionada NaBH₄ (0.40 g, 10.2 mmol) y, al cabo de 6 horas de reducción *in situ*, se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito. A continuación, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina neutra (CHCl₃/MeOH 85:15), obteniéndose 0.73 g de un aceite puro que, posteriormente, se precipitó en forma clorhidrato.

Fórmula Molecular: C₂₆H₃₃Cl₄N₅O₂S

PM = 621.449 g/mol

Rdto: 45%

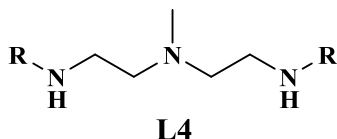


RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ = 3.40 (t, *J* = 6.5, 4H), 3.82 (t, *J* = 6.5, 4H), 4.59 (s, 4H), 7.59-7.62 (m, 3H), 7.87-7.90 (m, 5H), 8.06 (d, *J* = 7.3, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.40 (m, 3H), 8.73 (dd, *J* = 6.3, *J* = 1.8, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ = 44.2 (CH₃), 48.8 (CH₂), 50.7 (CH₂), 59.2 (CH₂), 126.7 (CH), 126.9 (CH), 127.6 (CH), 127.7 (C), 128.2 (CH), 128.3 (CH), 129.4 (CH), 130.1 (CH), 131.4 (C), 133.1 (CH), 133.2 (C), 144.7 (CH), 145.2 (CH), 147.3 (C).

Análisis elemental: calculado para C₂₆H₃₄Cl₅N₅O₂S: C, 50.25; H, 5.35; N, 11.27; S, 5.16, experimental: C, 50.54; H, 5.59; N, 11.05; S, 5.35.

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₂₆H₂₉N₅O₂S: 476.2115 experimental: 476.2124.



1,7-Bis(2-piridilmetil)-4-metil-1,4,7-triazaheptano (L4a)

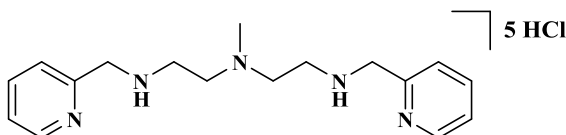
A una disolución de 4-metil-1,4,7-triazaheptano **L4** (1.02 g, 8.7 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le añadió lentamente 2-piridinacetaldehído (2.05 g, 19.1 mmol) disuelta en el mismo disolvente (50 mL). La reacción se mantuvo durante 4 horas en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N₂. A continuación, se adicionó de manera fraccionada NaBH₄ (0.99 g, 26.1 mmol) y, a las 6 horas de reducción *in situ* se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito, obteniéndose con rendimiento cuantitativo 2.6 g de un aceite puro que, posteriormente, se precipitó en forma clorhidrato.

Fórmula Molecular: C₁₇H₃₀Cl₅N₅

PM = 481.711 g/mol

Rdto: 99%

pf: 188-191 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.98 (s, 3H), 3.66 (s, 8H), 4.69 (s, 2H), 7.80 (ddd, *J* = 7.9, *J* = 5.5, *J* = 1.2, 2H), 7.87 (dt, *J* = 7.9, *J* = 1.2, 2H), 8.31 (td, *J* = 7.9, *J* = 1.7, 2H), 8.7 (ddd, *J* = 5.5, *J* = 1.7, *J* = 0.8, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ = 41.1 (CH₃), 42.5 (CH₂), 48.8 (CH₂), 52.6 (CH₂), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 144.6 (CH), 146.2 (C), 146.7 (CH).

Análisis elemental: calculado para C₁₇H₃₀Cl₅N₅(H₂O)_{1.5}: C, 40.13; H, 6.54; N, 13.76, experimental: C, 40.02; H, 6.81; N, 13.35.

EM-AR (ESI+): m/z [M + H] calculado para C₁₇H₂₆N₅: 300.2183 experimental: 300.2212.

1,7-Bis(4-piridilmetil)-4-metil-1,4,7-triazaheptano (L4c)

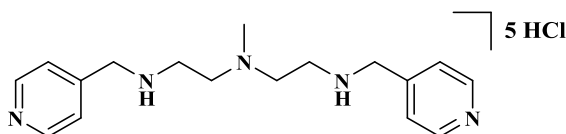
A una disolución de 4-metil-1,4,7-triazaheptano (0.57 g, 4.9 mmol) en EtOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente 4-piridinacetaldehído (1.15 g, 10.7 mmol) disuelta en el mismo disolvente (50 mL). La reacción se mantuvo durante 4 horas en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N₂. A continuación, se adicionó de manera fraccionada NaBH₄ (0.55 g, 14.6 mmol) y, al cabo de 6 horas de reducción *in situ*, se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito, obteniéndose 1.41 g de un aceite que, posteriormente, se precipitó en forma clorhidrato. Finalmente **L4c**(HCl)₅ se recrystalizó de EtOH.

Fórmula Molecular: C₁₇H₃₀Cl₅N₅

PM = 481.711 g/mol

Rdto: 97%

pf: 167-168 °C

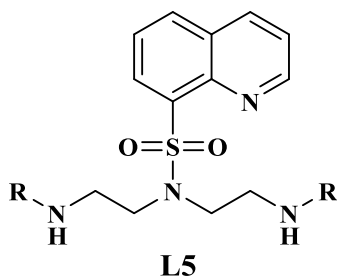


RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.80 (s, 1H), 3.44 (m, 4H), 3.60 (m, 4H), 4.65 (s, 4H), 8.17 (d, J = 6.8, 4H), 8.87 (d, J = 6.8, 4H).

RMN ^{13}C (75 MHz, D $_2$ O): δ = 40.7 (CH $_3$), 43.5 (CH $_2$), 50.1 (CH $_2$), 52.7 (CH $_2$), 127.7 (CH), 142.5 (CH), 151.8 (C).

Análisis elemental: calculado para C $_{17}$ H $_{30}$ Cl $_5$ N $_5$ (H $_2$ O) $_2$: C, 39.44; H, 6.62; N, 13.53, experimental: C, 39.36; H, 7.03; N, 13.56.

EM-AR (ESI+): m/z [M + H] calculado para C $_{17}$ H $_{26}$ N $_5$: 300.2183 experimental: 300.2194.



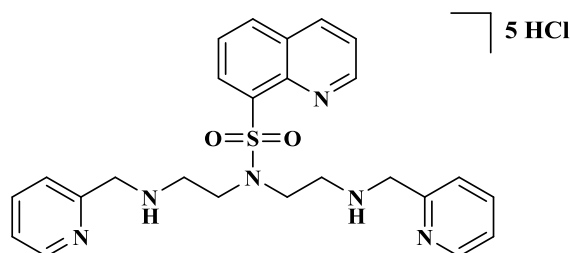
1,7-Bis(2-piridilmetil)-(quinolil-8-sulfonil)-1,4,7-triazaheptano (L5a)

A una disolución de **L5** (1.2 g, 4.1 mmol) en etanol seco (100 mL) se le añadió lentamente 2-piridinacetaldehído (0.96 g, 9.0 mmol) disuelta en el mismo disolvente (50 mL). La reacción se mantuvo durante 4 horas en agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte de N $_2$. A continuación, se adicionó de manera fraccionada NaBH $_4$ (0.46 g, 12.3 mmol) y tras 6 horas de reducción *in situ*, se trató la reacción según el procedimiento anteriormente descrito. A continuación, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre alúmina neutra (CHCl $_3$ /MeOH 65:35), obteniéndose 0.82 g de un aceite puro que, posteriormente, se precipitó en forma clorhidrato.

Fórmula Molecular: C $_{25}$ H $_{33}$ Cl $_5$ N $_6$ O $_2$ S

PM = 658.898 g/mol

Rdto: 42%



RMN ^1H (300 MHz, D $_2$ O): δ = 3.38 (t, J = 6.2, 4H), 3.83 (t, J = 6.2, 4H), 4.58 (t, J = 6.2, 4H), 7.74-7.83 (m, 5H), 8.23-8.30 (m, 4H), 8.45 (dd, J = 7.4, J = 1.3, 1H), 8.54 (dd, J = 8.4, J = 1.7, 1H), 8.66 (dd, J = 5.7, 2H), 8.88 (dd, J = 5.4, J = 1.7, 1H).

RMN ^{13}C (75 MHz, D $_2$ O): δ = 46.2 (CH $_2$), 46.7 (CH $_2$), 49.3 (CH $_2$), 123.4 (CH), 126.7 (CH), 126.9 (CH), 129.8 (CH), 129.9 (C), 131.6 (C), 135.3 (CH), 136.8 (CH), 140.2 (C), 144.0 (CH), 144.1 (CH), 146.3 (CH), 147.1 (C), 151.7 (CH).

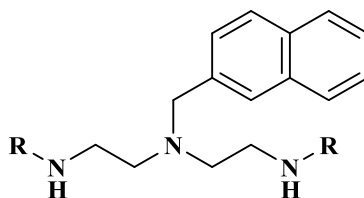
Análisis elemental: calculado para C $_{25}$ H $_{33}$ Cl $_5$ N $_6$ O $_2$ S (H $_2$ O): C, 44.35; H, 5.21; N, 12.41; S, 4.73, experimental: C, 43.93; H, 5.81; N, 12.20; S, 4.23.

3.1.4.5. Formación de amidas

Procedimiento general

Al derivado 1,4,7-triazaheptano *N*-4 sustituido **L1** o **L2** disuelto en MeOH seco (50 mL), en agitación y bajo atmósfera inerte de N₂, se le adicionó lentamente, gota a gota, una solución de picolinato de metilo (1.1 equivalentes por grupo amino) en 50 mL de MeOH seco. Tras 30 min de adición, la reacción se mantuvo a reflujo durante 48 horas en atmósfera inerte de N₂. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna con el eluyente apropiado en cada caso. .

Finalmente, se precipitó el hidrocloreto de la amina correspondiente en CH₂Cl₂ seco por adición de ácido clorhídrico/dioxano 1M (3 mL). El sólido se aisló por filtración y se secó a 60 °C a presión reducida durante 48 horas.



L1

1,5-Bis(picolinamida)-3-(2-naftilmetil)-1,3,5-triazaheptano (**L1e**)

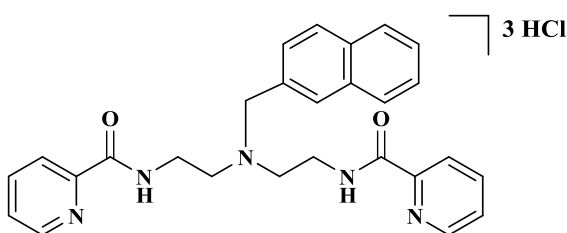
Siguiendo el procedimiento general de síntesis, a una disolución de **L1** (1.55 g, 6.4 mmol) en MeOH seco (50 mL) se le adicionó lentamente picolinato de metilo (1.92 g, 14 mmol). Tras el tiempo de reacción a reflujo y eliminación de disolvente, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (n-Hexano/AcOEt 75:25), obteniéndose 0.92 g de un aceite puro que, posteriormente, se precipitó en forma clorhidrato.

Fórmula Molecular: C₂₇H₃₀Cl₃N₅O₂

PM = 562.917 g/mol

Rdto: 32%

pf: 217-221 °C

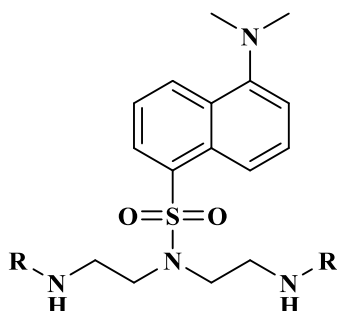


RMN ¹H (300 MHz, D₂O): δ = 3.64 (t, *J* = 5.7, 4H), 3.78 (t, *J* = 5.7, 4H), 4.48 (s, 2H), 7.25-7.29 (m, 2H), 7.37 (dd, *J* = 8.5, *J* = 1.8, 1H), 7.42-7.45 (m, 1H), 7.50-7.53 (m, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.5, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.89 (m, 4H), 8.30 (td, *J* = 7.9, *J* = 1.6, 2H), 8.53 (d, *J* = 5.4, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ = 36.2 (CH₂), 54.6 (CH₂), 59.4 (CH₂), 124.5 (CH), 126.5 (C), 127.5 (CH), 127.9 (CH), 128.0 (CH), 128.0 (CH), 128.3 (CH), 129.5 (CH), 129.7 (CH), 131.7 (CH), 132.6 (C), 133.2 (C), 142.5 (C), 144.5 (CH), 145.7 (CH), 162.6 (CO).

Análisis elemental: calculado para C₂₇H₃₀Cl₃N₅O₂(H₂O)₃: C, 52.5635; H, 5.88; N, 11.35, experimental: C, 52.55; H, 5.81; N, 11.30.

EM-AR (ESI+): m/z [M + H] calculado para C₂₇H₂₈N₅O₂: 454.2238 experimental: 454.2250.



L2

1,5-Bis(picolinamida)-3-dansil-1,3,5-triazaheptano (L2e)

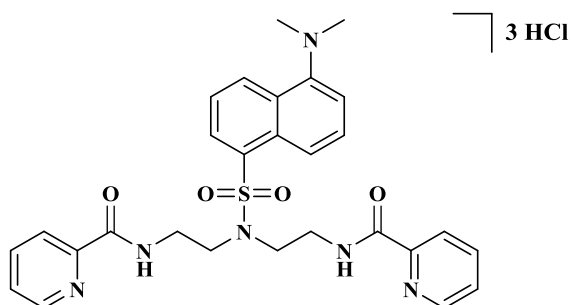
Siguiendo el procedimiento general de síntesis, a una disolución de **L2** (0.75 g, 2.2 mmol) en MeOH seco (100 mL) se le adicionó lentamente picolinato de metilo (0.67 g, 4.9 mmol). Tras el tiempo de reacción a reflujo y eliminación del disolvente, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (CH₂Cl₂/MetOH 90:10), obteniéndose 0.71 g de un aceite puro que, posteriormente, se precipitó en forma clorhidrato.

Fórmula Molecular: C₂₈H₃₃Cl₃N₆O₄S

PM = 656.237 g/mol

Rdto: 58%

pf: 186-189 °C



RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.24 (s, 6H), 3.65 (t, *J* = 5.5, 4H), 3.83 (t, *J* = 5.5, 4H), 7.59 (t, *J* = 8.2, 1H), 7.68 (dd, *J* = 7.7, 1H), 7.77 (dd, *J* = 8.8, *J* = 7.5, 1H), 7.94 (ddd, *J* = 8, *J* = 5.5, *J* = 1.0, 2H), 7.99 (d, *J* = 8, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.8, 1H), 8.27 (d, *J* = 7.4, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.5, 1H), 8.36 (td, *J* = 8.0, *J* = 1.6, 2H), 8.64 (dd, *J* = 5.5, *J* = 1.7, 2H).

RMN ¹³C (75 MHz, D₂O): δ = 37.1 (CH₂), 44.7 (CH₂), 47.0 (CH₃), 119.4 (CH), 124.2 (CH), 126.2 (CH), 126.9 (CH), 127.4 (CH), 128.4 (CH), 129.3 (CH), 132.3 (CH), 134.7 (C), 144.1 (C), 144.9 (CH), 145.12 (CH), 162.4 (C), 177.3 (C).

EM-AR (ESI⁺): *m/z* [M + H] calculado para C₂₈H₃₁N₆O₄S: 547.2122 experimental: 547.2127.

3.2. Ensayos de evaluación antiparasitaria *in vitro* e *in vivo*

La evaluación de la actividad antiparasitaria de los compuestos descritos en la presente memoria fue realizada por distintos grupos colaboradores.

La actividad *in vitro* e *in vivo* de las sulfonamidas **S1-S26** frente a diferentes especies de *Leishmania* spp. fue realizada por la Dra. M^a Auxiliadora Dea Ayuela, el Dr. Francisco Bolás y el Dr. Pablo Bilbao en el Departamento de Parasitología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Los estudios de la actividad tripanocida de estos mismos derivados, *in vitro* e *in vivo*, frente a *T. cruzi* fueron realizados por la Dra. Miriam Rolón y la Dra. Celeste Vega en el Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC) de Paraguay.

La evaluación *in vitro* de las poliaminas **L1-L5**, frente a *Leishmania* spp. y *T. cruzi* fue realizada por el grupo de investigación de Parasitología Molecular de la Universidad de Granada, dirigido por el Dr. Manuel Sánchez Moreno.

3.2.1. Ensayos frente a *Leishmania* spp.

3.2.1.1. Cepas

Las cepas de las diferentes especies de *Leishmania* que se utilizaron en los ensayos de evaluación de las sulfonamidas **S1-S26** fueron las siguientes: un aislado autóctono de *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN83) de perros asintomáticos de Priorat (Catalunya), cedido por la profesora Monserrat Portús (Universidad de Barcelona), las cepas *Leishmania braziliensis* 2903, *Leishmania amazonensis* (MHOM/Br/79/Maria) y *Leishmania guyanensis* 141/93, cedidas por el profesor Alfredo Toraño (Instituto de Salud Carlos III, Madrid).

En la evaluación leishmanicida de las poliaminas **L1-L5** se utilizaron las cepas: *Leishmania infantum* (MCAN/ES/2001/UCM-10), *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904) y *Leishmania donovani* (MHOM/PE/84/LC26).

3.2.1.2. Ensayos *in vitro* sobre promastigotes

El cribado farmacológico de las sulfonamidas **S1-S26**, frente a formas promastigotes de diferentes especies de *Leishmania*, se realizó de acuerdo con el protocolo previamente estandarizado en el laboratorio de los profesores Bolás y Alunda³⁶ mediante el método fluorométrico de reducción de la resazurina.

A una suspensión homogénea de promastigotes en fase exponencial de crecimiento, 2.5×10^5 promastigotes/pocillo en placas de 96 pocillos, se transfirió un volumen de disolución

stock de las sulfonamidas en DMSO para una concentración de 100, 10 ó 1 µg/mL de compuesto en un volumen final de 200 µL/pocillo, evaluándose cada condición por triplicado. Como fármaco de referencia se utilizó la Miltefosina.

Tras 48 horas de incubación a 26 °C, se añadieron 20 µL de una solución de la sal sódica de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 2.5 mM en PBS durante 3 horas, monitorizando la intensidad de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 535$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm) con un espectrofluorímetro Infinite 200 (Tecan I-Control). A partir de los espectros registrados se determinó el porcentaje de inhibición (GI (%), *Growth inhibition*) por el método de Regresión multinominal Probit con el SPSS v.20.0.

Para los compuestos que mostraron un GI significativo en el primer *screening* se realizaron diluciones seriadas de 252, 126, 63, 31.5, 15.7, 7.8, 3.9 y 1.9 µM por compuesto activo, y se calculó como parámetro de eficacia el IC₅₀ siguiendo la metodología anteriormente descrita.

La evaluación de los derivados poliamínicos **L1-L5** se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento experimental establecido por el grupo de investigación del Dr. Manuel Sánchez Moreno.³⁷

A una suspensión homogénea de promastigotes en fase exponencial de crecimiento, 5×10^5 promastigotes/pocillo en placas de 96 pocillos, se transfirió un volumen de disolución *stock* de las poliaminas en DMSO para una concentración final de compuesto de 100, 50, 25, 10 y 1 µM. El porcentaje de DMSO en medio MTL (*Medium Trypanosomes Liquid*) no superó el 0.01%, concentración de cosolvente establecida como no tóxica y sin efectos inhibitorios en el crecimiento de los parásitos.³⁸

A las 72 horas de incubación se calculó el porcentaje de inhibición por recuento óptico en cámara de Neubauer. El efecto leishmanicida fue expresado como IC₅₀, calculado por regresión lineal a partir de los valores de K_c de la concentración empleada. Como fármaco de referencia se utilizó el Glucantime®.

3.2.1.3. Ensayos *in vitro* sobre amastigotes

Los ensayos de las sulfonamidas **S1-S26** se realizaron de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Bilbao-Ramos *et al.*³⁹

El modelo de infección *in vitro* se obtuvo a partir de una suspensión homogénea de 5×10^4 macrófagos y promastigotes de *Leishmania* en fase estacionaria (1:10), en 200 µL de medio de cultivo por pocillo en placas de 96 pocillos. Se incubaron durante 48 horas, 24 horas de incubación a 33 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad y, 24 horas adicionales a 37 °C. Tras el periodo de infección, se eliminaron los promastigotes libres en el medio mediante lavados consecutivos con medio RPMI-HEPES y posterior centrifugación a 1500 g durante 5 minutos.

El tratamiento con las sulfonamidas **S1-S26** se realizó a partir de una solución *stock* a las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 y 0.78 µg/mL en un volumen final de 200 µL. Tras 48 de incubación, el medio de cultivo fue reemplazado por una solución de lisis

(RPMI-1640 con 0.048% HEPES y 0.006% SDS) a temperatura ambiente durante 20 min en agitación. Posteriormente, se centrifugaron a 1500 g durante 5 min, y se añadió 200 µL/pocillo de medio *Schneider*. Las placas se incubaron a 26 °C durante 3 días para permitir la transformación de amastigotes viables en formas promastigotes. Finalmente se determinaron el GI% y la IC₅₀ siguiendo la misma metodología anteriormente descrita.

En la evaluación de las poliaminas **L1-L5**, el modelo de infección *in vitro* se obtuvo a partir de una suspensión homogénea de 1×10^4 macrófagos J774.2 y promastigotes de *Leishmania* en fase estacionaria de crecimiento en un ratio 1:10. Se incubaron durante 24 horas, a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad. Tras el periodo de infección, se incubaron con los compuestos (100, 50, 25, 10 y 1 µM) en medio MEM (*Minimum Essential Medium*) suplementado con glutamina (2 mM) y 20% de FCS (*Fetal Calf Serum*) inactivado. La actividad de los compuestos se determinó a partir del porcentaje de reducción de amastigotes en los cultivos tratados y no tratados, fijados y teñidos con giemsa. Los valores se expresan como la media de tres ensayos independientes.³⁸

3.2.1.4. Ensayos de citotoxicidad

En los ensayos de citotoxicidad de las sulfonamidas **S1-S26** se empleó la línea celular de macrófagos J774 en medio PRMI 1640 (Sigma) suplementado con 10% FBS inactivado (30 min a 56 °C), penicilina G (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de cultivo estándar de 37 °C de temperatura, 95% de humedad y 5% de presión de CO₂.

Los macrófagos J774 se sembraron a una densidad celular de 5×10^4 células por pocillo, en placas de 96 pocillos, en 100 µL de medio RPMI-1640. Tras 24 horas de incubación a 37 °C, se reemplazó el medio de cultivo por las correspondientes disoluciones de los compuestos en un volumen de 200 µL de medio, evaluándose cada condición por triplicado. A las 24 horas de tratamiento se determinó la viabilidad celular por el método de la resazurina descrito anteriormente. El efecto citotóxico se definió como la concentración del compuesto que produce una reducción del 50% de la viabilidad celular de los cultivos tratados con respecto a los cultivos no tratados (CC₅₀).

La citotoxicidad de los derivados poliamínicos **L1-L5** se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por M. Sánchez-Moreno *y col.*⁴⁰

Los macrófagos J774.2 (ECACC 91051511) se incubaron con los compuestos a las concentraciones establecidas (100, 50, 25, 10 y 1 µM) durante 72 horas. La viabilidad celular se determinó por citometría de flujo con un citómetro FACS *Vantage* (*Becton Dickinson*), previo marcaje con yoduro de propidio (100 mg/mL) y diacetato de fluoresceína (100 ng/mL) durante 10 min a 28 °C. El valor IC₅₀ se calculó mediante una regresión lineal a partir de los valores *K_c* correspondientes a las concentraciones empleadas.

3.2.1.5. Ensayos *in vivo* en un modelo murino de leishmaniosis visceral

Para la determinación de la eficacia *in vivo* se seleccionaron aquellos compuestos con mejor índice terapéutico *in vitro* (alta eficacia y baja toxicidad).

Los estudios fueron realizados por la Dra. M^a Auxiliadora Dea Ayuela siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Experimentación Animal (CEA) de la UCM, en el manejo bioético y la protección de los animales de laboratorio utilizados para fines científicos y experimentales.

En las infecciones experimentales se utilizaron lotes homogéneos de ratones BALB/c machos de 6-8 semanas de edad (Harlan Ibérica S.A), mantenidos en las instalaciones del animalario de la Facultad de Medicina de la UCM.

Según el protocolo de infección descrito², se administró por vía intracardíaca, previa anestesia con fenobarbital sódico, un inóculo de 10⁷ promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum* (MCAN/ES/ 96/BCN150), cepa cedida por el Prof. José María Requena y Carlos Alonso (Laboratorio de Parasitología Molecular, Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid).

El tratamiento con los compuestos seleccionados se inició 21 días post-infección, estableciéndose aleatoriamente hasta ocho grupos de ratones, uno de ellos como grupo control. La posología fue de una dosis única diaria de 5 mg/kg en un volumen final de 0.1 mL de solución de propilenglicol por vía intraperitoneal durante 5 días. A los siete días de finalizar el tratamiento, los ratones fueron sacrificados, determinándose la carga parasitaria en bazo e hígado mediante el método de Dilución Límite descrito por Titus y col.⁴¹

En un estudio posterior, se evaluó la eficacia de la sulfonamida **S10a** a una dosis 10 mg/kg/día siguiendo la metodología anteriormente descrita.

3.2.2. Ensayos frente a *Trypanosoma cruzi*

3.2.2.1. Cepas

En los estudios *in vitro* de las sulfonamidas **S1-S26** frente a formas epimastigotes y amastigotes se utilizó el clon CL-B5 de *T. cruzi*, transfectado con el gen codificante de la β -galactosidasa de *Escherichia coli* (gen lacZ), cedido por el Dr. F. Buckner. En la infección experimental del modelo *in vivo* se utilizó un inóculo de tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y, obtenidos por punción cardíaca de un modelo murino BALB/c el día en el que la parasitemia alcanzó su pico máximo.

En los estudios *in vitro* de las poliaminas **L1-L5** frente a formas epimastigotes y amastigotes se utilizó la cepa SN3 de IRHOD/CO/2008/SN3, aislada de *Rhodnius prolixus* (Guajira, Colombia).⁴²

3.2.2.2. Ensayos *in vitro* sobre epimastigotes

La actividad *in vitro* de las sulfonamidas **S1-S26** frente a formas extracelulares de *T. cruzi* se llevó a cabo siguiendo la metodología previamente descrita mediante el método colorimétrico del rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido (CPRG, *chlorophenol red β -D-galactopyranoside*).⁴³

A una suspensión homogénea de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, 1×10^5 epimastigotes/mL en medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), suplementado con 10% de FBS, penicilina y estreptomina, se transfirió un volumen de disolución *stock* de las sulfonamidas **S1-26** en DMSO, para una determinada concentración, en un volumen final de 200 μ L/pocillo, evaluándose cada condición por triplicado. Tras 72 horas de incubación a 28 °C, se añadieron 50 μ L del CPRG (Roche, Indianapolis, Ind.) en 0.9 % Triton X-100, pH 7.4, hasta alcanzar una concentración final de 200 μ M. A las 6 horas de incubación se realizó la lectura a 595 nm, determinándose su eficacia a partir del cálculo de la IC₅₀ y el GI%. Como fármaco de referencia se utilizó el Benznidazol.

La actividad *in vitro* de las poliaminas **L1-L5** frente a formas extracelulares de *T. cruzi* se realizó por recuento óptico con cámara de Neubauer. A una suspensión homogénea de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, 5×10^4 epimastigotes/mL en medio MTL, se transfirió un volumen de disolución *stock* de las poliaminas **L1-L5** en DMSO para una determinada concentración, evaluándose cada condición por triplicado. Tras 72 horas de incubación a 28 °C, se determinó su eficacia a partir del cálculo de la IC₅₀, obtenido por regresión lineal a partir de los valores de Kc para cada concentración. Como fármaco de referencia se utilizó el Benznidazol.

3.2.2.3. Ensayos *in vitro* sobre amastigotes

En la evaluación de las sulfonamidas **S1-S26**, el modelo de infección *in vitro* se obtuvo a partir de una suspensión homogénea de 2.5×10^3 de fibroblastos NCTC-929 y tripomastigotes (5:1) en 200 μ L de medio de cultivo por pocillo, en placas de 96 pocillos. Tras 24 horas de incubación a 33 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad, se eliminaron los tripomastigotes extracelulares en el medio mediante lavados consecutivos con PBS y se añadieron las sulfonamidas en un volumen final de disolución de 900 μ L/pocillo. El periodo de incubación establecido fue de 7 días a 33 °C, determinándose su eficacia siguiendo la misma metodología anteriormente descrita en las formas extracelulares.

En la evaluación de las poliaminas **L1-L5**, el modelo de infección *in vitro* se obtuvo a partir de una suspensión homogénea de 1×10^4 de células Vero y tripomastigotes (10:1) mantenida durante 24 horas en condiciones de cultivo en placas de 96 pocillos. Tras los lavados consecutivos para eliminar los tripomastigotes extracelulares, se añadieron las poliaminas a las concentraciones previamente establecidas, en medio RPMI y 10% FBS inactivado. Tras 72 horas de incubación se determinó la actividad de los compuestos siguiendo la misma metodología anteriormente descrita en la evaluación de estos mismos derivados en las formas amastigotes de *Leishmania*.

3.2.2.4. Ensayos de citotoxicidad

En los ensayos de citotoxicidad *in vitro* de las sulfonamidas **S1-S26** se empleó la línea celular de fibroblastos NCTC-929, mantenida en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 2 mM de L-glutamina, penicilina (50 U/mL) y estreptomicina (50 g/mL).

Los fibroblastos-NCTC929 se sembraron a una densidad celular de 3×10^4 células/pocillo en 100 μ L de medio, en placas de 96 pocillos. Tras 24 horas de incubación a 37°C, se reemplazó el medio de cultivo por las correspondientes disoluciones de los compuestos en un volumen de 200 μ L de medio, evaluándose cada condición por triplicado. A las 24 horas de tratamiento se determinó la viabilidad celular por el método de la resazurina descrito anteriormente. El efecto citotóxico se definió como la concentración del compuesto que produce una reducción del 50% de la viabilidad celular de los cultivos tratados con respecto a los cultivos no tratados (CC_{50}).

En los ensayos de citotoxicidad *in vitro* de las poliaminas **L1-L5** se emplearon células Vero. De acuerdo al procedimiento descrito,⁴⁴ las células se sembraron en tubos de 25 mL (*Canonical Skirted Bottom Universal Sample Tube*) y se centrifugaron a 100 g durante 5 minutos. Se añadió medio nuevo para obtener una suspensión homogénea de 1×10^5 células/mL que, posteriormente se transfirió a placas de 24 pocillos (100 μ L/pocillo). Tras 2 días de incubación, se reemplazó el medio de cultivo con las respectivas diluciones de los compuestos (concentraciones de 100, 50, 25, 10 y 1 μ M). A las 72 horas de tratamiento se determinó la citotoxicidad por citometría de flujo de acuerdo a la metodología establecida por el propio grupo de investigación.⁴⁵

3.2.2.5. Ensayos *in vivo* en un modelo murino de infección aguda

Los estudios fueron realizados en conformidad con las normas bioéticas del Comité Institucional para el cuidado y uso de animales en experimentación.

En las infecciones experimentales se utilizaron lotes homogéneos de ratones BALB/c con un peso inicial de 20-24 g, mantenidos en las instalaciones del animalario del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (UNA, Paraguay), en condiciones libres de patógenos, temperatura controlada 20-24 °C y provistos de agua esterilizada y comida *ad libitum*. Tras siete días de aclimatación, se realizó la infección de un inóculo 10^4 tripomastigotes de la cepa Y de acuerdo al protocolo de infección descrito.⁴⁶

A los 5 días post-infección se inició el tratamiento con las sulfonamidas seleccionadas, disueltas en DMSO y propilenglicol, a una dosis de 10 mg/kg/día durante 5 días consecutivos por vía intraperitoneal. El Benznidazol, utilizado como fármaco de referencia, se administró a una dosis de 100 mg/Kg/día.

La parasitemia se evaluó por el método Pizzi-Brener a los 5, 8 y 10 dpi.⁴⁷ Los resultados se expresan como porcentaje de supervivencia (S (%)), considerándose aquellos ratones que vivieron al cabo de 30 días de finalizar el tratamiento.

3.2.3. Microscopía electrónica de barrido

Los estudios fueron realizados en las instalaciones del Laboratorio de Parasitología y el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Alcalá de Henares.

Las muestras fueron preparadas a partir de una suspensión de promastigotes de *L. infantum* tratados con las sulfonamidas seleccionadas por su eficacia *in vitro*.

Tras 48 horas de tratamiento, la suspensión de promastigotes se centrifugó a 3000 r.p.m durante 5 minutos a 4 °C, realizándose dos lavados consecutivos, previamente a su fijación, con solución de lavado (tampón Milloning; glucosa 4.5%).

Posteriormente, se eliminó el sobrenadante del lavado y se añadieron 500 µL de la solución de fijado (tampón Milloning, glutaraldehído 25%; CaCl₂ 1%), se homogenizó la suspensión y se incubó a 26 °C durante 1 hora. La suspensión fijada se depositó en un cubreobjetos (9 mm) y se incubó nuevamente a 26 °C durante 30 minutos.

A continuación se procedió a su deshidratación gradual. Las muestras fijadas fueron sumergidas en soluciones de etanol del 30%, 50%, 70%, 90%, 95% y etanol absoluto durante una hora y, finalmente en acetona anhidra. La sustitución gradual de la acetona anhidra por CO₂ se realizó en un secador de muestras (*Polaron, Critical Point Dryer*) a 31 °C y 80 bar de presión durante 1 hora.

Finalmente, los cubreobjetos se montaron en soportes “*Stub*” para microscopía electrónica de barrido y se depositaron en el metalizador (*Polaron*). En el mismo, se hizo vacío con argón N48 y se recubrieron con una fina capa de oro-paladio a 500 Å y 20 kV durante 150 segundos. El posterior análisis microscópico se realizó con un microscopio electrónico de barrido digital Zeiss DSM-950.

3.2.4. Microscopía electrónica de transmisión

La preparación de las muestras se realizó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito en la microscopía electrónica de barrido.

Tras 1 hora con la solución de fijado, se centrifugó la suspensión a 2.500 r.p.m, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en solución de lavado con CaCl₂ al 1%, manteniéndose durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se realizó la inclusión de las muestras en agar. Para ello, las muestras se centrifugaron a 2.000 r.p.m durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron dos gotas de agar bacteriológico al 2%, previamente atemperado a 55 °C, se dejó solidificar a 4 °C durante 1 hora y se añadió solución de lavado con CaCl₂ al 1%.

Posteriormente, se realizó la post-fijación. Las muestras se dejaron embeber en solución de post-fijado (tetraóxido de osmio al 1%) en oscuridad y a 4 °C. A los 90 minutos, se eliminó la solución de post-fijado y las muestras se lavaron con tampón Milloning 4 veces.

La deshidratación gradual se realizó con soluciones de acetona al 30% y 50% (30 minutos), acetato de uranilo al 2% (24 horas a 4 °C), acetona al 70 %, 80%, 100% y acetona anhidra (30 minutos).

Tras la deshidratación se procedió a su inclusión en resina *Spurr's* en ciclos de 70 minutos con mezcla plástica (25%, 50%,75%) y durante toda la noche a 4 °C con mezcla plástica al 100%.

Al día siguiente se encapsularon en cápsulas de látex con fondo cónico. Tras 72 horas de polimerización, las muestras encapsuladas fueron llevadas al servicio de microscopía electrónica de la Universidad de Alcalá de Henares, donde se realizó la microtomía y la posterior tinción positiva de los cortes ultrafinos. La visualización se realizó a 80 kV en un microscopio electrónico de transmisión EM-10 *Zeiss microscope*.

3.2.5. Inmunocitoquímica

Formas promastigotes de *L. infantum* en fase exponencial de crecimiento fueron tratadas con las sulfonamidas seleccionadas, a la dosis correspondiente a su valor IC₅₀, durante 24 y 48 horas. Tras los periodos de incubación, se realizaron dos lavados con PBS (0.25 mM MgCl₂, 0.35 mM CaCl₂), se fijaron los promastigotes con paraformaldehído al 4% y, se permeabilizaron con solución de bloqueo (0.2% saponina, 1% BSA en PBS) durante 20 minutos.

Los promastigotes se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti- β -tubulina (*NeoMarkers, Thermo Scientific*) de acuerdo al protocolo descrito por Chavan *y col.*⁴⁸ Tras 24 horas de incubación, se realizaron los correspondientes lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti IgG (H+L) de conejo conjugado con Alexa 488 (*Life Technologies*) durante 1 hora a 37 °C con IP.

Las muestras fueron analizadas mediante microscopía confocal empleando un microscopio Leica DM IRE2 y visualizadas con Leica SP2 (*Leica Microsystems Heidelberg GmbH*).

3.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a partir de las medias \pm desviación estándar de tres ensayos independientes. En los ensayos *in vitro*, la comparación entre las medias se realizó mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA de un factor) con un *post-test* de Turkey para múltiples comparaciones, y en los ensayos *in vivo* mediante el test U Mann Whitney. La hipótesis nula fue aceptada para todos aquellos valores de los test con un valor de *p* mayor de 0.05.

3.3. Ensayos de evaluación antitumoral *in vitro*

Los estudios de evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* de las sulfonamidas **S1-S26** y los derivados poliamínicos **L1-L5** han sido realizados en colaboración con el Grupo de Biología Molecular del Cáncer (Biocancer) de la Universitat de les Illes Balears, dirigido por el Dr. Priam Fransesc de Villalonga.

3.3.1. Cultivo celular

3.3.1.1. Líneas celulares

La evaluación antitumoral *in vitro* de los diferentes compuestos sintetizados se realizó a partir de un panel de líneas celulares humanas de diferente origen tumoral, derivadas tanto de neoplasias hematológicas, como de tumores sólidos.

- Derivadas de neoplasias hematológicas:
 - **Jurkat**, línea celular de leucemia linfoblástica aguda,⁴⁹ cedida por el Dr. Joan Gil del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIVELL) de Barcelona.
 - **Granta-519**, **Jeko-1**, **JVM-2**, **SP53**, y **Z-138**, líneas celulares derivadas de neoplasias de células B maduras, cuyo origen y características inmunofenotípicas permiten su clasificación como linfomas no-Hodgkin bajo la denominación de Linfoma de Células del Manto (LCM)⁵⁰. **Jeko-1** fue cedida por la Dra. Beatriz Martínez del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid), **Granta-519** y **JVM-2** por la Dra. Dolors Colomer del Hospital Clínic de Barcelona y **Z-138** por la Dra. Eva Ortega-Paino de la Universidad de Lund.
- Derivadas de tumores sólidos:
 - **LN229**, **U87MG**, **SKMG-3**, **U251**, **U373** y **T98G**, líneas celulares de glioblastoma multiforme o astrocitoma de grado IV.⁵¹ **LN229**, **U251** y **U373** fueron cedidas por el Dr. Joan Seoane del Institut de Recerca Vall d'Hebron de Barcelona y **SKMG-3** por el Dr. Hans Skovgaard de Rigshospitalet (Oslo).
 - **MCF-7** de adenocarcinoma de mama.⁵²
 - **PC-3** de adenocarcinoma de próstata de grado IV,⁵³ cedida por la Dra. Anne J. Ridley del King's College (Londres).
 - **SW480** y **SW620**, líneas establecidas a partir de adenocarcinoma primario de colon,⁵⁴ cedidas por el Dr. Eric Lam del Imperial College London (Londres).

Se incluye además, la línea **NIH3T3**, línea inmortalizada de fibroblastos murinos.⁵⁵

3.3.1.2. Mantenimiento de los cultivos

Jurkat, Granta-519, Jeko-1, JVM-2, SP53 y Z-138 fueron mantenidas en suspensión en medio RPMI-1640 con L-glutamina y HEPES (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel). Todas las líneas se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 cm² (volumen máximo de células en suspensión 5 mL) o 75 cm² (volumen máximo de células en suspensión 20 mL), manteniéndose en crecimiento exponencial a una dilución de 0.4x10⁶ células/mL mediante al menos dos diluciones por semana.

Las líneas adherentes LN229, U87MG, SKMG-3, U251, U373, MCF-7, PC-3, SW480 y SW620 fueron mantenidas en medio DMEM con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA), manteniéndose en crecimiento exponencial mediante dos subcultivos por semana.

En todas los casos el medio de cultivo se suplementó con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS, *Fetal Bovine Serum*) inactivado (56 °C 60 min) y 100 U/mL penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), y ocasionalmente, con Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA) a una concentración de 5 µg/mL de como medida profiláctica.

Las líneas celulares se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar de 37 °C de temperatura, 95% de humedad y 5% de presión de CO₂. El crecimiento y proliferación del cultivo se analizó diariamente con ayuda de un microscopio óptico controlando la morfología, adherencia celular y ausencia de contaminación. Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar vertical de bioseguridad Clase II (nivel de seguridad biológica 2; Telstar).

En cada pase o subcultivo se determinó la viabilidad celular mediante el método de recuento azul tripán.⁵⁶ El azul tripán es un colorante azoico capaz de penetrar en la célula en función de la integridad de la membrana plasmática. Tan sólo penetra en aquellas con la membrana plasmática desestructurada, permitiendo distinguir las células muertas de coloración azul y las vivas y apoptóticas, que conservan su aspecto redondeado y transparente.

Tras previa mezcla de volúmenes equivalentes (10 µL) de la suspensión celular y azul tripán (0.4% en NaCl 0.15 M), se depositó un volumen de 10 µL en una cámara de Neubauer, se realizó el conteo en un microscopio óptico y se determinó la viabilidad celular a partir del cociente entre las células vivas y las totales.

Todos los ensayos se realizaron partiendo de una viabilidad celular de al menos el 95 %.

La densidad celular se calculó a partir de la ecuación **ec-1**:

$$\text{Densidad Celular} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ células viables} \times \text{factor de dilución} \times 10^4)}{\text{N}^\circ \text{ cuadrantes}} \quad (\text{ec-1})$$

Siendo 10⁴ el factor de corrección para el volumen de la cámara.

3.3.1.3. Subcultivo de células adherentes

Para realizar los pases de las líneas adherentes se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se eliminó el medio de cultivo con ayuda de una pipeta *pasteur* y una bomba de vacío.
2. La monocapa adherente se lavó con 0.5 o 1 mL de PBS 1x estéril (solución fosfato a pH 7.4; GIBCO) para placas de 35 mm o 100 mm, respectivamente.
3. Se eliminó el PBS y se añadió 0.5 o 1mL de tripsina-EDTA (0.25% tripsina-EDTA 1mM pH 8.0, Gibco, *Life Technologies*) atemperada, incubándose en condiciones estándar de cultivo entre 2-5 minutos, dependiendo de la línea celular.
4. Tras el periodo de incubación, se añadió un volumen equivalente de medio completo para neutralizar el efecto de la tripsina y se centrifugó a 1500 r.p.m durante 5 minutos en un tubo de centrifuga de fondo cónico de 15 mL.
5. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en un 1 mL de medio completo, pipeteando suavemente para favorecer la desagregación y obtener una suspensión celular homogénea para el cálculo preciso de la densidad celular.
6. Se realizó el recuento en la cámara de Neubauer y la consiguiente dilución requerida.

3.3.1.4. Subcultivo de células en suspensión

Para realizar los pases de las líneas en suspensión se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se determinó la viabilidad y densidad celular y se transfirió un volumen de cultivo para una densidad celular de 0.4×10^6 /mL a un tubo de centrifuga de 15 mL.
2. Se centrifugaron a 1500 r.p.m durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5, 20 o 40 mL de medio completo, según el frasco de cultivo a utilizar.

3.3.1.5. Criopreservación

Para el almacenamiento de las líneas durante largos periodos de tiempo se procedió a su congelación, respetando la subconfluencia y el crecimiento en fase exponencial. A continuación se detalla brevemente el protocolo de congelación y descongelación.

Protocolo de congelación

1. Para las líneas adherentes se realizó el proceso de tripsinización descrito anteriormente.
2. Se determinó la viabilidad y densidad celular, y se centrifugó a 1200 r.p.m durante 5 minutos un volumen de suspensión para congelar aproximadamente 1×10^6 células por criotubo.

3. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 900 μL de medio de cultivo completo y 100 μL de DMSO, utilizado como agente crioprotector.
4. Los criotubos fueron introducidos en un recipiente con isopropanol (Nalgene® Mr. Frosty) y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pasados unos días, los criotubos se introdujeron en el tanque de nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su utilización.

Protocolo de descongelación

1. El criotubo se descongeló en el baño termostático a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación constante.
2. Una vez descongelado, se transfirió su contenido a un tubo de centrifuga de 15 mL y se añadió hasta 5 mL de medio completo homogeneizando con la pipeta.
3. Se centrifugó a 1000 r.p.m durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 mL de medio completo en una placa de 60 mm o frasco de 25 cm^2 .

3.3.2. Preparación de las disoluciones *stock*

Las sulfonamidas **S1-26** y los derivados poliamínicos, en su forma clorhidrato, se disolvieron en DMSO a una concentración de 100 mM. A partir de esta disolución *stock* se realizaron las diferentes diluciones seriadas a una concentración de 1, 5 y 10 mM para su uso inmediato y permitir que la concentración final de DMSO por placa/pocillo en los diferentes ensayos no excediera el 0.2%.

La disolución *stock* se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante largos períodos, mientras que las disoluciones de 1 y 10 mM se mantuvieron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su utilización inmediata en los diferentes ensayos.⁵⁷

3.3.3. Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el *kit* comercial *Cell Titer-Glo luminiscent assay* (Promega, Madison, WI), ensayo quimioluminiscente para la detección de células metabólicamente activas a partir de la cuantificación de ATP.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos. Para las líneas en suspensión se transfirió un volumen equivalente a una densidad celular de 10.000 células/pocillo en placas de fondo redondo. Para las líneas adherentes se sembraron 4000 células por pocillo en placas estándar y a las 24 horas, una vez adheridas, se trataron con los diferentes compuestos. En ambos casos se estableció un control negativo correspondiente al tratamiento de las células con el disolvente utilizado como vehículo, en este caso DMSO y un blanco de reacción (DMSO + medio de cultivo) para determinar el ruido de fondo del reactivo.

Se establecieron como condiciones de tratamiento estándar para los diferentes *screenings* una concentración de 10 μM y un periodo de incubación de 48 horas, determinándose cada condición por triplicado en tres ensayos independientes.

Tras 48 horas de tratamiento se aspiró el medio y, se añadió 100 μL de medio nuevo y el mismo volumen de reactivo *Cell Titer Glo Reagent* atemperado. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia y se realizó la lectura en un lector de placas *Synergy HT multi-detection microplate reader* (Biotek, Winooski, VT), con el software *Gen5 Data Analysis* con un tiempo de integración de 0.5.

Los datos se normalizaron respecto al control y se expresan como porcentaje de la viabilidad celular.

3.3.4. Determinación del valor IC_{50}

El valor de IC_{50} corresponde a la concentración de fármaco que produce una reducción de la viabilidad celular en un 50%, parámetro utilizado en la evaluación *in vitro* de agentes antitumorales como determinante de su efectividad entre diferentes compuestos o la sensibilidad a los mismos entre diferentes líneas celulares.⁵⁸

Siguiendo las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente en los ensayos de viabilidad celular, se estableció un rango de concentraciones entre 0.1-50 μM y un período de incubación de 48 horas. Cada concentración se evaluó por triplicado en cada ensayo, realizándose hasta tres ensayos independientes.

Los datos de luminiscencia obtenidos se normalizaron respecto a los valores del control negativo y se calculó la IC_{50} a partir de la curva dosis-respuesta con el programa Graphpad Prism 6 (La Jolla California, USA), mediante un ajuste de regresión no lineal con pendiente variable de acuerdo con la ecuación sigmoidea⁵⁹ (e.c-2):

$$y = \frac{y_{\text{máx}}}{1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - x)_n}} \quad (\text{ec-2})$$

Donde:

- **y**: viabilidad celular (%)
- **x**: concentración de compuesto (log[compuesto])
- **n**: coeficiente de Hill

3.3.5. Análisis de la distribución del ciclo celular

Las líneas adherentes se sembraron a una densidad celular de 2×10^4 células/mL en placas de 100 mm, y a las 24 horas de incubación, manteniendo la subconfluencia, se trataron con los compuestos seleccionados.

La densidad celular utilizada para la línea celular Jurkat, en fase exponencial de crecimiento, fue de 4×10^5 células /mL en frascos de 25 cm², tratadas a la misma dosis y periodo de incubación.

A continuación se resume el protocolo utilizado:

1. Tras el periodo de incubación, de 24 o 48 horas, se transfirió a un tubo cónico de centrífuga de 15 mL, tanto el medio de cultivo como el PBS de los lavados, y un volumen de suspensión celular de al menos 1×10^6 células (previa tripsinización en células adherentes).
2. Las diferentes suspensiones se centrifugaron a 1400-1500 r.p.m durante 5 minutos.
3. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1000 μ L de etanol frío al 70% (-20 °C) gota a gota y en agitación para evitar la formación de agregados.
4. Las suspensiones se incubaron al menos durante 30 min a 4 °C. Ocasionalmente, una vez fijadas, se mantuvieron a -20 °C hasta su marcaje y análisis.
5. Tras el periodo de fijación, se realizaron dos lavados con 0.5 mL de PBS 1x frío, centrifugando a 1200 r.p.m durante 10 minutos a 4 °C.
6. Finalmente las células se resuspendieron en 500 μ L de PBS y el volumen correspondiente de RNasa A (5 mg/mL; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y IP (1 mg/mL; Sigma Aldrich, St Louis, MO) hasta una concentración final de 50 μ g/mL.
7. Las muestras se incubaron durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente hasta el análisis de fluorescencia.

Las muestras se analizaron con un citómetro FACScan (Coulter Epics XL-MSL, Beckman Coulter, Fullerton, CA), utilizando el programa informático EXPO 32 ADC para la adquisición de datos. Se adquirieron 20000 eventos por cada condición experimental a una velocidad no superior a mil eventos por segundo, detectándose la fluorescencia del IP en el canal FL3. La cuantificación de cada una de las fases del ciclo celular se realizó con los programas *Flowing Software 2* y *WinMDI Software* y se expresan como la media del porcentaje de células en cada fase de tres ensayos independientes \pm SD.

3.3.6. Ensayo de senescencia

Para confirmar la inducción de senescencia se utilizó el *kit Senescence Cells Histochemical Staining* (CS0030, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Los ensayos se realizaron con las líneas adherentes LN229 y PC3 en placas de 6 pocillos, siguiendo las pautas habituales de siembra de células y tratamiento con los

compuestos. Para evitar la subconfluencia se estableció una densidad celular dependiente de línea, de 12×10^4 células/pocillo para LN229 y, de 15×10^4 células/pocillo para PC3, de crecimiento más lento. Tras 24 horas de tratamiento a una dosis $10 \mu\text{M}$ se determinó la inducción de senescencia siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cada condición se evaluó por duplicado en tres ensayos independientes.

Protocolo de ensayo

1. Se eliminó el medio y se lavó 2 veces con PBS 1x estéril.
2. Tras los lavados, se adicionó 1.5 mL de tampón de fijación 1x (20% formaldehído, 2% glutaraldehído, 70.4 mM Na_2HPO_4 , 14.7 mM KH_2PO_4 , 1.37 M NaCl, 26.8 mM KCl), y se mantuvo durante 7 minutos a temperatura ambiente.
3. Durante el periodo de fijación se preparó la mezcla de tinción para un volumen de 6 mL (0.6 mL de solución de tinción 10x, 75 μL de reactivo B: $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 75 μL de reactivo C: $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 150 μL de solución X-gal, y 5.1 mL de agua Milli-Q esterilizada), con el X-gal previamente atemperado en el baño a 37°C para evitar la formación de agregados.
4. Se eliminó el tampón de fijación 1x y se lavaron tres veces con PBS 1x.
5. Se añadió 1 mL de mezcla de tinción por pocillo y la placa se selló con parafilm para su incubación posterior, durante toda la noche, a 37°C en una estufa sin CO_2 y evitar la formación de ácido carbónico y mantener el cultivo a pH 6.
6. El porcentaje de células senescentes se determinó ($[\text{células senescentes}/\text{células totales}] \times 100$) con ayuda de un microscopio invertido ZEISS a una magnificación 10x y al menos 10 campos por pocillo, considerando como células senescentes aquellas que presentan una evidente coloración azul intensa en la región perinuclear que se extiende por todo el citoplasma.

3.3.7. Análisis de inducción de apoptosis

3.3.7.1. Ensayos de actividad caspasa

Determinamos la activación de las caspasas ejecutoras -3 y -7 mediante el *kit Caspase-Glo 3/7 assay* (Promega, Madison, WI).

El ensayo se realizó paralelamente a los estudios de viabilidad celular, siguiendo el mismo procedimiento de siembra, tratamiento e incubación en las mismas líneas celulares. De la misma manera se estableció un control negativo correspondiente al tratamiento de las células con DMSO y un blanco de reacción (DMSO + medio de cultivo) para determinar la actividad basal de las caspasas.

Tras 48 horas de tratamiento, se aspiró el medio y se añadió 50 μL de medio nuevo y el mismo volumen de reactivo *Caspase-Glo[®] 3/7 Reagent* atemperado. La mezcla se incubó a

temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia y se realizó la lectura en un lector de placas *Synergy HT multi-detection microplate reader* (Biotek, Winooski, VT), con el software *Gen5 Data Analysis* con un tiempo de integración de 0.5.

Los datos se normalizaron respecto al control y se expresan como *fold induction* de la actividad caspasa.

3.3.7.2. Determinación del potencial de membrana mitocondrial

La monitorización de la MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) se realizó con el kit *MitoProbe™ JC-1 Assay (Molecular Probes™)*.

Se realizó el ensayo en la línea celular LN229 a diferentes tiempos de incubación (16, 24, 32 y 48 horas) tras una concentración única de los compuestos seleccionados de 10 μM , siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Protocolo de ensayo

1. Tras el periodo de incubación, se transfirió un volumen de suspensión celular de al menos 1×10^6 células a un tubo cónico de centrifuga de 15 mL.
2. Las diferentes suspensiones se centrifugaron a 1400-1500 r.p.m durante 5 minutos.
3. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 0.5 mL de PBS 1x frío, centrifugando a 1200 r.p.m durante 10 minutos a 4 °C.
4. El pellet resultante se resuspendió en un 1 mL de PBS 1x en tubo eppendorf.
5. Se añadió 10 μL de una disolución stock de 200 μM de JC-1 a las diferentes muestras (concentración final de 2 μM) y se incubaron a 37 °C y 5% CO_2 durante 30 minutos.
6. Tras el periodo de incubación se realizó un lavado con PBS (1 mL) y, finalmente se resuspendieron en 500 μL de PBS.

Las muestras se analizaron con un citómetro FACScan (Coulter Epics XL-MSL, Beckman Coulter, Fullerton, CA), utilizando el programa informático EXPO 32 ADC para la adquisición de los histogramas y, el programa *Flowing Software 2* para la cuantificación de la emisión en cada canal. La señal fluorescente de los monómeros JC-1 se midió en el canal FL1 (fluorescencia verde, 530 nm) y los agregados en el FL3 (fluorescencia naranja-roja, 590 nm). Se adquirieron 10000 eventos por cada condición experimental a una velocidad no superior a mil eventos por segundo. Los resultados, correspondientes a dos ensayos independientes evaluada cada condición por duplicado, se expresan como la media de la relación ratiométrica de FL3/FL1 (ratio rojo/verde) \pm SD.

3.3.7.3. Determinación del porcentaje de apoptosis

El ensayo se realizó mediante el *kit ApoTarget Annexin-V-FITC Apoptosis* (Invitrogen, Carlsbad, CA), tras 24, 48 o 72 horas de tratamiento, a una dosis de 10 μ M con los compuestos seleccionados, en LN229 y PC3.

Por cada línea celular se sembraron 15×10^4 células en placas de 60 mm. Tras las 24h de adherencia y los correspondientes periodos de tratamiento se recogieron las muestras de manera análoga al procedimiento descrito para el análisis de la distribución del ciclo celular y se prosiguió con el kit según las recomendaciones del fabricante.

Protocolo de ensayo

- 1- Asegurando al menos la cantidad de 2.5×10^6 células por condición, tras los lavados con PBS, se resuspendió el pellet en 100 μ L de ABB 1x (*Annexin Binding Buffer*: 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2).
- 2- Se añadieron 5 μ L del conjugado de anexina V-FICT y 1 μ L de IP (50 μ g/mL) para cada condición, y se incubaron durante 15-30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 3- Tras el periodo de incubación las muestras fueron diluidas con 400 μ L de ABB y conservadas en hielo hasta su análisis.

Las diferentes condiciones se analizaron con un citómetro FACScan (Coulter Epics XL-MSL, Beckman Coulter, Fullerton, CA), utilizando el programa informático EXPO 32 ADC para la adquisición de los *dot-plots*. Se adquirieron 10000 eventos por cada condición experimental a una velocidad no superior a mil eventos por segundo, detectándose la fluorescencia del IP en el canal FL3 y la del conjugado anexina V-FITC en el canal FL1.

La cuantificación de cada uno de los cuadrantes se realizó con los programa *Flowing Software 2 WinMD Software*, y los resultados, correspondientes a tres ensayos independientes, se expresan como la media del *fold increase* respecto al control \pm SD.

3.3.8. Análisis del daño al ADN

3.3.8.1. Detección de γ -H2AX

La monitorización de los niveles de fosforilación de H2AX se realizó mediante citometría de flujo, tras un tratamiento de 4 horas con los compuestos seleccionados, en las líneas celulares LN229, Z-138 y SP53.

La línea LN229 se sembró a una densidad de 6×10^5 células en placas de 35 mm y, una vez adheridas, se trataron junto con Z-138 y SP53 a una dosis 10 μ M. Tras el periodo de incubación realizamos el ensayo a partir del siguiente protocolo.

Protocolo de ensayo:

1. A partir de la suspensión celular, previa tripsinización de las células adherentes, se centrifugó un volumen correspondiente a 1.5×10^6 células.
2. Se realizaron dos lavado con PBS frío y las células se fijaron con formaldehído al 3.7% (30-40 μ L) durante 15 minutos en hielo.
3. Posteriormente, se realizó la permeabilización con 40 μ L de Triton-X (0,2% v/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con 600 μ L de PBS.
4. Tras los lavados, se añadió el anticuerpo primario anti-p-(S139)-H2AX (*Cell Signaling Technology*), 40 μ L/muestra a una dilución 1:400 en solución de permeabilización y se incubó durante 30 minutos en hielo.
5. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 1 mL de Triton-X al 0.2% en PBS y se añadió el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 555 (*Jackson ImmunoResearch*), 40 μ L/muestra a una dilución 1:400 en solución de permeabilización, incubándose durante 20 minutos en hielo y en oscuridad.
6. Tras realizarse dos lavados con 1 mL de Triton-X al 0.2% en PBS, el pellet se resuspendió en solución para FACS.

Las diferentes condiciones se analizaron con un citómetro FACScan (Coulter Epics XL-MSL, Beckman Coulter, Fullerton, CA) utilizando el programa informático EXPO 32 ADC para la adquisición de los histogramas. Se adquirieron 10000 eventos por cada condición experimental a una velocidad no superior a mil eventos por segundo, detectándose la fluorescencia en el canal FL1.

Los histogramas obtenidos se analizaron con el programa *Flowing Software 2*, y los resultados, correspondientes a tres ensayos independientes, se expresan como *fold increase* de la intensidad de fluorescencia respecto al control \pm SD.

3.3.8.2. Ensayos clonogénicos

Se evaluó la clonogenicidad de las líneas celulares LN229 y PC3 tras un corto pretratamiento de 4 horas con los compuestos seleccionados. Posteriormente se tripsinizaron y fueron sembradas a baja densidad celular, 200 y 500 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Cada condición se evaluó por duplicado en tres ensayos independientes. El periodo para formar las colonias fue de entre 10-20 días dependiendo de la línea celular, siempre evitando la formación de colonias solapantes.

Posteriormente, para el recuento de colonias se realizó la tinción con cristal violeta (0.5% en metanol) y, tras 20 minutos con solución de tinción se lavaron con PBS.

A partir de las células control determinamos la eficiencia de plaqueo (PE, *Plating efficiency*) mediante la ecuación (ec-3).

$$PE = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonias formadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células sembradas}} \times 100 \quad (\text{ec-3})$$

La PE es dependiente de línea y condiciones de cultivo. Su reproducibilidad en los diferentes ensayos permite asegurar que los resultados entre éstos y los diferentes tratamientos son comparativos.⁶⁰

Por último, se realizó el recuento de colonias de los diferentes tratamientos, considerando aquellas formadas por al menos 50 células. Los resultados se expresan en porcentaje de colonias formadas respecto al control.

3.3.9. Ensayo *in vitro* de cierre de herida (*Wound Healing*)

El ensayo se realizó en las líneas celulares LN229 y MCF-7 en placas de 6 pocillos. La densidad celular de siembra establecida como óptima para obtener una monocapa confluyente tras 12 h de adherencia en estas líneas fue de 4×10^5 células/pocillo.

Se realizó un barrido rápido de adquisición de imágenes a dos tiempos por experimento: $T_0 = 0$ h, tiempo correspondiente a la realización de la herida y, $T_1 = 16$ h, tiempo establecido en estas líneas para obtener un 80 % de cierre de herida en los pocillos control.

La visualización y adquisición de las imágenes se realizó con un microscopio Leica DM 2000, con cámara digital incorporada, a una magnificación 4x.

A continuación se detalla brevemente el protocolo llevado a cabo.

Protocolo de ensayo

1. Asegurando unas condiciones equivalentes de al menos una confluencia del 90% en todos los pocillos, con ayuda de una punta estéril amarilla (P200), se realizaron cuatro heridas manualmente con un ángulo de 30°, dos de trayectoria vertical y dos de trayectoria horizontal, sirviéndonos los puntos de cruce de las rectas perpendiculares como guías para la toma de imágenes.⁶¹
2. Se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS 1x para eliminar las células dañadas o aquellas que habían perdido su adherencia al realizar la herida.
3. Se añadió 3 mL de medio completo, suplementado con la sulfonamida **8e** a una concentración de 5 y 10 μM en los pocillos correspondientes.
4. La adquisición de imágenes a T_0 se realizó en un punto referenciado de cada herida y en el cruce de las mismas, adquiriéndose hasta seis imágenes por pocillo.
5. Tras 16 horas de incubación, realizamos la adquisición de imágenes correspondiente a T_1 en los mismos puntos realizados previamente a T_0 y el conteo manualmente.

Los resultados se expresan como la media, de tres ensayos independientes, del porcentaje de la motilidad celular \pm SD respecto al control (**ec-4**), evaluándose por duplicado cada condición y realizándose el conteo de tres heridas referenciadas por pocillo.

$$\% \text{ Motilidad Celular} = \frac{\left(\frac{N(T_1 - T_0)}{L} \right)_{8e}}{\left(\frac{N(T_1 - T_0)}{L} \right)_{ct}} \times 100 \quad (\text{ec-4})$$

Donde:

- $N(T_1 - T_0)$: número de células que han migrado en el intervalo de tiempo de estudio.
- L : apertura de la herida en cm.

3.3.10. Análisis de la expresión de proteínas por *Western blot*

3.3.10.1. Obtención de extractos proteicos totales

Una suspensión celular, previo tratamiento establecido, se centrifugó a 1600 r.p.m durante 5 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con PBS frío a 2000 r.p.m durante 8 min a 4 °C. El pellet se resuspendió en un volumen de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 1% (v/v) Triton X-100), suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasa y fosfatasas, correspondiente a 2/3 del volumen del pellet. Tras 30 minutos en hielo y ciclos sucesivos de agitación en vórtex (cada 5 min aproximadamente), se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 14000 r.p.m durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se congeló a -80 °C hasta su valoración.

La concentración de proteína por muestra se determinó siguiendo el protocolo del método Bradford⁶² respecto a una recta patrón de calibrado de albúmina sérica bovina (BSA, *Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), o el kit *DC™ Protein Assay* de Bio-Rad, con la lectura espectrofotométrica a 595 nm o 750 nm respectivamente.

3.3.10.2. Electroforesis y transferencia de proteínas

Un volumen correspondiente a 60-80 μ g de proteínas totales por muestra se diluyó con tampón de carga (5 mM Tris pH 6.8, 10 % SDS, 50% glicerol, 0.5 % (p/v), azul de bromofenol y 5% β -mercaptoetanol) para completar los lisados. Finalmente las diferentes muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos.

Los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE; *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), mediante el sistema electroforético Mini-Protean III (BioRad), pasando de 60 V, tras su paso por el *stacking gel*, hasta 120 V durante 1 hora. El porcentaje de acrilamida utilizado fue del 10% o 12% según el tamaño de la proteína a analizar. Como marcador de pesos moleculares se utilizó el *Precision Plus Protein Dual Color Standard* de Bio-Rad.

Posteriormente, se realizó la transferencia a membranas de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*, polifluoruro de vivnilideno) Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA) o de nitrocelulosa (Millipore), y se bloquearon con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) durante una hora a temperatura ambiente.

3.3.10.3. Inmunodetección

La membrana previamente bloqueada se incubó durante 1 hora a 4 °C con una solución de TBS-T, 1% de BSA, y 0.5 % de leche desnatada en polvo, con la dilución correspondiente de anticuerpo primario: p-Chk1 (Ref. 2348, *Cell Signaling Technology*, Beverly, MA) a una dilución 1:1000 y, β -tubulina (T0198, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una dilución 1:4000.

Tras realizar 4 lavados de 10 minutos con TBS-T, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado a peroxidasa (HRP, *horseradish peroxidase*, Dako, Glostrup, Dinamarca), a una dilución 1:2000 durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizaron dos lavados con TBS-T y un lavado con TBS antes del revelado. La detección se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit “*Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (ECL)*” (Thermo Fisher), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las exposiciones de la membrana a la película fotográfica (Amersham Hyperfilm™ EC) fueron de 1 a 20 minutos, y se revelaron con los correspondientes reveladores y fijadores comerciales de Sigma-Aldrich.

3.3.11. Ensayo *in vitro* de polimerización de tubulina

Se analizó la polimerización *in vitro* de tubulina monomérica purificada mediante el kit *tubulin polymerization assay* (Cytoskeleton Inc, Denver, CO). Siguiendo las recomendaciones del fabricante, la tubulina liofilizada (>99% de pureza) fue reconstituida en frío con tampón 80 mM PIPES pH 6.9, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP, 10.2% glicerol a una concentración 3 mg/mL. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de tubulina reconstituida por pocillo, en placas de 96 pocillos, previamente atemperadas a 37 °C, evaluándose por duplicado cada condición. Finalmente, se midió la absorbancia a 340 nm, cada 60 segundos durante una hora a 37 °C, en un lector de placas *Synergy HT multi-detection microplate reader* (Bio-Tek, Winooski, VT). Los resultados se representan gráficamente según la absorbancia registrada para cada condición en función del tiempo.

3.3.12. Inmunocitoquímica

El análisis del patrón de organización del citoesqueleto microtubular se realizó en las líneas LN229, NIH3T3, MCF-7 y T98G, y la determinación de procesos de micronucleación en SKMG-3 y LN229.

El cultivo de las líneas se realizó sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos. Tras los correspondientes tratamientos y tiempos de incubación, las células fueron fijadas con metanol frío (-20 °C) durante 5 minutos y permeabilizadas en 0.2 % (v/v) de Tritón 100-X durante 30 minutos. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon mediante tratamiento con BSA al 0.5% durante 30 minutos en oscuridad.

Las células fijadas se incubaron durante 1 hora a 37 °C con un anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina (T0198, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) a una dilución 1:400. Se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 488 de emisión en el verde (A21202, Life Technologies, Carlsbad, CA, 1:400), en presencia de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 32670, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, 1:300), agente intercalante de emisión en el azul.

Las preparaciones se analizaron en un microscopio láser de fluorescencia, con óptica confocal espectral Leica TCS SPE (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania).

3.3.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a partir de las medias \pm desviación estándar con el programa GraphPad Prism 6.0. La comparación entre las medias se realizó mediante la prueba *t* de Student o mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA de un factor) según se indica. Los datos para los cuales el valor F fue significativo, se analizaron con un post-test de Turkey para múltiples comparaciones. La hipótesis nula fue aceptada para todos aquellos valores de los test en los que el valor F no resultó significativo con un valor de *p* mayor de 0.05.

3.4. Estudios de interacción con ctDNA

En los diferentes experimentos se utilizó el polinucleótido liofilizado de ADN comercial derivado de timo de ternera (ctDNA, *calftymus* DNA) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO).

La disolución de ctDNA se preparó, sin ninguna purificación adicional previa, a partir de una pequeña cantidad de producto liofilizado (1 mg) en 200 μL de tampón cacodilato sódico 0.05 M a pH = 7.0. Posteriormente, la disolución se homogeneizó por sonicación y se filtró a través de un filtro de 0.45 μm de poro. Previamente a su utilización la disolución se mantuvo a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

La concentración de ADN en moles de nucleótido por litro se determinó por espectroscopía de absorción UV-Vis mediante la ecuación de Lambert-Beer y su coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{\text{ctDNA}} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a partir de la absorbancia registrada a 260 nm tras la adición de diferentes volúmenes de la disolución.

La solución stock de sulfonamida **8e**, debido a su baja solubilidad en agua, se preparó en DMSO, a una concentración 1 mM y posteriormente diluida en tampón a las concentraciones de estudio.

3.4.1. Espectroscopía UV-Vis: Desnaturalización térmica

Los experimentos de desnaturalización se realizaron en cubetas de cuarzo de volumen reducido (1 cm de camino óptico) con un espectrofotómetro Agilent 8453 con sistema de control de temperatura Peltier ($\pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Las curvas de desnaturalización se obtuvieron monitorizando el espectro de absorbancia del ctDNA a partir de las correspondientes disoluciones de diferente relación molar ctDNA: sulfonamida **8e** (0.1, 0.2 y 0.3), entre 200-1000 nm, en un rango de temperatura de 25-98 $^{\circ}\text{C}$, registrándose en incrementos de 0.5 $^{\circ}\text{C}$ y, estabilizándose durante 1 minuto para cada temperatura registrada. Los resultados se expresan como la media de la diferencia entre la T_m en ausencia o presencia de compuesto (ΔT_m) de al menos dos medidas.

3.4.2. Espectroscopía de emisión de fluorescencia

Las valoraciones de fluorescencia se realizaron añadiendo pequeñas alícuotas de la disolución de ctDNA a una disolución de la sulfonamida **8e** a $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ y registrando el espectro de emisión de fluorescencia entre 317–500 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$) en un espectrofluorímetro JASCO FP-6200 a temperatura ambiente.

En el ensayo de desplazamiento de bromuro de etidio (BrEt) se monitorizó el máximo de emisión de fluorescencia del BrEt ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 540\text{-}680 \text{ nm}$) con la adición de pequeñas alícuotas de una disolución de la sulfonamida **8e** para determinadas relaciones

molares. Los espectros registrados se normalizaron respecto a la fluorescencia del BrEt en ausencia de compuesto.

3.4.3. Discoísmo circular (DC)

Los espectros de DC se registraron en un espectropolarímetro JASCO J815 termostatado a 298 ± 0.1 K entre 400 y 200 nm en modo continuo a una velocidad de 50 nm/s. Se registró el espectro por cada adición de pequeñas alícuotas de la sulfonamida **8e** a una solución de ctDNA de 1×10^5 , obteniéndose 5 acumulaciones por muestra.

3.4.4. Estudios de actividad nucleasa

Los ensayos de actividad nucleasa de los compuestos seleccionados fueron realizados por la Dra. Marta González Álvarez en la Universidad Miguel Hernández (UMH) de Elche.

La mezcla que se sometió a incubación consistió en: 7 μ L de tampón cacodilato (0.1 M a pH 6), 1 μ L de pUC18 (0.25 μ g/ μ L), 6 μ L de una solución del compuesto objeto de ensayo en DMSO y 6 μ L de ácido ascórbico en tampón cacodilato. Cada compuesto se estudió en un rango de concentración de 30-60 μ M. Tras 60 minutos a 37 °C se añadieron 3 μ L de tampón de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 30%). La solución se sometió a electroforesis en gel de agarosa (0.8%) en tampón TBE (Tris-base 0.045 M, ácido bórico 0.045 M y EDTA 1mM) con bromuro de etidio (2 μ L/100 mL), a 80V durante 2h.

Los captadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se adicionaron a la mezcla de reacción fueron: DMSO (1M), *tert*-butanol (1M), 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (100 mM), tiron (10 mM) y Superóxido Dismutasa (SOD, 15 unidades). Para estudiar la selectividad en la unión al DNA, se adicionó distamicina (8 μ M) y verde de metilo (2.5 μ L de una solución de 0.01 mg/mL). La neucuproína se utilizó a una concentración 1mM.

3.5. Estudios de *Docking*

Los estudios de *docking* de la sulfonamida **8e** en la cavidad del sitio de unión a la colchicina fueron realizados por el Dr. Rafael Peláez de la Universidad de Salamanca, a partir de las estructuras cristalinas disponibles en el *Protein Data Bank* (PDB) de los complejos formados por diferentes moléculas de interacción con la tubulina: bencenosulfonamidas ABT-751 (3HKC.pdb) y T138067 (3HKE.pdb), Colchicina (3UT5), pirrolidinadiona TN16 (3HKD), piridopirazinas enantioméricas (3N2G.pdb y 3N2K.pdb) y la Podofilotoxina (1SA1).

Se realizó el acoplamiento múltiple con la interfaz del programa Spartan'08, preparadas con *AutoDockTools* (ADT)⁶³ y analizadas con el algoritmo genético Lamarckiano (LGA, *Lamarckian genetic algorithm*) implementado en AutoDock 4.2,⁶⁴ con un número máximo de evaluaciones de energía de 2.5×10^6 , un tamaño de la población de 150 y 27.000 generaciones. Los resultados fueron analizados por ADT y un software desarrollado por el propio grupo de investigación del Dr. Peláez.⁶⁵

3.6. Bibliografía

1. Mestrelab Research, S. L. *MestReNova Software*, 9.0; <http://mestrelab.com/software/mnova/>, **2016**.
2. Dea-Ayuela, M. A.; Castillo, E.; González-Álvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Bolás-Fernández, F.; Borrás, J.; González-Rosende, M. E., *In vivo* and *in vitro* anti-leishmanial activities of 4-nitro-*N*-pyrimidin- and *N*-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and *N*²-(4-nitrophenyl)-*N*¹-propylglycinamide. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17* (21), 7449-7456.
3. Kravtsov, D. N.; Nesmeyanov, A. N., Synthesis and structure of phenylmercury derivatives of 4-arylsulfonylaminopyridines. *Bull Acad Sci USSR, Div Chem Sci* **1967**, *16* (5), 990-995.
4. González-Rosende, M. E.; Castillo, E.; Asins, B.; Mamouni, R.; Sepúlveda-Arques, J., Transamidation reactions of 2-(2-sulfonylguanidino)acetamides. *Tetrahedron* **2007**, *63* (36), 8709-8714.
5. English, J.; Chappell, D.; Bell, P., New Compounds. Substituted Sulfonamides. *J Am Chem Soc* **1942**, *64* (10), 2516-2516.
6. English, J. P.; Clark, J. H.; Shepherd, R. G.; Marson, H. W.; Krapcho, J.; Roblin, R. O., Studies in chemotherapy. XIV. Antimalarials. The synthesis of substituted metanilamides and related compounds I. *J Am Chem Soc* **1946**, *68* (6), 1039-1049.
7. Sveinbjornsson, A.; VanderWerf, C. A., Some fluorine containing isosteres of sulfa drugs. *J Am Chem Soc* **1951**, *73* (2), 869-870.
8. Grigorovskii, A. M., Syntheses of sulfanilamide and its *N*-substituted derivatives from chlorobenzene. II. *p*-Chlorobenzenesulfonamide and its derivatives. *Russ J Gen Chem* **1957**, *27*, 531-538.
9. Rose, F. L.; Swain, G., 181. 2-*p*-Aminobenzenesulphonamidopyrimidines. Preparation by a novel route. *J Chem Soc* **1945**, (0), 689-692.
10. Hultquist, M. E.; Germann, R. P.; Webb, J. S.; Wright, W. B.; Roth, B.; Smith, J. M.; Row, Y. S., *N*-Heterocyclic Benzenesulfonamides. *J Am Chem Soc* **1951**, *73* (6), 2558-2566.
11. Vigorita, M. G., Aminopyrazinyl derivatives: synthesis and evaluation of antiinflammatory and related activities. *Farmaco* **1994**, *49* (4), 271-276.
12. Cejudo, R.; Alzuet, G.; González-Álvarez, M.; García-Gimenez, J. L.; Borrás, J.; Liu-González, M., DNA cleavage reaction induced by dimeric copper(II) complexes of *N*-substituted thiazole sulfonamides. *J Inorg Biochem* **2006**, *100* (1), 70-79.
13. Ganellin, C. R.; Triggle, D. J., *Dictionary of Pharmacological Agents*. CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, USA. **1996**.
14. George, N., 2-(*p*-amino-benzenesulfonamido)-4-methyl-5-hydroxyethyl thiazole. US2433388 A, **1947**.
15. Sprague, J. M.; Kissinger, L. W., Sulfonamido derivatives of thiazoles. *J Am Chem Soc* **1941**, *63* (2), 578-580.
16. Fosbinder, R. J.; Walter, L. A., Sulfanilamido derivatives of heterocyclic amines. *J Am Chem Soc* **1939**, *61* (8), 2032-2033.
17. Uno, T.; Machida, K.; Hanai, K., Infrared spectra of sulfonamide derivatives. II. Thiophene, thiadiazole, and isoxazole derivatives. *Chem Pharm Bull* **1966**, *14* (7), 756-762.
18. Xu, X.; Weitzberg, M.; Keyes, R. F.; Li, Q.; Wang, R.; Wang, X.; Zhang, X.; Frevert, E. U.; Camp, H. S.; Beutel, B. A.; Sham, H. L.; Gu, Y. G., The synthesis and structure-activity relationship studies of selective acetyl-CoA carboxylase inhibitors containing 4-(thiazol-5-yl)but-3-yn-2-amino motif: Polar region modifications. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17* (6), 1803-1807.
19. Li, X.; Chu, S.; Feher, V. A.; Khalili, M.; Nie, Z.; Margosiak, S.; Nikulin, V.; Levin, J.; Sprankle, K. G.; Tedder, M. E.; Almassy, R.; Appelt, K.; Yager, K. M., Structure-based design, synthesis, and antimicrobial activity of indazole-derived SAH/MTA nucleosidase inhibitors. *J Med Chem* **2003**, *46* (26), 5663-5673.
20. Lácová, M.; Nga, N. T.; Halgaš, J., Vilsmeier-Haack reaction of 2-amino-benzothiazoles with *N*-phenylformamide in the presence of benzenesulfonyl chloride. *Collect Czechoslov Chem Commun* **1988**, *53* (2), 311-318.

21. Verma, S. M.; Khani, L.; Gunakkunru, A.; Saha, A., Synthesis and anticonvulsant activity of some heterocyclic sulfonamides. *J. Inst. Chem. (India)* **2008**, *80*, 8–13.
22. Hill, A. J.; Hall, G. E., Some sulfanilamide derivatives of the isoquinoline Series1. *J Am Chem Soc* **1952**, *74* (3), 666-668.
23. Khalique, A.; Tilney-Bassett, J. F.; Coutts, R. T.; Wibberley, D. G.; Hammond, P. R.; Coates, G. E.; Golightly, D. S.; Baker, E. H.; Mitchell, W. J.; Topsom, R. D.; Vaughan, J.; Emeleus, H. J.; Packer, K. J.; Welcman, N.; Korytnyk, W.; Wiedeman, W.; Lewis, J. R.; Barltrop, J. A.; Giles, D.; Hanson, J. R.; Rogers, N. A. J., Notes. *J Chem Soc* **1962**, (0), 2515-2536.
24. Powell, D. A.; Pelletier, G., Copper triflate/*t*-BuOOAc-catalyzed amidation of allylic and benzylic acetates with sulfonamides. *Tetrahedron Lett* **2008**, *49* (16), 2495-2498.
25. Nägeli, I.; Baud, C.; Bernardinelli, G.; Jacquier, Y.; Moraon, M.; Müllet, P., Rhodium(II)-Catalyzed CH Insertions with [(4-Nitrophenyl)sulfonyl]imino}phenyl-3-iodane. *Helv Chim Acta* **1997**, *80* (4), 1087-1105.
26. Pelletier, G.; Powell, D. A., Copper-catalyzed amidation of allylic and benzylic CH bonds. *Org Lett* **2006**, *8* (26), 6031-6034.
27. Nickl, J.; Heckel, A.; Mueller, E.; Narr, B.; Weisenberger, J.; Eisert, W.; Mueller, T. Benzenesulfonamidoindanyl compounds, medicines containing them and process for their preparation. *Eur. Pat. Appl.* EP 253321 A2, **1988**, 19880120.
28. Michel, J. R.; Jacques, R. Piperazine derivatives. US2534774 A, **1950**, 19501219.
29. Kumar Parai, M.; Panda, G.; Srivastava, K.; Kumar Puri, S., Design, synthesis and antimalarial activity of benzene and isoquinoline sulfonamide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (2), 776-781.
30. Lukanov, L. K.; Venkov, A. P.; Mollov, N. M., Application of the intramolecular α -amidoalkylation reaction for the synthesis of 2-arylsulfonyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines. *Synthesis* **1987**, *1987* (02), 204-206.
31. Ito, K.; Tanaka, H., Syntheses of 1, 2, 3, 4-Tetrahydroisoquinolines from *N*-sulfonyl-phenethylamines and aldehydes. *Chem Pharm Bull* **1977**, *25* (7), 1732-1739.
32. (a) Anelli, P. L.; Lunazzi, L.; Montanari, F.; Quici, S., Doubly and triply bridged polyoxapolyazaheterophanes derived from 2,4,6-trichloro-s-triazine. *J Org Chem* **1984**, *49* (22), 4197-4203; (b) Anatoli, O.; J., H. J.; Y., C. C., The reaction of phthalic anhydride with diethylenetriamine and triethylenetetramine. A literature correction. *Bull Chem Soc Jpn* **1998**, *71* (3), 717-721; (c) Kang, S. O.; Day, V. W.; Bowman-James, K., Tricyclic host for linear anions. *Inorg Chem* **2010**, *49* (18), 8629-8636.
33. (a) Aucejo, R.; Alarcón, J.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Marchin, K. L.; Soriano, C.; Lodeiro, C.; Bernardo, M. A.; Pina, F.; Pina, J.; de Melo, J., A new Zn-II tweezer pyridine-naphthalene system - An off-on-off system working in a biological pH window. *Eur J Inorg Chem* **2005**, 4301-4308; (b) Pitarch, J.; Clares, M. P.; Belda, R.; Costa, R. D.; Navarro, P.; Orti, E.; Soriano, C.; García-España, E., Zn(II)-coordination and fluorescence studies of a new polyazamacrocyclic incorporating 1*H*-pyrazole and naphthalene units. *Dalton Trans* **2010**, *39* (33), 7741-7746.
34. Parola, A. J.; Lima, J. C.; Pina, F.; Pina, J.; Melo, J. S. d.; Soriano, C.; García-España, E.; Aucejo, R.; Alarcón, J., Synthesis and photophysical properties of dansyl-based polyamine ligands and their Zn(II) complexes. *Inorg Chim Acta* **2007**, *360* (3), 1200-1208.
35. Rodríguez, L.; Lima, J. C.; Parola, A. J.; Pina, F.; Meitz, R.; Aucejo, R.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Soriano, C.; Alarcón, J., Anion detection by fluorescent Zn(II) complexes of functionalized polyamine ligands. *Inorg Chem* **2008**, *47* (14), 6173-6183.
36. Ordóñez-Gutiérrez, L.; Espada-Fernández, R.; Dea-Ayuela, M. A.; Torrado, J. J.; Bolás-Fernández, F.; Alunda, J. M., *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int J Antimicrob Ag* **2007**, *30* (4), 325-329.
37. Marín, C.; Inclán, M.; Ramírez-Macías, I.; Albelda, M. T.; Canas, R.; Clares, M. P.; González-García, J.; Rosales, M. J.; Urbanova, K.; García-España, E.; Sánchez-Moreno, M., *In vitro* antileishmanial activity of aza-scorpian macrocycles. Inhibition of the antioxidant enzyme iron superoxide dismutase. *Rsc Adv* **2016**, *6* (21), 17446-17455.
38. González, P.; Marín, C.; Rodríguez-González, I.; Hitos, A. B.; Rosales, M. J.; Reina, M.; Diaz, J. G.; González-Coloma, A.; Sánchez-Moreno, M., *In vitro* activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in

- promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. *Int J Antimicrob Ag* **2005**, *25* (2), 136-41.
39. Bilbao-Ramos, P.; Sifontes-Rodríguez, S.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F., A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular *Leishmania* amastigotes. *J Microb Methods* **2012**, *89* (1), 8-11.
40. Sánchez-Moreno, M.; Gómez-Contreras, F.; Navarro, P.; Marín, C.; Ramírez-Macías, I.; Olmo, F.; Sanz, A. M.; Campayo, L.; Cano, C.; Yunta, M. J., *In vitro* leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. *J Antimicrob Chemo* **2012**, *67* (2), 387-397.
41. Titus, R. G.; Marchand, M.; Boon, T.; Louis, J. A., A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite immunol* **1985**, *7* (5), 545-555.
42. Tellez-Meneses, J.; Mejia-Jaramillo, A. M.; Triana-Chávez, O., Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from domestic and sylvatic vectors in Sierra Nevada of Santa Marta, Colombia. *Acta Trop* **2008**, *108* (1), 26-34.
43. (a) Vega, C.; Rolón, M.; Martínez-Fernández, A. R.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A., A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. *Parasitol Res* **2005**, *95* (4), 296-298; (b) Rolón, M.; Seco, E. M.; Vega, C.; Nogal, J. J.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A.; Malpartida, F., Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Ag* **2006**, *28* (2), 104-109.
44. Sánchez-Moreno, M.; Marín, C.; Navarro, P.; Lamarque, L.; García-España, E.; Miranda, C.; Huertas, O.; Olmo, F.; Gómez-Contreras, F.; Pitarch, J.; Arrebola, F., *In vitro* and *in vivo* trypanosomicidal activity of pyrazole-containing macrocyclic and macrobicyclic polyamines: their action on acute and chronic phases of Chagas disease. *J Med Chem* **2012**, *55* (9), 4231-4243.
45. Marín, C.; Ramírez-Macías, I.; López-Céspedes, A.; Olmo, F.; Villegas, N.; Díaz, J. G.; Rosales, M. J.; Gutiérrez-Sánchez, R.; Sánchez-Moreno, M., *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of flavonoids from *Delphinium staphisagria* against Chagas disease. *J Nat Prod* **2011**, *74* (4), 744-750.
46. Romanha, A. J.; Castro, S. L. d.; Soeiro, M. d. N. C.; Lannes-Vieira, J.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; Blum, B.; Olivieri, B.; Zani, C.; Spadafora, C.; Chiari, E.; Chatelain, E.; Chaves, G.; Calzada, J. E.; Bustamante, J. M.; Freitas-Junior, L. H.; Romero, L. I.; Bahia, M. T.; Lotrowska, M.; Soares, M.; Andrade, S. G.; Armstrong, T.; Degraeve, W.; Andrade, Z. d. A., *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 233-238.
47. Brener, Z., Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop de Sao Paulo* **1962**, *4*, 389-396.
48. Chavan, H. D.; Singh, G.; Dey, C. S., Confocal microscopic investigation of tubulin distribution and effect of paclitaxel on posttranslationally modified tubulins in sodium arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol* **2007**, *116* (3), 320-326.
49. Schneider, U.; Schwenk, H.-U.; Bornkamm, G., Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* **1977**, *19* (5), 621-626.
50. (a) Tucker, C. A.; Bebb, G.; Klasa, R. J.; Chhanabhai, M.; Lestou, V.; Horsman, D. E.; Gascoyne, R. D.; Wiestner, A.; Masin, D.; Bally, M.; Williams, M. E., Four human t(11;14)(q13;q32)-containing cell lines having classic and variant features of Mantle Cell Lymphoma. *Leuk Res* **2006**, *30* (4), 449-457; (b) de Leeuw, R. J.; Davies, J. J.; Rosenwald, A.; Bebb, G.; Gascoyne, R. D.; Dyer, M. J. S.; Staudt, L. M.; Martinez-Climent, J. A.; Lam, W. L., Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum Mol Genet* **2004**, *13* (17), 1827-1837.
51. (a) Stein, G. H., T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest *in vitro*. *J Cell Physiol* **1979**, *99* (1), 43-54; (b) Ishii, N.; Maier, D.; Merlo, A.; Tada, M.; Sawamura, Y.; Diserens, A. C.; Van Meir, E. G., Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* **1999**, *9* (3), 469-479; (c) Thomas, C. Y.; Chouinard, M.; Cox, M.; Parsons, S.; Stallings-Mann, M.; García, R.; Jove, R.; Wharen, R., Spontaneous activation and signaling by overexpressed epidermal growth factor receptors in glioblastoma cells. *Int J Cancer* **2003**, *104* (1), 19-27.

52. Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M., A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **1973**, *51* (5), 1409-1416.
53. Kaighn, M. E.; Narayan, K. S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J. F.; Jones, L. W., Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* **1979**, *17* (1), 16-23.
54. Leibovitz, A.; Stinson, J. C.; McCombs, W. B., 3rd; McCoy, C. E.; Mazur, K. C.; Mabry, N. D., Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* **1976**, *36* (12), 4562-4569.
55. Todaro, G. J.; Green, H., Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **1963**, *17*, 299-313.
56. Strober, W., Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In *Curr Protoc Immunol*, Ed. Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Marguiles, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W. A.3.3-4. New York John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
57. Kozikowski, B. A.; Burt, T. M.; Tirey, D. A.; Williams, L. E.; Kuzmak, B. R.; Stanton, D. T.; Morand, K. L.; Nelson, S. L., The effect of room-temperature storage on the stability of compounds in DMSO. *J Biomol Screen* **2003**, *8* (2), 205-209.
58. Sebaugh, J. L., Guidelines for accurate EC₅₀/IC₅₀ estimation. *Pharm Stat* **2011**, *10* (2), 128-134.
59. Graphpad_Software, Graphpad Prism User Guide. https://www.graphpad.com/guides/prism/6/curve-fitting/index.htm?reg_dr_inhibit_variable.htm, (último acceso mayo 2016).
60. Franken, N. A. P.; Rodermond, H. M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C., Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc* **2006**, *1* (5), 2315-2319.
Rodriguez, L. G.; Wu, X.; Guan, J. L., Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* **2005**, *294*, 23-29.
62. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-254.
63. Sanner, M. F., Python: a programming language for software integration and development. *J Mol Graph Mod* **1999**, *17* (1), 57-61.
64. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* **1998**, *19* (14), 1639-1662.
65. García, R.; Therón, C. A.; López, R.; Peláez, J. L., JADOPPT: Java based AutoDock Preparing and Processing Tool. <Trabajo no publicado>.

Resultados y Discusión

4.1. Síntesis y caracterización estructural de los derivados de sulfonamidas S1-S26

La identificación de cabezas de serie o prototipos en el desarrollo de nuevos fármacos constituye un proceso iterativo, una continua modificación estructural para optimizar sus propiedades. Las modificaciones pueden estar relacionadas directamente con su capacidad de interacción con una diana previamente identificada en los estudios *in silico*; con las características fenotípicas que produce un compuesto cuya diana se desconoce, pero que posee potenciales propiedades terapéuticas; o bien, con su comportamiento farmacocinético. El resultado de este proceso de optimización es la obtención de grandes librerías de compuestos para su posterior evaluación en cribados de alto rendimiento.¹

Atendiéndonos a los resultados previos de nuestro grupo de investigación en la evaluación antiparasitaria de nuevos derivados de bencenosulfonamidas² y, las propiedades antitumorales descritas para este tipo de compuestos (ver sección *Antecedentes Bibliográficos*), sintetizamos una librería de 125 derivados de sulfonamidas, 36 previamente descritos y 89 derivados de nueva síntesis.

El desarrollo del plan de trabajo se ajustó a un esquema de ciclos sucesivos de diseño, síntesis, evaluación biológica, estudios de Relación-Estructura Actividad (REA) y reorientación de los objetivos sintéticos.

En el diseño de las sulfonamidas se establecieron 2 dominios de diversidad estructural (**D1** y **D2**), localizándose el grupo sulfonamido como elemento de unión entre ambos (*figura 4.1*).

En **D1** se introdujeron 26 anillos diferentes, que determinan las diferentes series de sulfonamidas sintetizadas, de **S1** a **S26**, distinguiéndose en: monocíclicas hexagonales (**S1-S3**) y pentagonales (**S4-S7**) heteroaromáticas; bicíclicas con anillos heterocíclicos benzofusionados (**S8-S16** y **S26**), carbocíclicos aromáticos (**S17**) y saturados (**S18-S23**); y monocíclicas saturadas (**S24-S25**).

En cada una de estas series establecidas, se introdujo en **D2** un anillo bencénico sustituido con diferentes grupos electrón-atrayentes o electrón-donantes, preferentemente en posición *para*-, o su homólogo benzofusionado, un grupo naftaleno.

Para determinados derivados, el sustituyente del anillo bencénico ocupó las posiciones *orto*- o *meta*- y, excepcionalmente, también se introdujo en **D2** un anillo heterocíclico, como 8-quinolina, o aromático, un grupo dansilo (*figura 4.2* y *figura 4.3*).

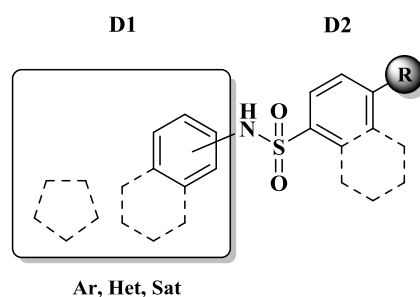


Figura 4.1. Dominios de diversidad estructural **D1** y **D2**. **Ar**: Aromático; **Het**: Heterociclo. **Sat**: Saturado.

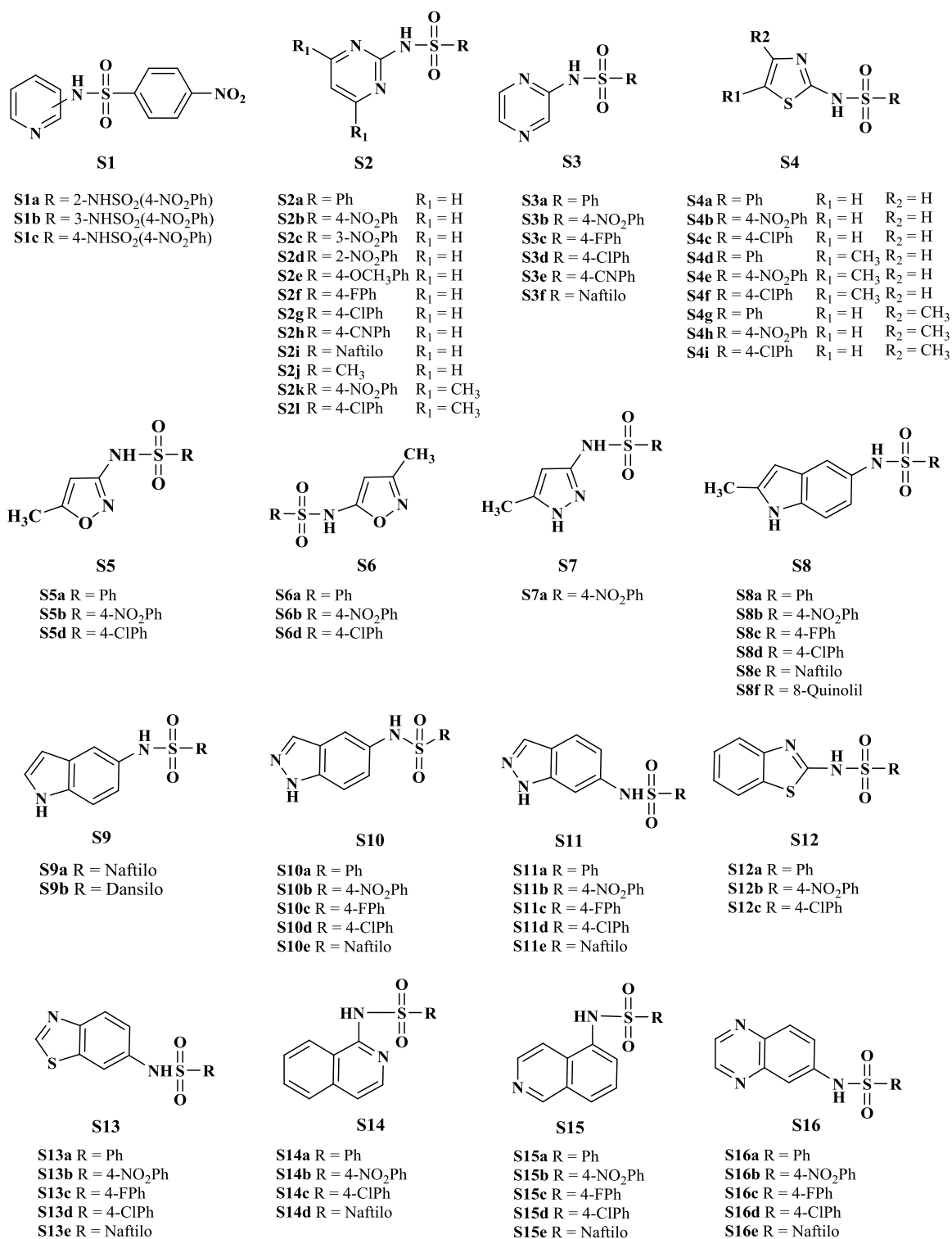


Figura 4.2. Estructura de los derivados de sulfonamidas de las series S1-S16.

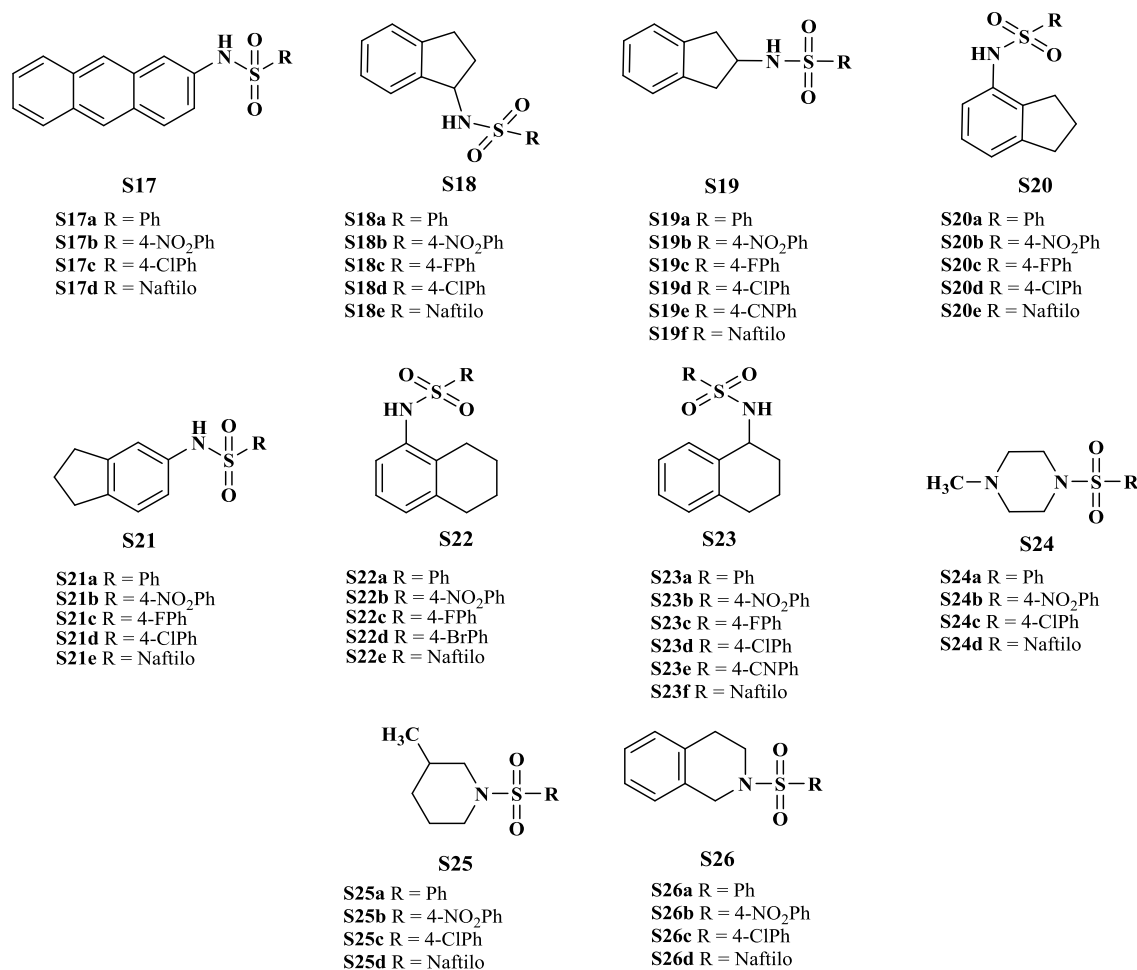


Figura 4.3. Estructura de los derivados de sulfonamidas de las series **S17-S26**.

La estrategia sintética que llevamos a cabo para la obtención de las sulfonamidas **S1-S26** consistió en una reacción de sulfonación de acuerdo con el procedimiento descrito en la bibliografía.³ Para ello, hicimos reaccionar las aminas con un ligero exceso del cloruro de arilsulfonilo correspondiente, ambos comercialmente asequibles, en presencia de piridina a 0 °C (*figura 4.4.A*).

En la reacción de sulfonación, la piridina actúa como disolvente, base y catalizador en tres etapas. En una primera etapa la piridina actúa como catalizador. Reacciona con el cloruro de bencenosulfonilo para formar la sal del cloruro de arilpiridinio. La formación de esta sal aumenta la electrofilia del grupo sulfonamido, permitiendo el ataque nucleofílico del nitrógeno exocíclico de la amina. Por último, la piridina actúa como base desplazando la reacción hacia el producto deseado (*figura 4.4.B*).

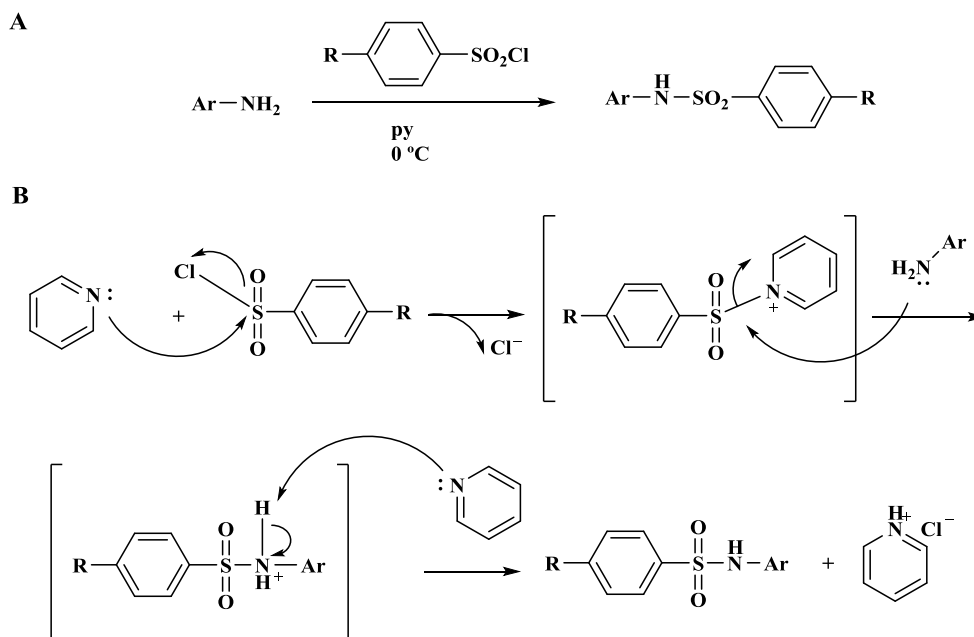


Figura 4.4. Estrategia sintética en la síntesis de las sulfonamidas **S1-S26**. Reacción (A) y mecanismo de sulfonación (B).

Los rendimientos obtenidos oscilaron de moderados a buenos, alcanzándose rendimientos cuantitativos para determinados derivados.

La caracterización se llevó a cabo por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y carbono trece (RMN ^{13}C), análisis elemental y espectrometría de masas de alta resolución (EM-AR), concluyéndose con la determinación de su punto de fusión (pf) (ver sección 3, *Parte experimental*).

Adicionalmente, con el fin de completar la elucidación estructural de los diferentes derivados y la asignación inequívoca de los hidrógenos y sus respectivos carbonos, se llevaron a cabo experiencias DEPT (*Distortionless Enhancement of Polarization Transfer*) y estudios de RMN-2D de correlación homonuclear ^1H - ^1H , COSY (*Correlation Spectroscopy*) y heteronuclear ^1H - ^{13}C , HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*).

Debido a que las distintas series de sulfonamidas comparten en la mayoría de ocasiones el mismo patrón de sustitución en **D2**, la caracterización de los derivados, que componen las 26 series establecidas, se expone de manera estructurada en 6 apartados, en función de la naturaleza del anillo en **D1**:

- A. Monocíclicas hexagonales heteroaromáticas (**S1-S3**)
- B. Monocíclicas pentagonales heteroaromáticas (**S4-S7**)
- C. Bicíclicas con anillos heterocíclicos benzofusionados (**S8-S16** y **S26**)
- D. Derivados de antraceno (**S17**)
- E. Bicíclicas con anillos carbocíclicos saturados benzofusionados (**S18-S23**)
- F. Heterocíclicas hexagonales (**S24** y **S25**)

En cada apartado describiremos, principalmente, el análisis espectroscópico de las señales que permiten la caracterización del anillo que define las distintas series (**D1**), los sistemas de acoplamiento de sus núcleos de resonancia y la asignación propuesta de cada una de estas señales que determinan la estructura esperada. En algunos derivados se expondrá un análisis completo de ambos dominios (**D1** y **D2**). Como soporte de la discusión se mostrarán algunos espectros de RMN 1D y 2D seleccionados. Los espectros de RMN 1D, de ^1H y ^{13}C , y los registrados en las experiencias DEPT de la totalidad de las sulfonamidas sintetizadas se adjuntan en formato digital (*anexo 4*).

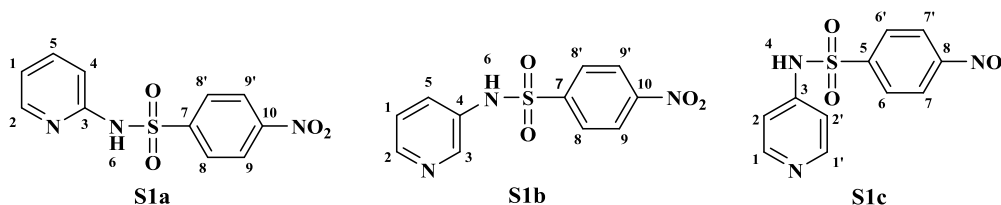
Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm, las diferentes multiplicidades se indican como: s (singulete), d (doblete), dd (doble doblete), ddd (doble doblete de dobletes), dt (doble triplete), t (triplete), td (triplete de dobletes), c (cuadruplete), q (quintuplete), sex (sextete), s.a (singulete ancho) y m (multiplete); y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios (Hz).

El análisis de los diferentes sistemas de acoplamiento de espines se realiza a partir de la nomenclatura de Pople.⁴ Los sistemas de acoplamiento entre dos o más hidrógenos se nombran con letras mayúsculas. Si la diferencia del desplazamiento químico entre las señales ($\Delta\nu$), expresada en Hz, es similar con la J , $\Delta\nu/J < 10$, se nombran con letras próximas (AB), asignándose la letra inicial, A, al hidrógeno con un desplazamiento químico a campo más alto. Si $\Delta\nu/J > 10$, aquellos hidrógenos con un desplazamiento intermedio se nombran con las letras M o N y, aquellos hidrógenos cuyo $\Delta\nu/J$ es mucho mayor se nombran con letras separadas (X, Y, Z).

El conjunto de núcleos isocronos, que por su equivalencia química y magnética forman parte de un mismo sistema de acoplamiento, se nombran con la misma letra, indicándose el número de núcleos perteneciente a tal asignación mediante un subíndice numérico. Aquellos núcleos isocronos que no son magnéticamente equivalentes se representan mediante un sistema de comillas (AA'BB', AA'XX').

A. Caracterización estructural de las sulfonamidas hexagonales heteroaromáticas S1-S3

Para la identificación de los derivados de la serie **S1**, **S1a**, **S1b** y **S1c**, analizamos detalladamente las señales correspondientes al anillo de piridina con el grupo sulfonamido en posición *orto*-, *meta*- y *para*- respecto al nitrógeno piridínico.



En los tres derivados, los hidrógenos del anillo piridínico, numerados como **H1-H5**, forman un sistema de espines fuertemente acoplado de cuatro núcleos de resonancia, en su

mayoría registrados como espectros de primer orden: las distancias entre picos corresponden a las constantes de acoplamiento y los desplazamientos químicos coinciden con el centro de los multipletes.

El compuesto **S1a** se identificó como la 4-nitro-*N*-piridin-2-il-bencenosulfonamida.

Como se muestra en el espectro de RMN ^1H (figura 4.5), los hidrógenos del anillo piridínico *orto*-sustituido (**H1**, **H2**, **H4** y **H5**) resuenan como un sistema de acoplamiento de espines XYZ. Las multiplicidades observadas y los valores de J determinados permiten una análisis de primer orden, asignándose cada señal a uno de los cuatro hidrógenos. **H1** resuena a campo alto ($\delta = 6.86$ ppm) como un doblete de dobletes por su acoplamiento vecinal con **H5** ($J_{orto} = 7.2$ Hz) y **H2** ($J_{orto} = 6$ Hz) y, su acoplamiento a cuatro enlaces con **H4** ($J_{meta} = 0.9$ Hz). En correlación a los valores de estas J , **H5** se asigna a la señal registrada a 7.81 ppm y **H2**, por su posición en α respecto al nitrógeno piridínico, resuena a campo más bajo ($\delta = 7.94$ ppm), con valores de J menores. Ambos hidrógenos, **H5** y **H2**, resuenan como un doblete de dobletes, definido por dos acoplamientos vecinales de diferente magnitud y un acoplamiento a 4 enlaces.

H4, en contraposición a la multiplicidad esperada como ddd, se observa como un doblete triplete a 7.27 ppm con valores de J de 9 y 1 Hz. La constante vecinal $J = 9$ Hz es coincidente con su acoplamiento con **H5**; sin embargo, el desdoblamiento de este doblete en dos tripletes con una J de 1 Hz es debido al solapamiento de las constantes de acoplamiento, *meta* y *para*, con **H1** y **H2** respectivamente.

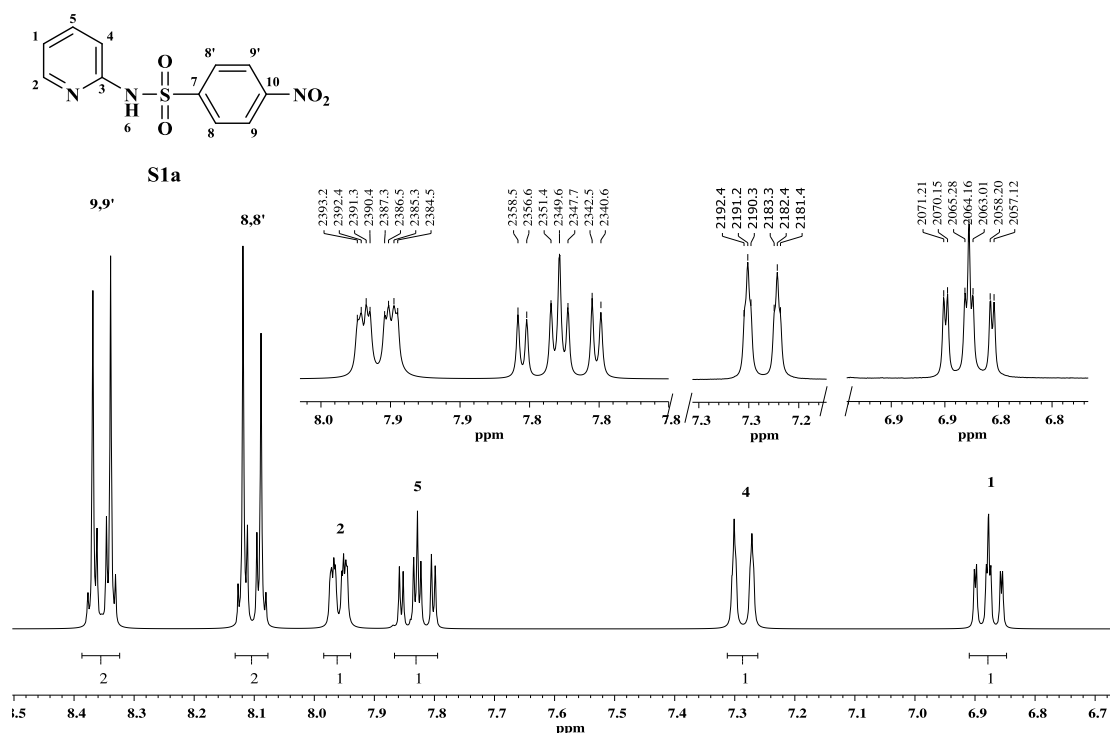


Figura 4.5. Ampliaciones del espectro de RMN ^1H del derivado **S1a**. $\delta = 6.7$ - 8.5 ppm. Se indica la asignación para cada señal en función de la numeración establecida en el compuesto.

A campo más bajo se observan las señales características de anillos bencénicos *para*-sustituídos.⁵ Como se observa en la *figura 4.5*, **H8/H8'** y **H9/H9'** resuenan como un sistema de acoplamiento AA'XX' que dificulta una aproximación de primer orden, por lo que los valores de *J* expresados, tanto para el derivado **S1a** como en los diferentes análisis estructurales de las bencenosulfonamidas que se detallan a continuación, representan la diferencia de los picos más intensos, reduciendo así la complejidad a un sistema de espines A₂X₂.

En el derivado **S1a**, **H8/H8'** y **H9/H9'** presentan una *J* de 8.8 Hz. **H8/H8'** se asignó al doblete de 8.09 ppm y **H9/H9'**, por el carácter fuertemente electrón-atrayente del grupo -NO₂, se asignó al doblete de resonancia a campo más bajo, a 8.34 ppm.

Mediante el análisis de correlación heteronuclear ¹H-¹³C HSQC, los carbonos **C8/C8'** se asignaron a la señal de 128 ppm y a campo más alto, a 124.6 ppm, **C9/C9'** (*figura 4.6*). Estos valores de δ son coincidentes con aquellos descritos en el estudio de caracterización estructural de derivados de 4-nitrobenzenosulfonamidas por *Morales y col.*⁶ A partir de este mismo estudio asignamos los correspondientes carbonos cuaternarios, **C7** a 149 ppm y **C10** a 149.4 ppm. Valores similares se observan para los carbonos de las mismas posiciones en los derivados **S1b** y **S1c**.

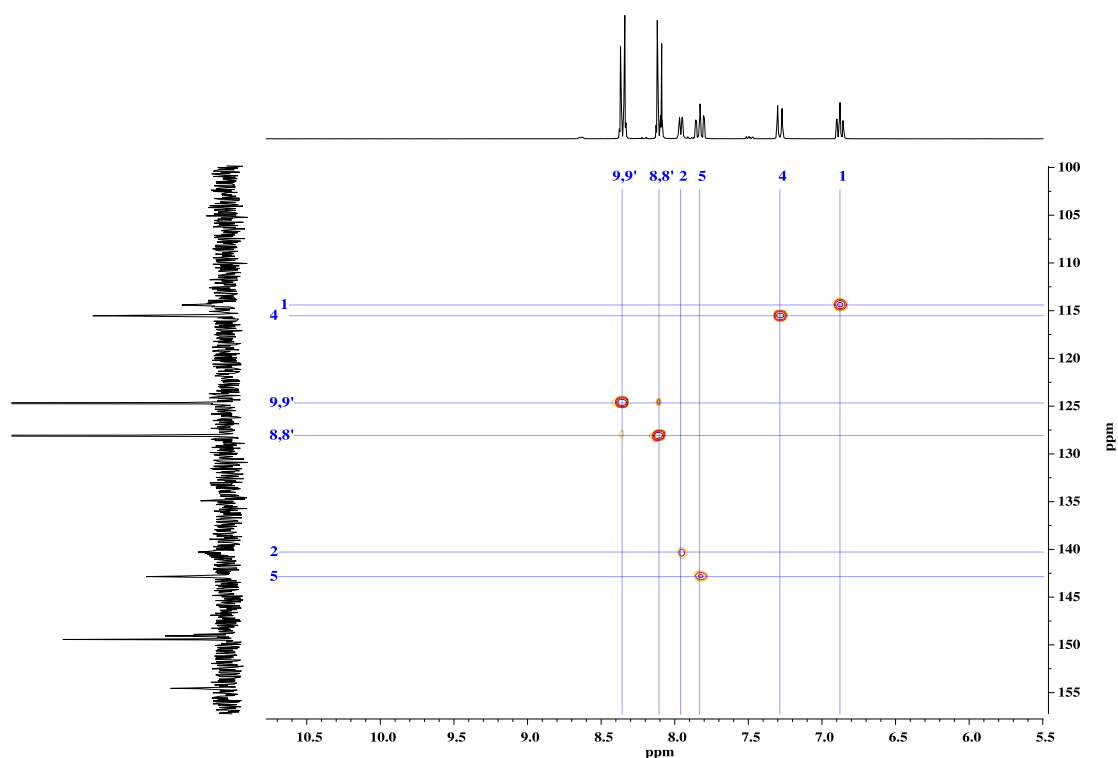


Figura 4.6. Espectro de correlación heteronuclear ¹H-¹³C HSQC del derivado **S1a**. Se indica la asignación para cada señal en función de la numeración establecida en el compuesto.

El compuesto **S1b** se identificó como la 4-nitro-*N*-piridin-3-il-bencenosulfonamida.

En el espectro de RMN de ^1H (figura 4.7) se observan tres señales correspondientes a los cuatro hidrógenos del anillo piridínico. Los hidrógenos **H2** y **H3**, ambos en posición α al nitrógeno endocíclico se asignan fácilmente al multiplete observado entre 8.29-8.32 ppm. A campo más alto, de acuerdo con la multiplicidad esperada, **H1** y **H5** se asignan a las señales de 7.33 y 7.51 ppm respectivamente.

Respecto a la frecuencia de resonancia de los carbonos (tabla 4.1), la sustitución del anillo piridínico en posición *meta*- provoca un aumento en el δ de **C1** (124.5 ppm) y, en menor medida, de **C2** (146.3 ppm), en tanto que disminuye el δ de **C5** (128.6 ppm), respecto a los carbonos del derivado **S1a** (**C1**: 114.4 ppm; **C2**: 140.3 ppm; **C5**:142.8 ppm).

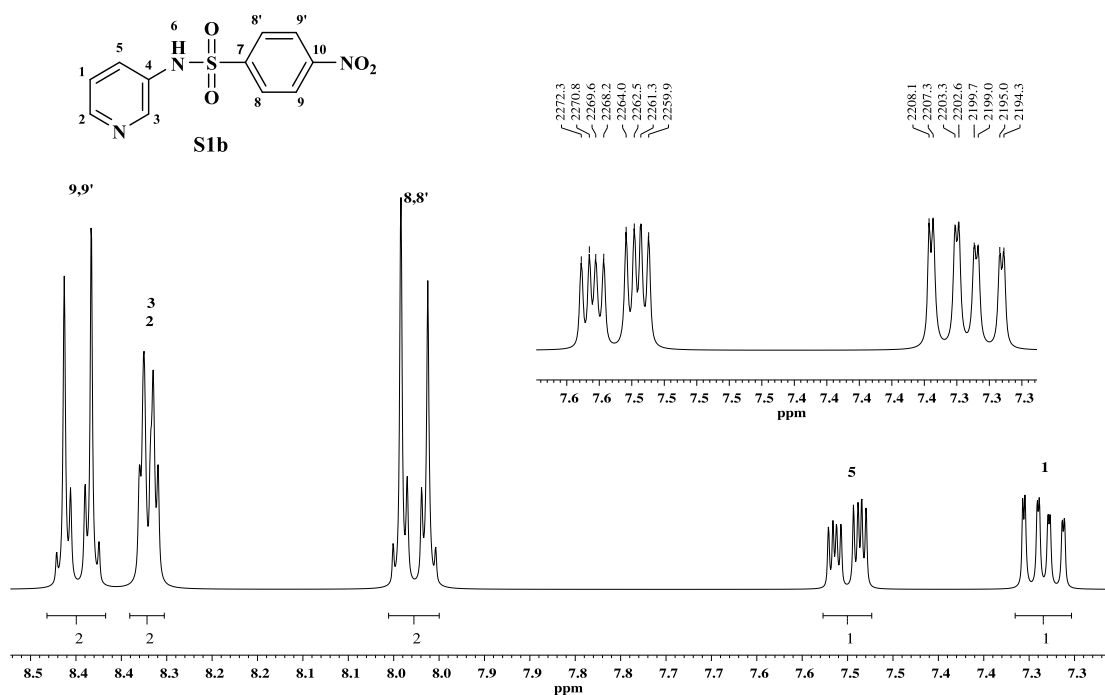


Figura 4.7. Ampliaciones del espectro de RMN ^1H del derivado **S1b**. $\delta = 7.3$ -8.5 ppm. Se indica la asignación para cada señal en función de la numeración establecida en el compuesto.

El compuesto **S1c** se identificó como la 4-nitro-*N*-piridin-4-il-bencenosulfonamida.

El espectro de RMN ^1H confirmó la estructura simétrica de la molécula. En la zona aromática se observan cuatro dobletes correspondientes a dos sistemas de acoplamiento: un sistema A_2X_2 ($\Delta\nu/J_{AX} = 41.77$) entre los hidrógenos del anillo piridínico, **H1/H1'** y **H2/H2'**, con un valor de J de 7.5 Hz, y un sistema A_2B_2 ($\Delta\nu/J_{AX} = 9.06$) entre los hidrógenos del anillo bencénico, **H6/H6'** y **H7/H7'**, con una J de 8.8 Hz (ver anexo 4).

En el espectro de RMN ^{13}C , los carbonos del anillo piridínico, **C1/C1'** y **C2/C2'**, se asignaron a 115.4 y 139.5 ppm respectivamente, de acuerdo a los valores de δ descritos para este tipo de anillos.⁷

En la *tabla 4.1* se resumen los datos espectroscópicos de los tres derivados anteriormente descritos.

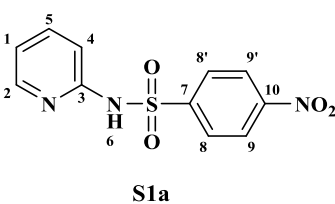
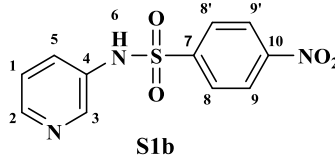
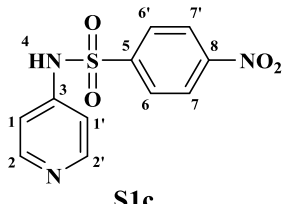
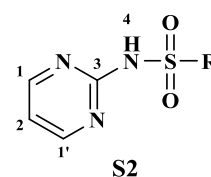
 <p>S1a</p>	RMN ¹H	6.86 (ddd, $J = 7.2, J = 6, J = 0.9$)	H1
		7.27 (dt, $J = 9, J = 1$)	H4
		7.81 (ddd, $J = 9, J = 7.2, J = 1.9$)	H5
		7.94 (ddd, $J = 6, J = 1.9, J = 0.7$)	H2
		8.09 (d, $J = 8.8$)	H8, H8'
	8.34 (d, $J = 8.8$)	H9, H9'	
	RMN ¹³C	114.4 (CH)	C1
		115.5 (CH)	C4
		124.6 (2xCH)	C9/C9'
		128.0 (2xCH)	C8/C8'
140.3 (CH)		C2	
142.8 (CH)		C5	
149.0 (C)		C7	
149.4 (C)		C10	
154.6 (C)	C3		
 <p>S1b</p>	RMN ¹H	7.33 (dd, $J = 8.2, J = 4.8$)	H1
		7.51 (ddd, $J = 8.2, J = 2.6, J = 1.5$)	H5
		8.02 (d, $J = 8.8$)	H8, H8'
		8.29-8.32 (m)	H2, H3
		8.37 (d, $J = 8.8$)	H9, H9'
	10.9 (s, 1H, NH)	H6	
	RMN ¹³C	124.5 (CH)	C1
		125.2 (2xCH)	C9, C9'
		128.6 (CH)	C5
		128.7 (2xCH)	C8, C8'
134.0 (C)		C4	
142.6 (CH)		C3	
144.7 (C)		C7	
146.3 (CH)		C2	
150.3 (C)	C10		
 <p>S1c</p>	RMN ¹H	6.97 (d, $J = 7.5$)	H1, H1'
		8.02 (d, $J = 7.5$)	H2, H2'
		8.04 (d, $J = 8.9$)	H6, H6'
		8.31 (d, $J = 8.9$)	H7, H7'
	RMN ¹³C	115.4 (2xCH)	C1, C1'
		124.5 (2xCH)	C7, C7'
		127.8 (2xCH)	C6, C6'
		139.4 (C)	C3
		139.5 (2xCH)	C2, C2'
		149.1 (C)	C5
150.0 (C)	C8		

Tabla 4.1. Datos espectroscópicos de RMN ¹H (δ , m, J) y ¹³C de los derivados de sulfonamidas **S1a**, **S1b** y **S1c**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

De la serie **S2**, derivados de pirimidina, se sintetizaron 12 bencenosulfonamidas *para*-sustituidas con diferentes grupos electrón-atrayentes o electrón-donantes. En su análisis espectroscópico confirmamos la simetría del anillo pirimidínico, así como la influencia del sustituyente del anillo bencénico disustituido en los δ de sus respectivos núcleos de resonancia.



En la *tabla 4.2* se muestran los datos espectroscópicos del derivado **S2j**, compuesto caracterizado como la *N*-(pirimidin-2-il)metanosulfonamida. La ausencia de un segundo sistema aromático permite identificar fácilmente las señales de resonancia características del anillo pirimidínico, **H1/H1'** y **H2**.

H1/H1' y **H2** resuenan como un sistema de acoplamiento AX_2 con una constante de acoplamiento pequeña de acuerdo a los valores descritos en la bibliografía.⁷ **H1** y **H1'**, química y magnéticamente equivalentes, resuenan a 8.47 ppm como un doblete ($J_{orto} = 4.9$ Hz). A campo más alto, se observa un triplete con la misma J , correspondiente a **H2** ($\delta = 7.03$ ppm).

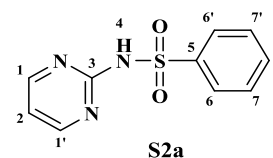
Los diferentes carbonos del anillo aromático son fácilmente asignables por sus desplazamientos (*tabla 4.2*).

<p>S2j</p>	RMN ¹H	3.36 (s)	H5
		7.13 (t, $J = 4.9$)	H2
		8.61 (d, $J = 4.9$)	H1, H1'
		11.33 (s.a, 1H, NH)	H4
RMN ¹³C	41.6 (CH ₃)	C5	
	116.1 (CH)	C2	
	157.9 (C)	C3	
	158.9 (2xCH)	C1, C1'	

Tabla 4.2. Datos espectroscópicos de RMN ¹H (δ , m, J) y ¹³C del derivado de sulfonamidas **S2j**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

El mismo patrón de simetría se identifica fácilmente en los restantes derivados de la serie.

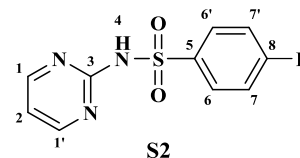
En el espectro de RMN de ¹H del derivado **S2a**, el cual se identificó como la *N*-(pirimidin-2-il)bencenosulfonamida, discernimos las señales correspondientes al bencenosulfonilo. **H6/H6'** ($\delta = 7.96$ ppm) se observa como un doblete ($J_{meta} = 1.3$ Hz, $J_{orto} = 7.9$ Hz). Las señales correspondientes a **H7/H7'** y **H8** se encuentran distorsionadas por la proximidad del desplazamiento químico, asignándose al multiplete de 7.56 ppm.



En el espectro de RMN ¹³C del compuesto **S2a** también se observa la simetría del anillo pirimidínico. Por analogía con el derivado **S2j** asignamos como **C1/C1'** a la señal de 158.0 ppm

y a campo más alto **C2**, a 116.0 ppm. Las cuatro señales restantes corresponden al anillo bencénico: dos señales de mayor intensidad, a 127.8 ppm y 129.2 ppm, correspondientes a **C6/C6'** y **C7/C7'** respectivamente, a 133.2 ppm **C8** y a campo más bajo, a 140.0 ppm, **C5**.

En los espectros de RMN de ^1H de los derivados de la serie **S2** con anillos bencénicos *para*-sustituidos observamos la influencia de la naturaleza, electrón-donante o electrón-atrayente del sustituyente sobre los desplazamientos de los núcleos de resonancia del mismo.



En la *tabla 4.3* se muestran los datos espectroscópicos de las bencenosulfonamidas **S2b**, con un grupo 4- NO_2 , **S2e**, 4- OCH_3 , **S2g**, 4- Cl y **S2h**, 4- CN . Si comparamos los δ de los hidrógenos del anillo bencénico disustituido, **H6/H6'** y **H7/H7'** el orden de desapantallamiento creciente es coincidente con la naturaleza del sustituyente: $-\text{OCH}_3 < -\text{Cl} < -\text{CN} < -\text{NO}_2$.

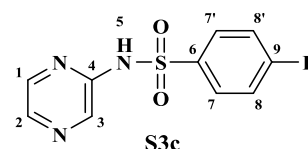
	S2b	S2e	S2g	S2h
R	NO_2	OCH_3	Cl	CN
OCH_3	-	3.78 (s)	-	-
H1/H1'	8.56 (d, $J = 4.9$)	8.49 (d, $J = 4.8$)	8.51 (d, $J = 4.9$)	8.50 (d, $J = 5$)
H2	7.11 (t, $J = 4.9$)	7.03 (t, $J = 4.8$)	7.06 (t, $J = 4.9$)	$\delta = 7.05$ (t, $J = 5$)
H6/H6'	8.24 (d, $J = 9$)	7.92 (d, $J = 8.9$)	7.98 (d, $J = 8.1$)	8.11 (d, $J = 8.7$)
H7/H7'	8.43 (d, $J = 9$)	7.07 (d, $J = 8.9$)	7.63 (d, $J = 8.1$)	8.06 (d, $J = 8.7$)
H4	11.33 (s.a, 1H, NH)	11.62 (s.a, 1H, NH)	12.03 (s, 1H, NH)	-
OCH_3	-	56.0 (OCH_3)	-	-
C1/C1'	158.6 (2xCH)	158.7 (2xCH)	158.7 (2xCH)	158.6 (2xCH)
C2	115.4 (CH)	116.1 (CH)	116.1 (CH)	115.4 (CH)
C3	157.9 (C)	157.8 (C)	157.0 (C)	156.8 (C)
C5	146.8 (C)	132.2 (C)	138.1 (C)	145.4(C)
C6/C6'	129.3 (2xCH)	130.2 (2xCH)	129.4 (2xCH)	133.4 (2xCH)
C7/C7'	124.5 (2xCH)	114.3 (2xCH)	129.8 (2xCH)	128.5 (2xCH)
C8	150.0 (C)	162.8 (C)	139.7 (C)	118.1 (C)
CN	-	-	-	126.8 (CN)

Tabla 4.3. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (δ , m, J) y ^{13}C de los derivados de sulfonamidas **S2b**, **S2e**, **S2g**, **S2h**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

En la elucidación estructural de la serie **S3**, derivados de pirazina sustituidos en posición 2 por el grupo sulfonamido, destacamos dos características que permiten su identificación:

1. Los núcleos de resonancia del anillo de pirazina, con respecto a otras sulfonamidas heterocíclicas, resuenan a campo más bajo que los núcleos del anillo bencénico.
2. Los hidrógenos del anillo pirazínico forman un sistema de espines fuertemente acoplado, con constantes de acoplamiento pequeñas, debido a lo cual, para determinados derivados de la serie no pueden discernirse los correspondientes núcleos de resonancia, siendo asignados como multipletes.

A modo de ejemplo, de entre los seis derivados que componen la serie, se analizan los datos espectroscópicos del derivado **S3c**, caracterizado como la 4-fluoro-*N*-(pirazin-2-il)benzenosulfonamida, cuyos espectros de RMN de ^1H y ^{13}C registrados permiten un análisis de primer orden de las características espectroscópicas del anillo de pirazina.



Como se muestra en la *tabla 4.4*, los hidrógenos **H1**, **H2** y **H3** resuenan en el intervalo entre 8.22-836 ppm, asignándose fácilmente a cada una de las señales observadas, de acuerdo a las multiplicidades y valores de J . A campo más alto, se observó un sistema A_2X_2 , correspondiente a **H7/H7'** y **H8/H8'**, con las multiplicidades esperadas por su acoplamiento con ^{19}F .⁸ **H7/H7'** resuena como un doblete a 8.03 ppm por su acoplamiento vecinal con **H8/H8'** ($J_{orto} = 9$ Hz) y su acoplamiento a cuatro enlaces con el ^9F ($^4J_{\text{H-F}} = 5.2$ Hz). A campo más alto, ($\delta = 7.42$ ppm), resuena **H8/H8'** como un triplete por la similitud entre los valores de J con **H7/H7'** ($J_{orto} = 9$ Hz) y el flúor ($^3J_{\text{H-F}} = 9$ Hz).

En el espectro de RMN de ^{13}C , los valores de J previamente descritos para los acoplamientos heteronucleares ^{13}C - ^{19}F ⁹ permitieron la asignación inequívoca de los diferentes carbonos. **C7/C7'** ($^3J_{\text{C-F}} = 9.75$ Hz) y **C8/C8'** ($^2J_{\text{C-F}} = 22.5$ Hz) resuenan, en correlación con sus respectivos hidrógenos, a 130.7 y 116.6 ppm respectivamente; **C6**, por su J a 5 enlaces ($^5J_{\text{C-F}} = 3$ Hz) se asigna al d de 136.6 ppm y **C9**, ($^1J_{\text{C-F}} = 250.5$ Hz) al doblete de baja intensidad de mayor δ , a 165.0 ppm.

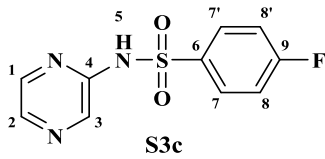
 <p>S3c</p>	RMN ¹H	7.42 (t, $J = 9$)	H8, H8'
		8.03 (dd, $J = 9, J = 5.3$)	H7, H7'
		8.22 (dd, $J = 2.6, J = 1.3$)	H2
		8.23 (d, $J = 2.6$)	H1
		8.36 (d, $J = 1.3$)	H3
	RMN ¹³C	116.6 (d, $J_{C-F} = 22.5$)	C8/C8'
		130.7 (d, $J_{C-F} = 9.75$)	C7/C7'
		135.3 (CH)	C3
		136.6 (d, $J_{C-F} = 3$)	C6
		139.3 (CH)	C2
		142.2 (CH)	C1
		148.3 (C)	C4
165.0 (d, $J_{C-F} = 250.5$)	C9		

Tabla 4.4. Datos espectroscópicos de RMN ¹H (δ , m, J) y ¹³C del derivado de sulfonamida **S3c**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

B. Caracterización estructural de las sulfonamidas pentagonales heteroaromáticos **S4-S7**

Los derivados que componen las series se corresponden con derivados de tiazol (serie **S4**), isoxazol (series **S5** y **S6**) y pirazol (serie **S7**). A continuación, a partir de derivados seleccionados, se analiza conjuntamente, con fines comparativos, las características espectroscópicas que permiten su identificación

En la *tabla 4.5* se muestran los datos espectroscópicos correspondientes a los derivados clorados de la serie **S4** (**S4c**, **S4f** y **S4i**), diferenciándose por la presencia de un metilo en las posiciones 4 o 5; y los derivados clorados de las series **S5** (**S5c**) y **S6** (**S6c**), regioisómeros metilados derivados de isoxazol. También se indican los datos correspondientes al único derivado sintetizado de la serie **S7** (**S7a**), una 4-nitrobenzenosulfonamida.

Los diferentes compuestos fueron caracterizados como:

- **S4c**: 4-cloro-*N*-(tiazol-2-il)benzenosulfonamida
- **S4f**: 4-cloro-*N*-(5-metiltiazol-2-il)benzenosulfonamida
- **S4i**: 4-cloro-*N*-(4-metiltiazol-2-il)benzenosulfonamida
- **S5c**: 4-cloro-*N*-(5-metilisoxazol-3-il)benzenosulfonamida
- **S6c**: 4-cloro-*N*-(3-metilisoxazol-5-il)benzenosulfonamida
- **S7a**: *N*-(5-metil-1*H*-pirazol-3-il)-4-nitrobenzenosulfonamida

Los datos espectroscópicos registrados (*tabla 4.5*) son coincidentes con aquellas descritas para anillos pentagonales sustituidos, tanto para derivados de tiazol como isoxazol⁷ y pirazol.¹⁰

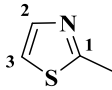
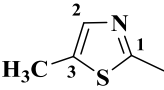
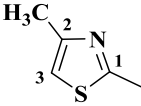
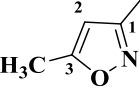
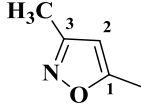
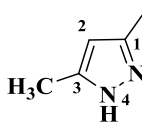
						
	S4c	S4f	S4i	S5c	S6c	S7a
CH₃	-	2.06 (s)	2.06 (s)	2.29 (s)	2.29 (s)	1.94 (s)
H2	7.25 (d, $J = 3.3$)	6.33 (s)	-	6.14 (s)	6.14 (s)	5.15 (S)
H3	6.80 (d, $J = 3.3$)	-	6.33 (s)	-	-	-
CH₃	-	12.4	13.6	12.4	12.4	14.2
C1	169.4	168.5	168.0	157.6	157.6	152.6
C2	125.0	121.0	148.6	95.8	95.8	89.4
C3	109.0	120.7	102.9	171.0	170.9	152.8

Tabla 4.5. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (δ , m, J) y ^{13}C de los heterociclos pentagonales de las 4-clorobencenosulfonamidas de las series **S4** (tiazol), **S5** y **S6** (isoxazol) y la 4-nitrobencenosulfonamida de la serie **S7** (pirazol). Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

Los hidrógenos del anillo de tiazol sustituido en posición 2 (**S4c**), **H2** y **H3**, resuenan como dos dobletes con una constante de acoplamiento vecinal de 3.3 Hz, asignándose **H2** al doblete de resonancia a campo más bajo (7.25 ppm) y **H3** a 6.80 ppm. Con el análisis de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC identificamos los carbonos pertenecientes a las mismas posiciones, **C2** a 125.0 ppm y **C3** a 109.0 ppm (*anexo 4*).

Como se observa en la *tabla 4.5*, la introducción de un metilo, ya sea en la posición 5 (**S4f**) o 4 (**S4i**), provoca un ligero apantallamiento en los carbonos en α . Los hidrógenos metílicos, independientemente de la posición que ocupan en el anillo, resuenan a un mismo valor de δ , registrándose como un singulete a 2.06 ppm en los derivados de tiazol y, a 2.29 ppm en los derivados de isoxazol.

C. Caracterización estructural de las sulfonamidas con anillos heterocíclicos benzofusionados (**S8-S16** y **S26**)

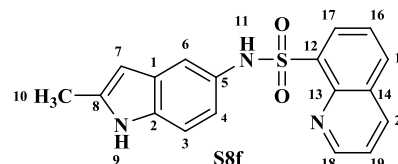
Del total de las 26 series de sulfonamidas que componen nuestra librería, nueve se definen por la presencia de un anillo heterocíclico condensado con un anillo de benceno. Entre éstas se incluyen: derivados de indol (series **S8** y **S9**), indazol (series **S10** y **S11**), benzotiazol (series **S12** y **S13**), isoquinolina (series **S14** y **S15**), quinoxalina (serie **S16**) y tetrahydroisoquinolina (**S26**).

A continuación, detallaremos en primer lugar la caracterización estructural de las series **S8** y **S9**, seguida de un análisis conjunto de las series **S10**, **S11** y **S13**, **S14**, **S15** y **S16**. La caracterización de los derivados de la serie **S12** puede consultarse en los estudios de actividad antibacteriana descritos por *Obasi y col.*¹¹

Como en los diferentes análisis que se describen, a modo de ejemplo seleccionaremos un derivado de cada serie.

En el análisis espectroscópico de la series **S8** y **S9** identificamos los núcleos de resonancia característicos del anillo indólico. De entre los derivados sintetizados en ambas series, detallamos el análisis espectroscópico de las sulfonamidas **S8f** y **S9b**, únicos compuestos del conjunto de todas las series con un sustituyente 8-quinolilo y dansilo respectivamente.

El derivado **S8f** se identificó como la *N*-(2-metil-1*H*-indol-5-il)-quinolil-8-sulfonamida. En el espectro de RMN ^1H (*figura 4.8*) se identificaron once núcleos de resonancia, cuya multiplicidad y valores de *J* permitieron discernir, a campo alto ($\delta = 5.88\text{-}6.98$ ppm), las cuatro señales correspondientes al anillo indólico (**H3**, **H4**, **H6** y **H7**) y a campo más bajo ($\delta = 7.58\text{-}9.21$ ppm), las respectivas al anillo de 8-quinolina (**H15-17**, **H18-20**).



Los valores de δ registrados para los diferentes hidrógenos del anillo indólico se encuentran en los intervalos de resonancia descritos para derivados indólicos 2-sustituidos.¹² **H3**, **H4** y **H6** resuenan como un sistema de espines AMX ($\Delta\nu/J_{\text{H4-H3}} = 11.86$; $\Delta\nu/J_{\text{H4-H6}} = 57$), asignándose **H4** al doble doblete de 6.60 ppm, por su acoplamiento vecinal con **H3** ($J_{\text{orto}} = 8.6$ Hz) y a cuatro enlaces con **H6** ($J_{\text{meta}} = 2$ Hz). De acuerdo al valor de las *J* calculadas para **H4**, el doblete a 6.94 ppm se asignó a **H3** y el doblete a 6.98 ppm a **H6**. **H7** se observa como un singulete a 5.88 ppm y **H9**, hidrógeno del nitrógeno heterocíclico, a 9.39 ppm.

A campo más bajo, en el intervalo de desplazamientos correspondiente al anillo quinolínic sustituido en posición 8, el análisis permitió diferenciar dos sistemas de acoplamiento de tres espines AXY: un sistema correspondiente a los hidrógenos del anillo bencénico con el grupo sulfonamido, **H15**, **H16** y **H17**, y el otro correspondiente a los hidrógenos del anillo piridínico conjugado, **H18**, **H19** y **H20**.

H16 resuena a 7.58 ppm como un triplete con una constante de acoplamiento vecinal de 7.7 Hz, asignándose **H15** y **H17** a los dos dobles dobletes a 8.19 y 8.21 ppm fuertemente acoplados, que debido a su bajo cociente $\Delta\nu/J_{\text{H15-H17}}$, se observan aparentemente como dos núcleos isocronos desdoblados como un triplete de dobletes.

H18, **H19** y **H20**, se observan como un sistema de espines AXY registrados con una misma multiplicidad, un doble doblete, debido a la diferencia entre los valores de las *J* en su acoplamiento vecinal. De tal manera, que **H19** se observa a 7.74 ppm como un doble doblete por su acoplamiento con **H20** (8.52 ppm) con una *J* de 8.4 Hz y con **H18** (9.21 ppm) con una *J* menor, de 4.2 Hz.

El posterior análisis 2D-COSY y HSQC permitió confirmar las correlaciones entre los sistemas de espines anteriormente descritos y la asignación de sus respectivos carbonos (*figuras 4.9 y 4.10*).

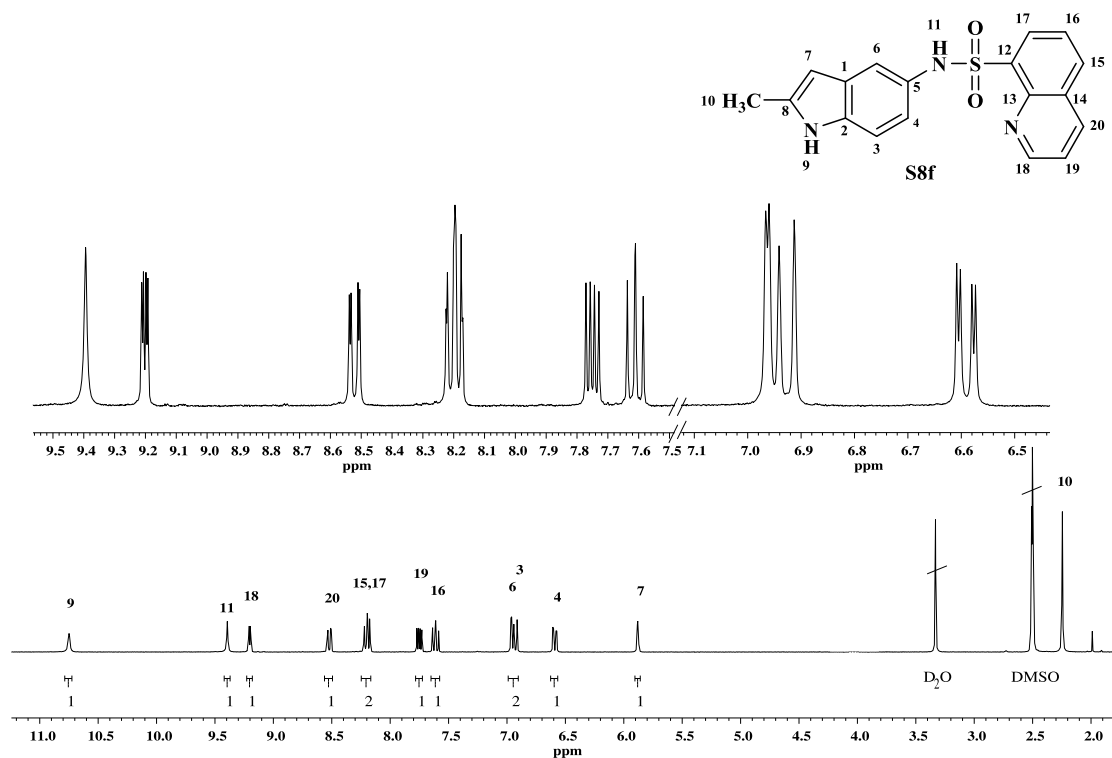


Figura 4.8. Espectro de RMN ^1H del derivado **S8f**. $\delta = 2\text{-}11$ ppm. Se indica la asignación para cada señal en función de la numeración establecida en el compuesto.

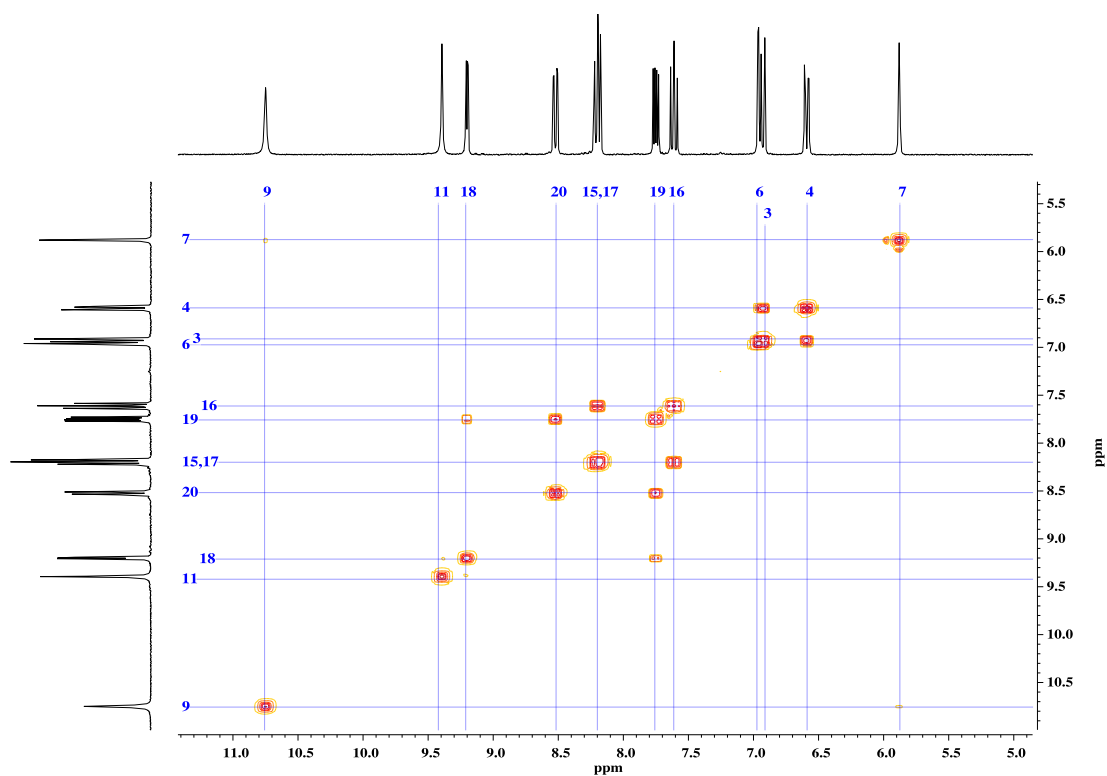


Figura 4.9. Espectro de correlación homonuclear $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY del derivado **S8f**.

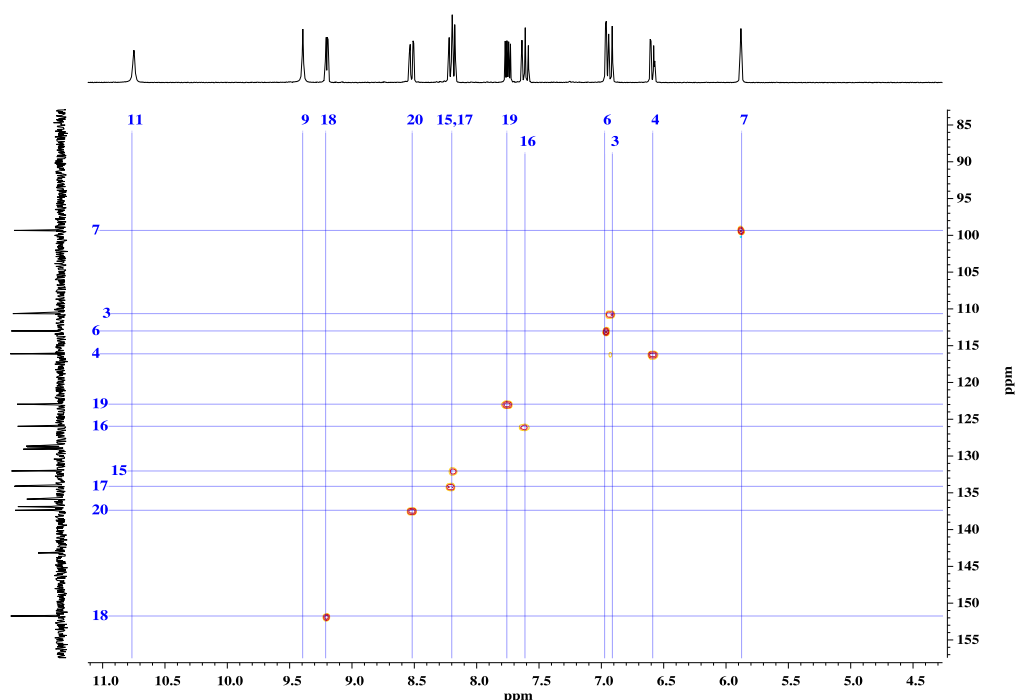


Figura 4.10. Espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC del derivado **S8f**.

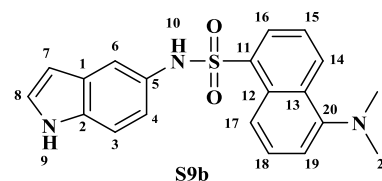
En la *tabla 4.6* se resumen todos los datos espectroscópicos del análisis y la asignación correspondiente de la sulfonamida **S8f**. Se excluyen los carbonos cuaternarios por su elevada complejidad en la asignación.

El derivado **S9b** se identificó como la 5-(dimetilamino)-*N*-(1*H*-indol-5-il)naftalenosulfonamida.

Al igual que en el derivado **S8f**, en el espectro de RMN ^1H del derivado **S9b** (*figura 4.11*) pueden discernirse fácilmente, a campo más alto, las señales correspondientes a los hidrógenos del anillo indólico.

Los núcleos de resonancia del anillo indólico, numerados en nuestra caracterización como **H7** y **H8**, presentan multiplicidades características por su proximidad con el NH endocíclico. Los acoplamientos descritos para estos núcleos presentan valores de menor magnitud respecto al sistema de tres espines del mismo anillo, **H3**, **H4** y **H6**.

Se encuentra descrito que **H7** puede acoplarse con **H8** con una J de valores próximos a 2.5-3 Hz, con el hidrógeno del grupo amino endocíclico con una J de 2-2.5 Hz y, en determinadas ocasiones, incluso puede registrarse su acoplamiento a 5 enlaces con **H3** con J que oscilan alrededor 0.8 Hz.¹³



RMN ¹H	2.25 (s)	H10
	5.88 (s)	H7
	6.60 (dd, $J = 8.6, J = 2$)	H4
	6.94 (d, $J = 8.6$)	H3
	6.98 (d, $J = 2$)	H6
	7.58 (t, $J = 7.7$)	H16
	7.74 (dd, $J = 8.4, J = 4.2$)	H19
	8.19 (dd, $J = 7.7, J = 1.4$)	H15/
	8.21 (dd, $J = 7.7, J = 1.4$)	H17
	8.52 (dd, $J = 8.4, J = 1.7$)	H20
	9.21 (dd, $J = 4.2, J = 1.7$)	H18
RMN ¹³C	9.39 (s.a, 1H, NH)	H11
	10.76 (s.a, 1H, NH)	H9
	13.6 (CH ₃)	C10
	99.3 (CH)	C7
	110.6 (CH)	C3
	113.0 (CH)	C6
	116.1 (CH)	C4
	122.9 (CH)	C19
	126.0 (CH)	C16
	132.0 (CH)	C15 o C17
	134.1 (CH)	C15 o C17
137.4 (CH)	C20	
151.7 (CH)	C18	

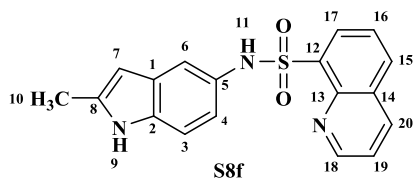


Tabla 4.6. Datos espectroscópicos de RMN de ¹H (δ , m, J) y ¹³C del derivado **S8f**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

Los hidrógenos **H3**, **H4** y **H6** se observan como un sistema de acoplamiento de espines AMX ($\Delta\nu/J_{H4-H3} = 14.36$, $\Delta\nu/J_{H4-H6} = 64$) (*figura 4.11*) asignándose a las señales comprendidas entre 6.73 y 7.15 ppm, según se indica en la *tabla 4.7*.

En las condiciones de registro de nuestro espectro, **H7** se observa como un multiplete (6.24-6.25 ppm), atribuible a los posibles acoplamientos con **H8** y **H9** (NH), aunque débilmente, observados en el análisis de correlación homonuclear ¹H-¹H COSY (*figura 4.12*). A partir del mismo análisis, identificamos a campo más bajo **H8**, formando parte de un multiplete por el solapamiento de resonancia con otro núcleo, asignado posteriormente como **H19**.

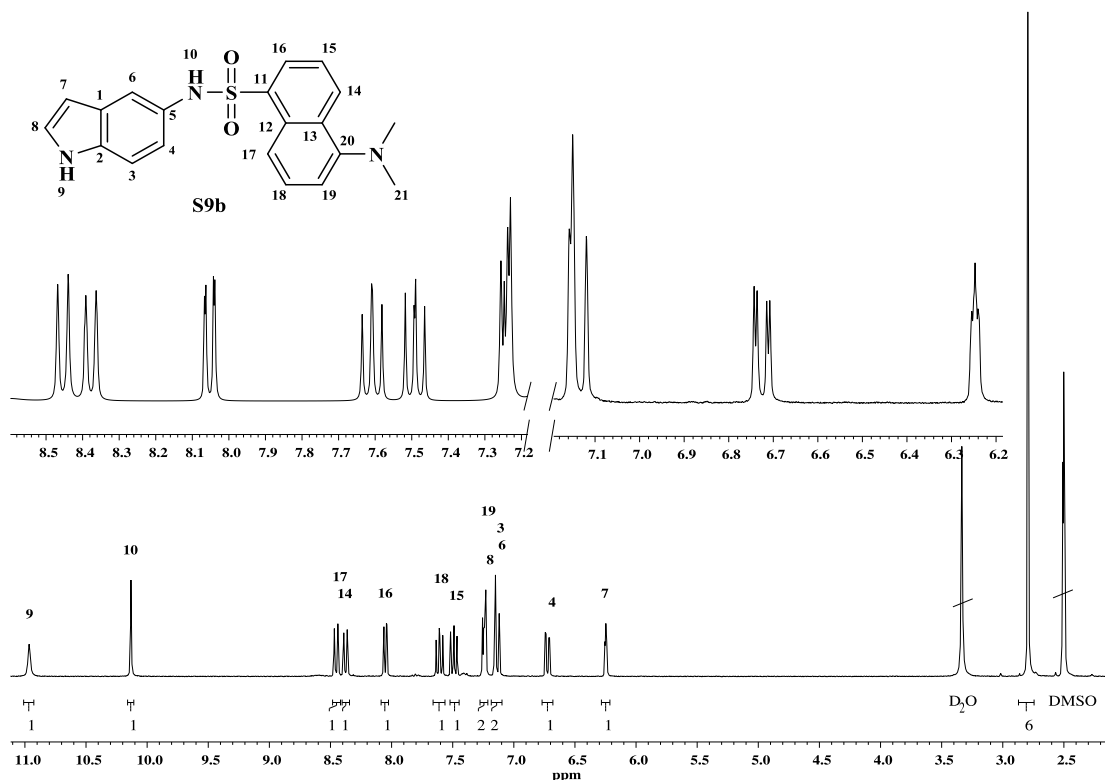


Figura 4.11. Espectro de RMN ^1H del derivado **S9b**. $\delta = 2.5\text{-}11.0$ ppm. Se indica la asignación para cada señal en función de la numeración establecida en el compuesto.

Los hidrógenos del anillo de dansilo resuenan como dos sistemas de acoplamiento de espines: AMX entre **H14**, **H15** y **H16** ($\Delta\nu/J_{\text{H15-H16}} = 17.83$; $\Delta\nu/J_{\text{H16-H17}} = 29.65$) y ABX entre **H17**, **H18** y **H19** ($\Delta\nu/J_{\text{H19-H18}} = 8.02$; $\Delta\nu/J_{\text{H19-H20}} = 44.21$). La asignación de los tres núcleos de resonancia de cada sistema de espines se realizó de acuerdo a la caracterización espectroscópica de otros derivados de dansilo.⁶

A 7.49 ppm, la señal asignada como **H15**, se observa como un doble doblete con valores de J propios de acoplamientos vecinales, $J_{\text{orto}} = 8.5$ Hz y $J_{\text{orto}} = 7.3$ Hz. Atendiéndonos al espectro ^1H - ^1H COSY (figura 4.12) para **H15** se observan dos señales de correlación con los núcleos a 8.05 ppm (**H16**) y 8.38 ppm (**H14**), los cuales se desdoblan como dos dobles dobletes, de acuerdo al sistema de acoplamiento por el cual se rigen.

A campo más bajo, 7.61 ppm, se observa un doble doblete con dos J vecinales, $J_{\text{orto}} = 8.6$ Hz y $J_{\text{orto}} = 7.6$ Hz, asignándose por tanto a **H18**. El posterior análisis de correlación en el espectro ^1H - ^1H COSY confirmó su acoplamiento con **H17** ($\delta = 8.46$ ppm) y **H19**, este último observándose como un multiplete por su solapamiento con **H8** ($\delta = 7.23\text{-}7.26$).

En la tabla 4.7. se resumen las asignaciones realizadas. La asignación de los carbonos cuaternarios se estableció en función de los valores descritos en la bibliografía.^{6, 12}

	2.49 (s)	H21
	6.24-6.25 (m)	H7
	6.73 (dd, $J = 8.6, J = 2.1$)	H4
	7.14 (d, $J = 8.6$)	H3
	7.15 (d, $J = 2$)	H6
	7.23-7.26 (m)	H8/H19
RMN ^1H	7.49 (dd, $J = 8.6, J = 7.4$)	H15
	7.61 (dd, $J = 8.6, J = 7.4$)	H18
	8.05 (dd, $J = 7.3, J = 1.1$)	H16
	8.38 (d, $J = 8.6$)	H14
	8.46 (d, $J = 8.6$)	H17
	10.13 (s, 1H, NH)	H10
	10.96 (s, 1H, NH)	H9
		45.4 (CH ₃)
RMN ^{13}C	101.3 (CH)	C7
	111.9 (CH)	C6
	113.2 (CH)	C3
	115.5 (CH)	C19
	116.7 (CH)	C4
	119.4 (CH)	C17
	123.8 (CH)	C15
	126.6 (CH)	C8
	127.9 (C)	C1
	128.2 (CH)	C18
	129.1 (C)	
	129.2 (C)	C12/C13
	129.6 (C)	C2
	129.9 (CH)	C16
	130.0 (CH)	C14
133.7 (C)	C5	
135.7 (C)	C11	
	151.7 (C)	C20

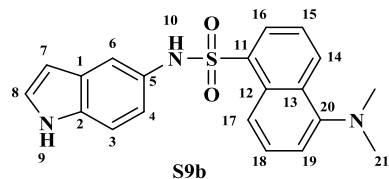


Tabla 4.7. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, J) y ^{13}C del derivado **S9b**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

Para el análisis espectroscópico de los derivados de indazol, series **S10** y **S11**, sustituidos en las posiciones 5 y 6 respectivamente, seleccionamos los derivados fluorados, **S10c** y **S11c**. Por la similitud estructural, en el mismo análisis incluimos el derivado **S13c**, derivado de benzotiazol sustituido en posición 4.

En el espectro de RMN ^1H de los compuestos **S10c**, **S11c** y **S13c** identificamos las señales características del anillo de indazol y benzotiazol, correspondientes a los hidrógenos **H3**, **H4**, **H5** y **H6**, como un sistema de acoplamiento AXY, que por su multiplicidad y valores de J registrados ($J_{orto} \sim 9$ Hz, $J_{meta} \sim 2$ Hz) se asignaron como se detalla en la *tabla 4.8*. En la misma

tabla se incluyen además los desplazamientos y multiplicidades de los carbonos del anillo bencénico.

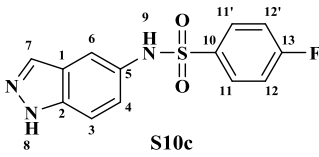
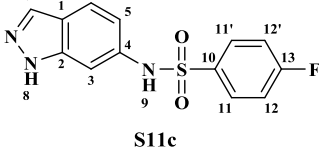
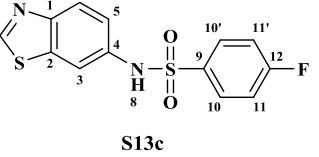
			
H3	7.42 (d, $J = 9$)	7.26 (d, $J = 1.8$)	7.88 (d, $J = 2.1$)
H4	7.06 (dd, $J = 9, J = 2$)	-	
H5	-	6.88 (dd, $J = 8.7, J = 1.8$)	7.25 (dd, $J = 8.8, J = 2.1$)
H6	7.41 (d, $J = 2$)	7.61 (d, $J = 8.7$)	7.95 (d, $J = 8.8$)
H7	7.99 (s)	7.95 (s)	9.27 (s)
H8	13.1 (s)	12.89 (s)	10.60 (s)
H9	10.0 (s)	10.44 (s)	-
H11/ H11'	7.73 (dd, $J = 8.8, J = 5.3$)	7.81 (dd, $J = 8.8, J = 5.3$)	7.84 (dd, $J = 8.8, J = 5.3$)
H12/ H12'	7.32 (t, $J = 8.8$)	7.37 (t, $J = 8.8$)	7.37 (t, $J = 8.8$)
C9	-	-	136.0 (d, $J_{C-F} = 3, C$)
C10	136.0 (d, $J_{C-F} = 3, C$)	136.0 (d, $J_{C-F} = 3, C$)	
C11/ C11'	130.0 (d, $J_{C-F} = 6, CH$)	130.0 (d, $J_{C-F} = 7.5, CH$)	130.1 (d, $J_{C-F} = 9.75, CH$)
C12/ C12'	116.5 (d, $J_{C-F} = 18, CH$)	116.8 (d, $J_{C-F} = 22.5, CH$)	116.8 (d, $J_{C-F} = 22.5, CH$)
C13	164.5 (d, $J_{C-F} = 250, C$)	164.5 (d, $J_{C-F} = 247.5$)	164.7 (d, $J_{C-F} = 255, C$)

Tabla 4.8. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, J) y ^{13}C de los derivados **S10c**, **S11c** y **S13c**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

La señal correspondiente al hidrógeno **H7**, característica para estos heterociclos, resuena a campo más bajo en los derivados indazólicos **S10c** y **S11c**, entre 7.95-7.99 ppm, en comparación con el del derivado de benzotiazol **S13c** ($\delta = 9.27$ ppm).

En la zona aromática del espectro de RMN ^1H se observan además las señales de gran intensidad correspondientes a los hidrógenos bencénicos que presentan multiplicidades y valores de J característicos por su acoplamiento con el ^{19}F en posición *para* (tabla 4.8). Estos valores son coincidentes con los descritos previamente para el derivado **S3c** ($J_{\text{H12-F}} = 8.8$, $J_{\text{H13-F}} = 5.3$). En la misma tabla, se muestran las asignaciones de los diferentes carbonos determinadas a partir de experiencias DEPT y los valores de $J_{\text{F-C}}$.

En la figura 4.14, espectro de RMN de ^1H del derivado **S10c**, se muestran las multiplicidades características de los hidrógenos bencénicos por su acoplamiento con ^{19}F y, en la figura 4.15 se muestran los dobletes registrados en el espectro de ^{13}C para el mismo derivado.

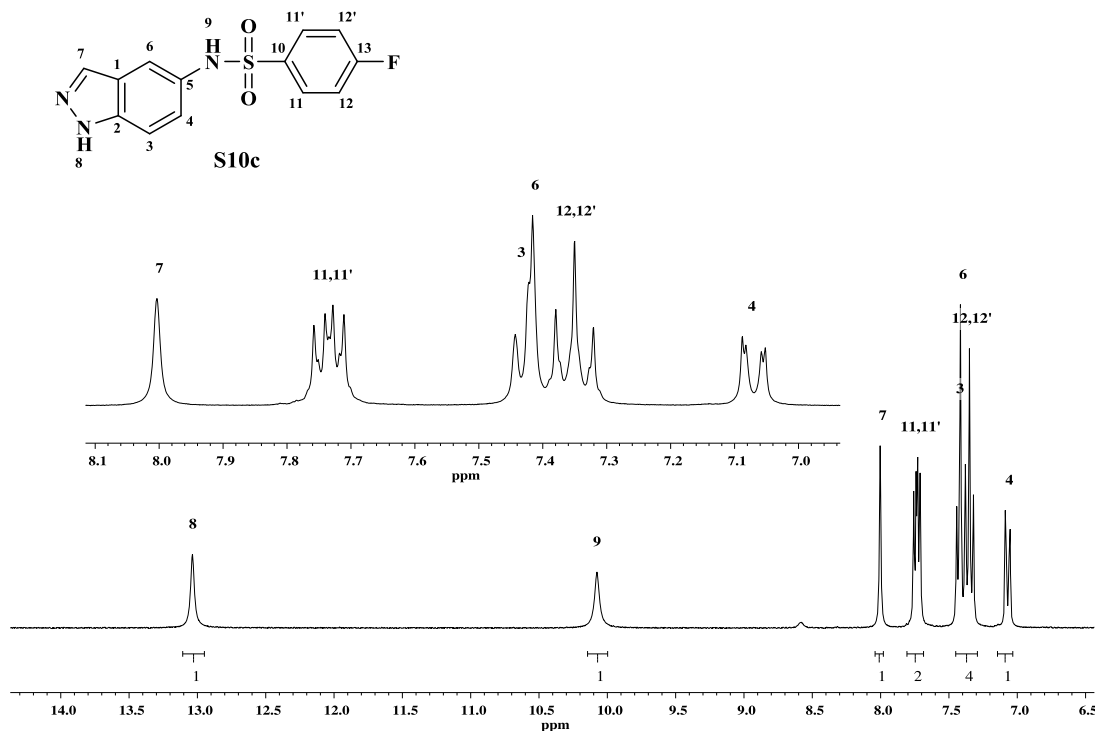


Figura 4.14. Espectro de RMN ^1H del derivado S10c. $\delta = 6.5-14.0$ ppm. Se indica la asignación para cada señal en función de la numeración establecida en el compuesto.

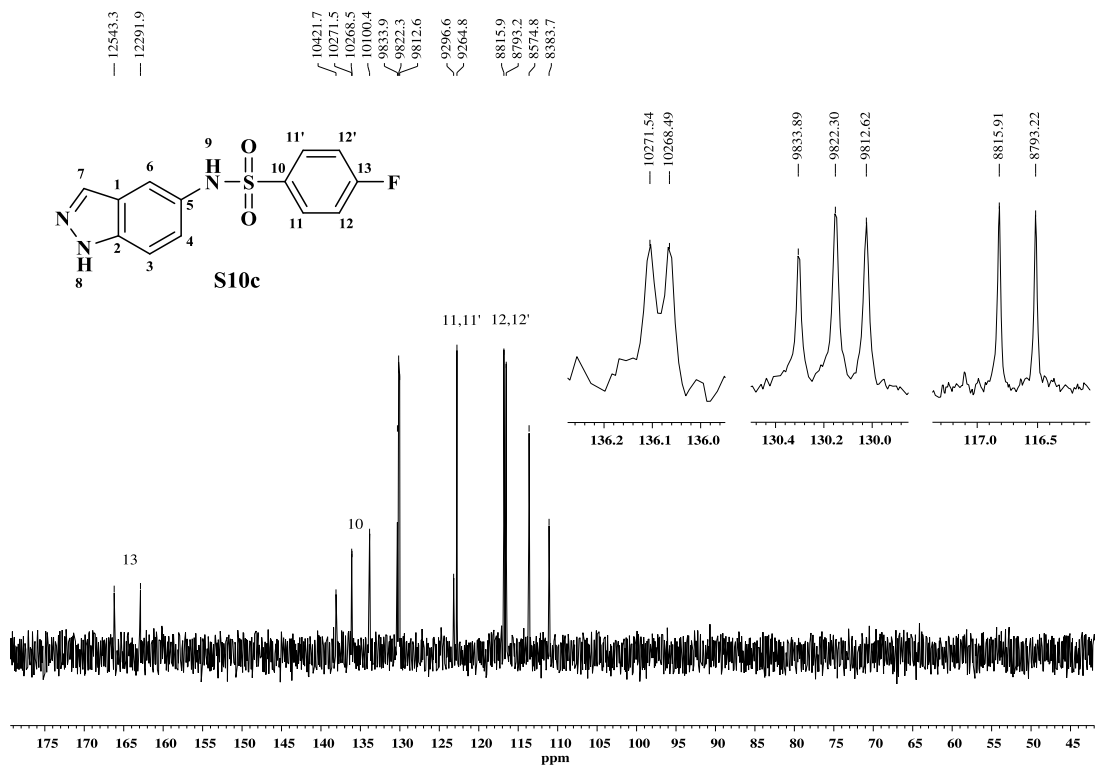
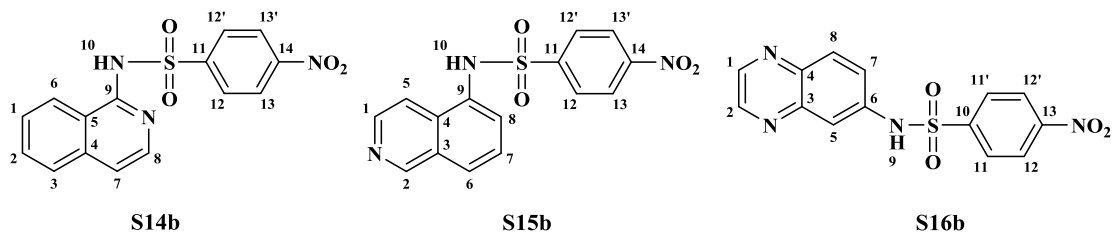


Figura 4.15. Espectro de RMN ^{13}C del derivado S10c. $\delta = 45-175$ ppm. Se indica la asignación para los carbonos C10, C11, C12 y C13.

De entre los derivados de las series **S14**, **S15** y **S16**, detallamos el análisis espectroscópico de RMN de ^1H de los nitroderivados, **S14b**, **S15b** y **S16b**.



En el espectro de RMN de ^1H de la sulfonamida **S14b**, al igual que en los respectivos derivados que completan esta serie, **S14a**, **S14c-d**, las señales observadas no permitieron realizar la asignación inequívoca debido a las multiplicidades registradas y solapamientos de las mismas.

Por el contrario, con la sustitución del grupo sulfonamido en la posición 5 del anillo isoquinolínico (serie **S15**), se pudieron registrar espectros de primer orden. Así, en el espectro de RMN ^1H del derivado **S15b**, las señales que caracterizan el núcleo isoquinolínico 5-sustituido (**H1**, **H2**, **H5**, **H6**, **H7** y **H8**) vienen definidas por dos sistemas de acoplamiento de espines que delimitan las señales de los hidrógenos del anillo bencénico *para*-sustituido (**H12/H12'** y **H13/H13'**) (tabla 4.9).

	S15b	S16b
H1	8.65 (d, $J = 6.7$)	8.81 (d, $J = 1.9$)
H2	9.76 (s)	8.85 (d, $J = 1.9$)
H5	8.62 (d, $J = 6.7$)	7.72 (d, $J = 2.4$)
H6	7.35 (dd, $J = 7.5, J = 1.2$)	-
H7	7.78 (m) ^a	7.64 (dd, $J = 9, J = 2.4$)
H8	-	8.01 (d, $J = 9$)
H9	-	8.58 (s.a, 1H, NH)
H11/H11'	-	8.11 (d, $J = 9$)
H12/H12'	8.26 (d, $J = 8.9$)	8.37 (d, $J = 9$)
H13/H13'	8.59 (d, $J = 8.9$)	-

Tabla 4.9. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, J) de los derivados **S15b** y **S16b**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios. ^a multiplete de integración para dos hidrógenos.

En el compuesto **S15b**, los núcleos de resonancia **H6**, **H7** y **H8** se registran en la zona aromática a campo alto como un sistema de espines AMN ($\Delta\nu/J = 17.2$). A campo más bajo, se observan las señales características del anillo piridínico del núcleo de isoquinolina, **H1**, **H2** y **H5**. **H1** y **H5** se observan como dos dobletes por el acoplamiento vecinal entre ambos con una J de 6.7 Hz; **H2** resuena como un singulete fuertemente desapantallado a 9.76 ppm.

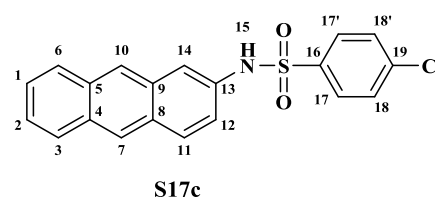
En el análisis espectroscópico de RMN de ^1H de derivados de quinoxalina, serie **S16**, al igual que en el derivado **S15a**, pueden diferenciarse dos sistemas de acoplamiento de espines característicos del heterociclo. A campo más alto, resuenan los hidrógenos **H5**, **H7** y **H8**, que por sus multiplicidades y valores de J pueden asignarse a las señales cuyo δ se corresponde con 7.64, 7.72 y 8.01 ppm, respectivamente. A campo bajo, resuenan los hidrógenos del anillo pirazínico, **H1** y **H2**, como dos dobletes con una constante de acoplamiento vecinal de menor magnitud, $J = 1.9$ Hz (tabla 4.9).

D. Caracterización estructural de las sulfonamidas derivadas de antraceno (**S17**)

De entre los cuatro derivados sintetizados de la serie **S17**, a modo de ejemplo detallaremos la elucidación estructural de la 4-clorobenzenosulfonamida **S17c**.

En una primera aproximación identificamos en el espectro de RMN ^1H (figura 4.16) las señales correspondientes a los hidrógenos **H7** y **H10**, los cuales se observan como dos singuletes fuertemente desapantallados a 8.42 y 8.47 ppm. En la zona aromática, a campo más alto, también son fácilmente discernibles los núcleos de resonancia del anillo *p*-clorobenceno, **H17/17'** (7.84 ppm) y **H18/18'** (7.61 ppm), dos dobletes de mayor intensidad propios de un sistema AB, con un valor de J alrededor de 9 Hz.

Por otra parte, se observan dos señales de fácil asignación en una aproximación de primer orden, que por sus valores de J sugieren que forman parte de un mismo sistema de espines. A 7.31 ppm se observa un doble doblete con valores de J de 2 y 9 Hz y, a 7.70 ppm se observa un doblete con un valor de J de 2 Hz, por lo que atendiéndonos a las multiplicidades esperadas para los hidrógenos pendientes de asignación, el doble doblete observado a campo más alto podría asignarse a **H12**, y por su respectivo acoplamiento a 4 enlaces con una J de 2 Hz, el doblete a campo más bajo se correspondería con **H14**.



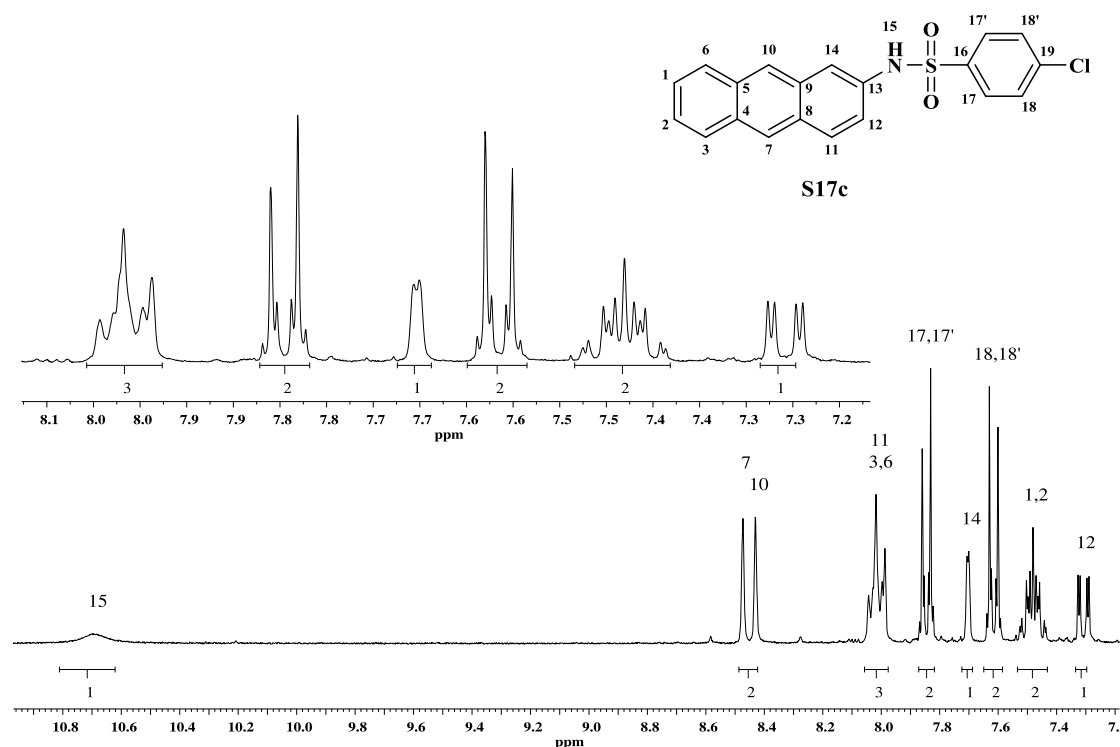


Figura 4.16. Ampliaciones del espectro de RMN ^1H del derivado **S17c**. $\delta = 7.3\text{-}11.1.0$ ppm. Se indica la asignación para cada señal en función de la numeración establecida en el compuesto.

El análisis ^1H - ^1H COSY nos permitió confirmar la correlación entre ambos hidrógenos, **H12** y **H14**, e identificar en el espectro **H11**, el tercer núcleo de resonancia que completaría el sistema de espines. Como se observa en la *figura 4.17*, **H11** forma parte del multiplete a 8.0 ppm, con una integración para 3 hidrógenos, por el solapamiento con las señales correspondientes a dos hidrógenos del sistema de espines formado por **H1**, **H2**, **H3** y **H6**. De acuerdo a los desplazamientos descritos para derivados de antraceno 2-sustituídos,¹⁴ **H3** y **H6**, resonando como dos núcleos isocronos, formarían parte de este multiplete observado a 8.0 ppm y, por su correlación en el espectro COSY, el multiplete observado a 7.47 ppm se correspondería con **H1** y **H2**, confirmándose por tanto, un sistema de espines A_2X_2 para los hidrógenos **H1**, **H2**, **H3** y **H6**.

Mediante el análisis de correlación heteronuclear HSQC (*figura 4.18*) realizamos la asignación de los carbonos. No obstante, por la proximidad y/o solapamiento de las señales correspondientes a los hidrógenos **H1-H2** y **H3-H6** no pudimos discernir con exactitud **C3** y **C6**.

En la *tabla 4.10* se resumen las asignaciones realizadas para el derivado **S17c**.

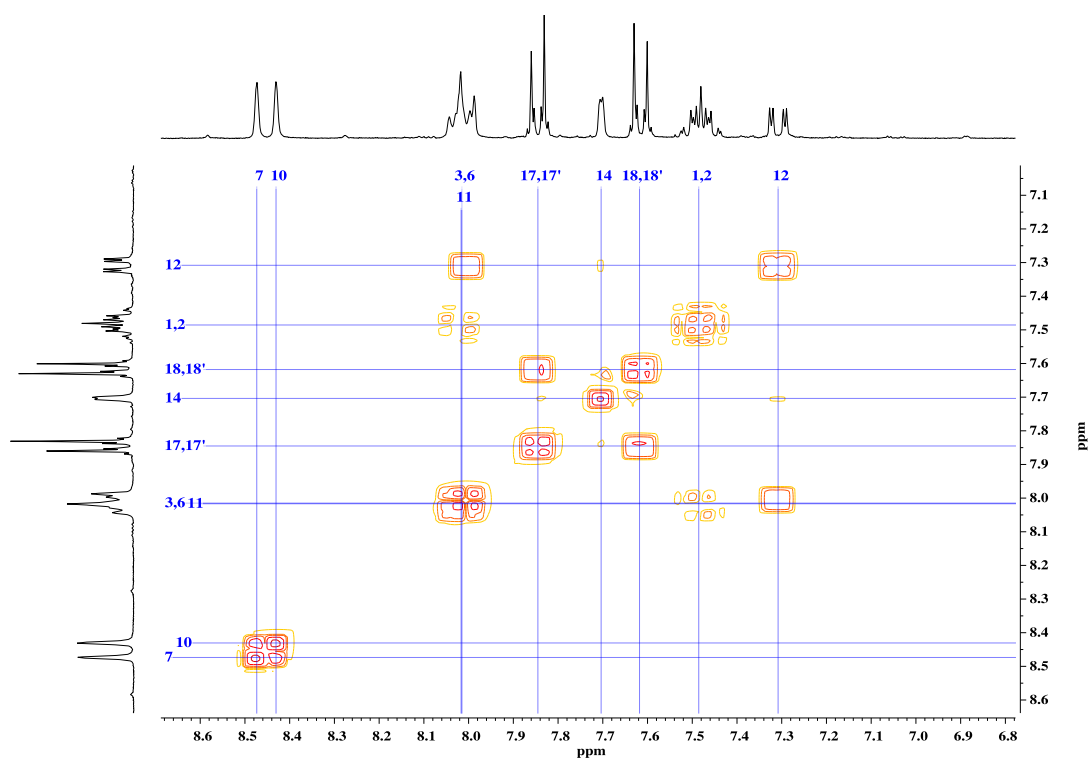


Figura 4.17. Espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY del derivado **S17c**.

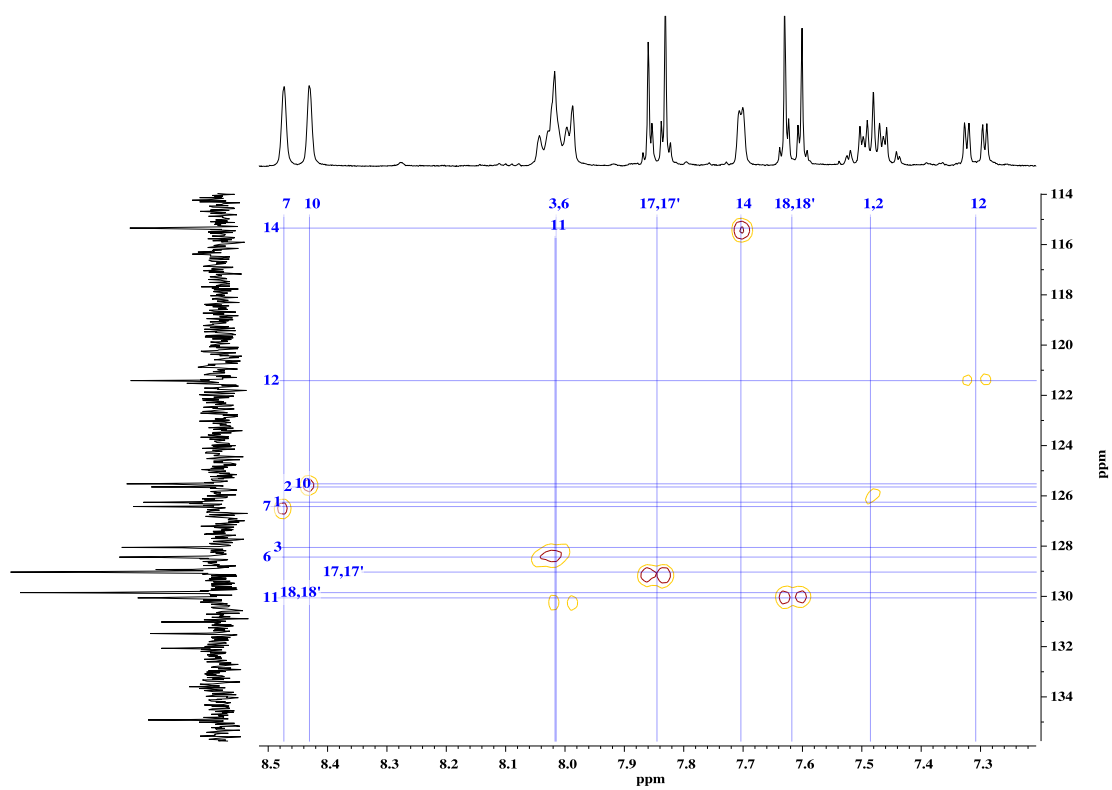


Figura 4.18. Espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC del derivado **S17c**.

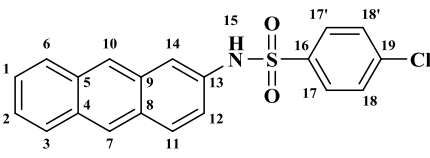
 <p style="text-align: center;">S17c</p>	RMN ¹H	7.31 (dd, $J = 9, J = 2$)	H12
		7.45-7.48 (m)	H1, H2
		7.61 (d, $J = 8.9$)	H18/H18'
		7.70 (d, $J = 2$)	H14
		7.84 (d, $J = 8.9$)	H17/H17'
		7.98-8.02 (m)	H3, H6, H11
		8.42 (s)	H10
		8.47 (s)	H7
		10.69 (s.a, 1H, NH)	H15
			RMN ¹³C
121.4 (CH)	C12		
125.5 (CH)	C10		
125.6 (CH)	C2		
126.2 (CH)	C1		
126.4 (CH)	C7		
128.0 (CH)	C6 o C3		
128.4 (CH)	C6 o C3		
128.9 (C)	-		
129.0 (2xCH)	C17/C17'		
129.9 (2xCH)	C18/C18'		
130.1 (CH)	C11		
131.0 (C)	-		
131.5 (C)	-		
132.1 (C)	-		
134.9 (C)	-		
138.3 (C)	-		
138.7 (C)	-		

Tabla 4.10. Datos espectroscópicos de RMN de ¹H (δ , m, J) y ¹³C del derivado **S17c**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

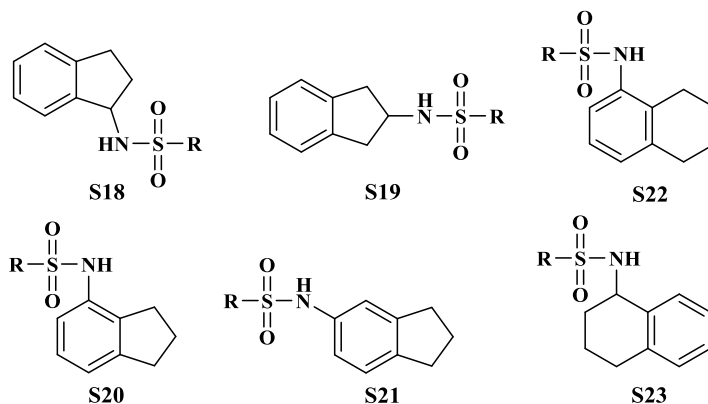
E. Caracterización estructural de las sulfonamidas con anillos carbocíclicos saturados benzofusionados (S18-S23)

En el análisis espectroscópico identificamos los núcleos de resonancia del anillo de indano (series **S18**, **S19**, **S20** y **S21**) y del anillo de tetralina (series **S22** y **S23**).

La principal característica de este tipo de anillos es la resonancia de los hidrógenos metilénicos y metínicos, con la formación de un estereocentro, como núcleos diastereotópicos. Debido a lo cual, en su mayoría, se observan con multiplicidades complejas por sus acoplamientos geminales (J_{gem}), axiales (J_{ax}) y ecuatoriales (J_{eq}) y, por tanto, son asignados como multipletes.

La posición del grupo sulfonamido en los anillos va a determinar estas multiplicidades características de los hidrógenos metilénicos y metínicos permitiéndonos diferenciar los derivados de indano sustituidos en las posiciones 1 y 2 (series **S18** y **19**) de los sustituidos en las

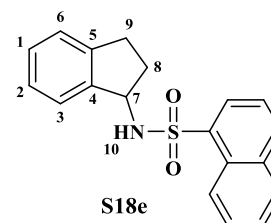
posiciones 4 (**S20**) y 5 (**S21**), así como, entre los derivados de tetralina sustituidos en las posiciones 1 (**S22**) y 5 (**S23**).



Como en los análisis anteriores describimos su caracterización a partir de un derivado de cada serie: **S18e**, **S19f**, **S20c**, **S21c**, **S22e** y **S23e**.

La sulfonamida **S18e** se caracterizó como la *N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il)naftalenosulfonamida.

Como se observa en la zona alifática de su espectro de RMN de ^1H , los hidrógenos metilénicos (**H8** y **H9**) y metínico (**H7**) resuenan como hidrógenos diastereotópicos. La sustitución del anillo de indano en la posición 1 por el grupo sulfonamido da lugar a un estereocentro, por lo que los hidrógenos del mismo, no siendo magnéticamente equivalentes, se observan como cinco señales diferenciadas con multiplicidades complejas (figura 4.19).



A partir de los δ , multiplicidades y valores de J previamente descritos para anillos de indano sustituidos en la misma posición,¹⁵ analizamos las señales del espectro registrado para el derivado **S18e**, estableciéndose la asignación correspondiente y los valores de J calculados que justifican los desdoblamientos de las señales en el número de picos observados.

- Hidrógenos de las posición C9: Los hidrógenos de la posición C9 resuenan a 2.59 y 2.74 ppm, asignándose de manera arbitraria como **H9a** y **H9b** respectivamente. Estos presentan un patrón de acoplamiento AB, por lo que los multipletes aparecen distorsionados con un aumento progresivo de la intensidad de las señales hacia el centro de ambos multipletes. **H9b** se observa como un doblete de dobletes debido a su acoplamiento geminal con **H9a** ($J_{gem} = 15.7$ Hz) y dos acoplamientos vecinales de diferente magnitud con los hidrógenos de la posición C8, registrándose una J de 8.7 Hz en su acoplamiento con **H8a** y de 3.2 Hz con **H8b**. **H9a**, sin embargo, se desdobra en cinco picos. Esta multiplicidad tan sólo puede explicarse por su acoplamiento geminal con **H9b** y su acoplamiento vecinal con los hidrógenos de la posición C8 con un mismo valor de J , en nuestro compuesto, de 7.8 Hz.

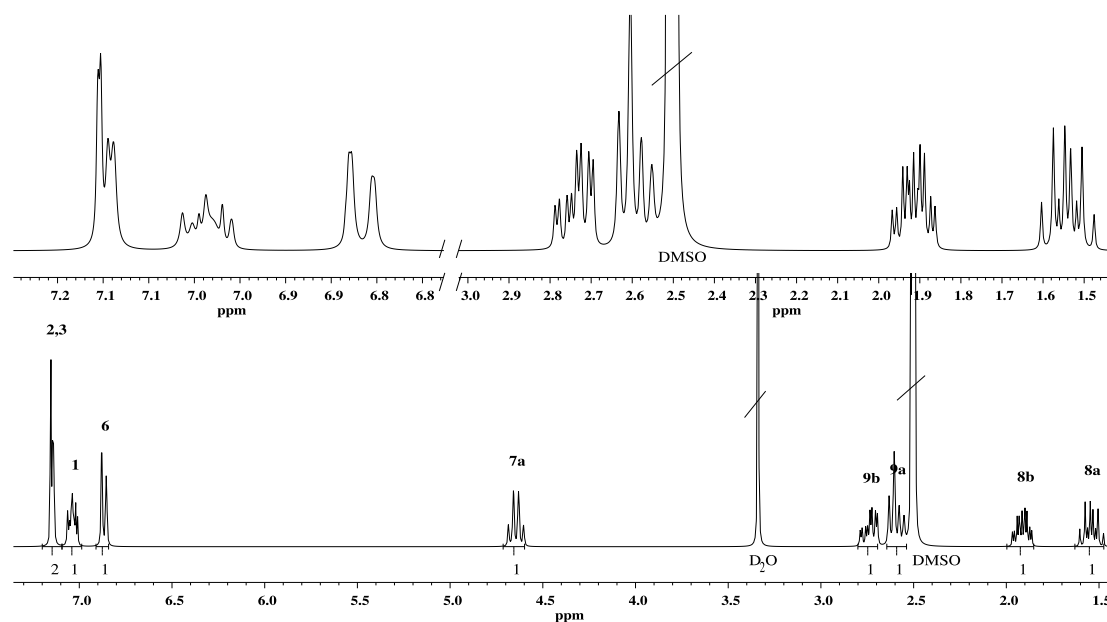


Figura 4.19. Ampliación del espectro de RMN ^1H del derivado **S18e**. $\delta = 1.5\text{-}7.0$ ppm. Se muestra la ampliación de las señales de los hidrógenos metilénicos, comprendidas entre 1.5-3.0 ppm.

- Hidrógenos de la posición C8: **H8a** y **H8b** resuenan a campo más alto, a 1.54 y 1.92 ppm. En este caso forman un sistema de acoplamiento AX, por lo que los multipletes se observan simétricos respecto a la mitad del eje vertical de la mitad del multiplete. No obstante, presentan una multiplicidad más compleja debido a sus acoplamientos vecinales con los hidrógenos de la posición C9 y el hidrógeno de la posición C7. Los diferentes valores de J calculados que justificarían el desdoblamiento de estas señales en multipletes de 8 y 11 picos, se muestran en la *figura 4.20*.
- Hidrógeno de la posición C7: **H7** se observa a campo más bajo por el efecto inductivo del nitrógeno ($\delta = 4.66$ ppm) como un cuadruplete, cuya multiplicidad puede ser debida a su acoplamiento vecinal con **H8a**, **H8b** y el hidrógeno del NH del grupo sulfonamido (**H10**) con un valor de J similar ($J = 8.1$ Hz).

El análisis COSY nos permitió confirmar los acoplamientos anteriormente descritos (*figura 4.21*). Como puede observarse, las líneas de correlación para los hidrógenos de la posición C8 muestran su acoplamiento con los hidrógenos de las posiciones C9 y C7, confirmando su asignación como núcleos de resonancia a campo alto. Por otro lado, puede observarse el acoplamiento de **H7** con **H10**, el cual resuena como un doblete con una misma J , así como el sistema de espines de los hidrógenos del anillo bencénico (**H1**, **H2**, **H3** y **H6**) entre 6.87 y 7.14 ppm.

En la tabla 4.11 se resumen los datos espectroscópicos de estos hidrógenos y sus respectivos carbonos.

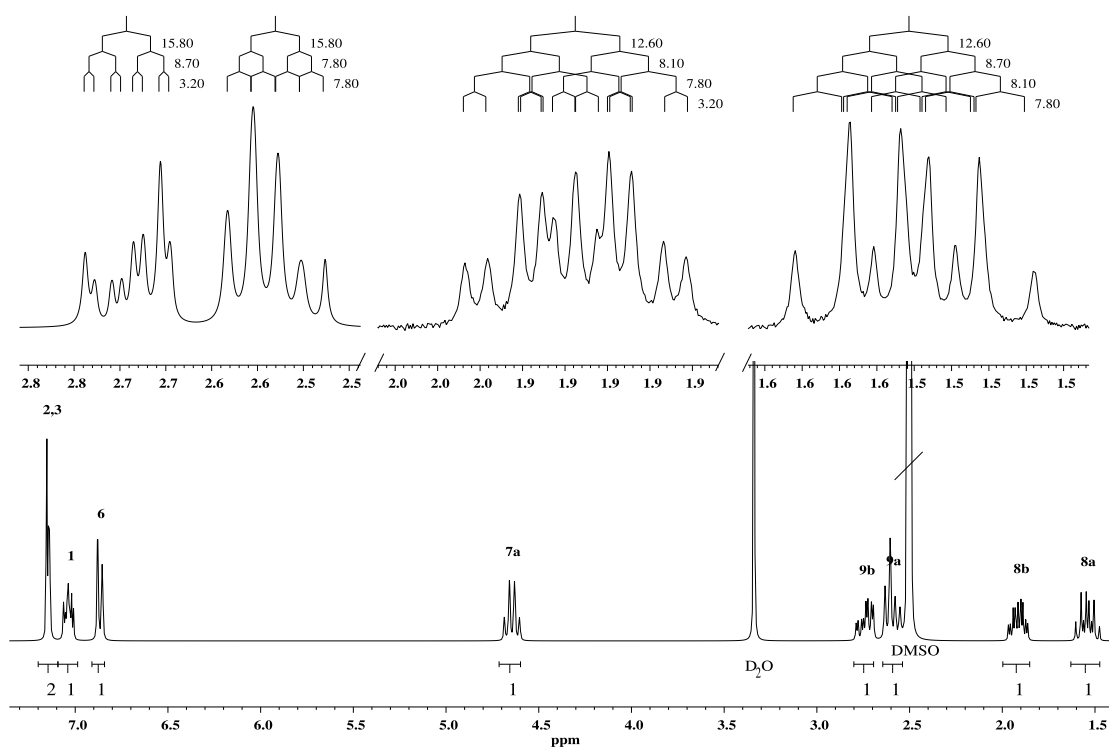


Figura 4.20. Ampliación del espectro de RMN ^1H y diagramas de acoplamiento de los hidrógenos metilénicos del derivado S18e.

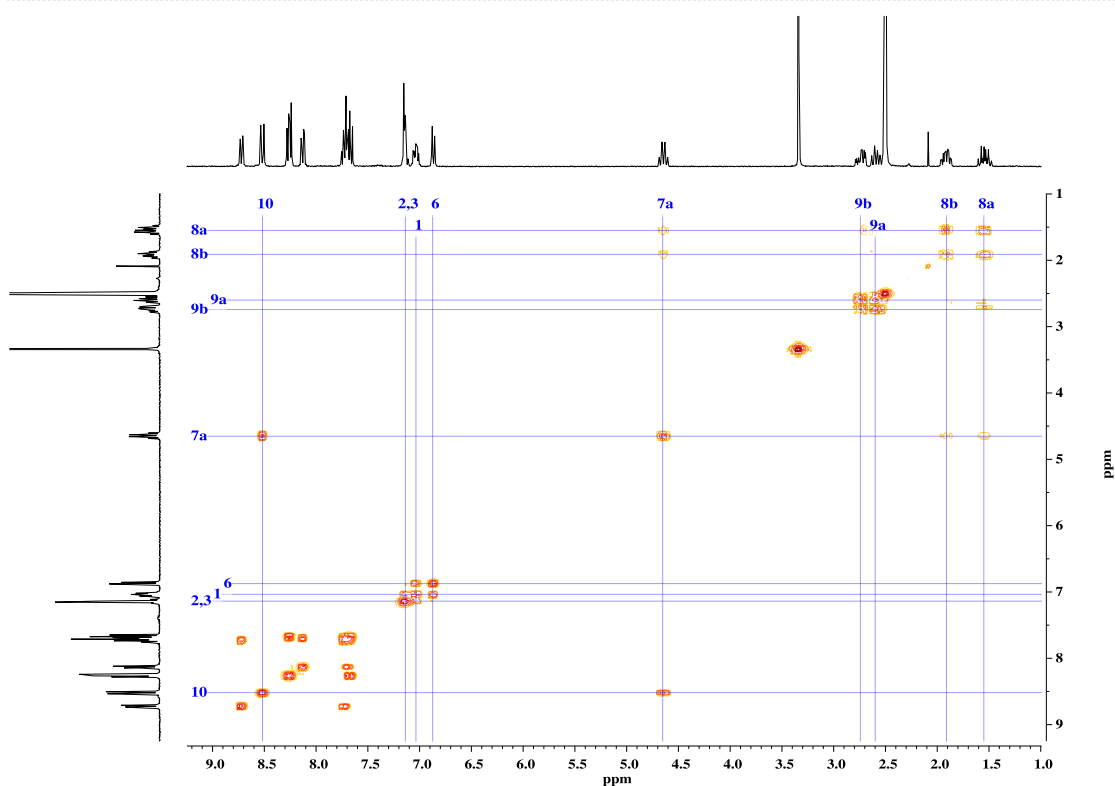


Figura 4.21. Espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY del derivado S18e.

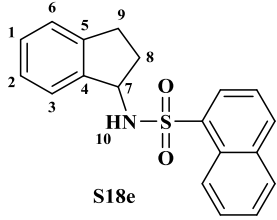
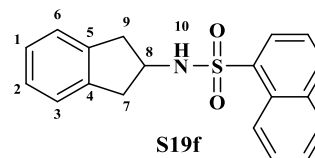
 <p>S18e</p>	RMN ¹H	1.54	$J_{H8a-H8b} = 12.6 \text{ Hz}$ $J_{H8a-H9a} = 7.8 \text{ Hz}$ $J_{H8a-H9b} = 8.7 \text{ Hz}$ $J_{H8a-H7} = 8.1 \text{ Hz}$	H8a H8b
		1.92	$J_{H8b-H8a} = 12.6 \text{ Hz}$ $J_{H8b-H9a} = 7.8 \text{ Hz}$ $J_{H8b-H9b} = 3.2 \text{ Hz}$ $J_{H8b-H7} = 8.1 \text{ Hz}$	
		2.59	$J_{H9b-H9a} = 15.8 \text{ Hz}$ $J_{H9b-H8a} = 8.7 \text{ Hz}$ $J_{H9b-H8b} = 3.2 \text{ Hz}$	H9b H9a
		2.74	$J_{H9a-H9b} = 15.8 \text{ Hz}$ $J_{H9a-H8a} = 7.8 \text{ Hz}$ $J_{H9a-H8b} = 7.8 \text{ Hz}$	
		4.66	$J_{H7-H8a} = 8.1 \text{ Hz}$ $J_{H7-H8b} = 8.1 \text{ Hz}$ $J_{H7-H10} = 8.1 \text{ Hz}$	H7
RMN ¹³C	29.7 (CH ₂)	C8		
	33.8 (CH ₂)	C9		
	58.2 (CH)	C7		

Tabla 4.11. Datos espectroscópicos de RMN de ¹H (δ , m, J) y ¹³C de los hidrógenos metilénicos y metínico del derivado **S18e**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

Los derivados de la serie **S19**, con la sustitución por el grupo sulfonamido en la posición 2 del anillo de indano, los hidrógenos metilénicos de las posiciones **C7** y **C9** resuenan de acuerdo a la simetría del anillo.

En la zona alifática del espectro de RMN de ¹H de la sulfonamida **S19f**, caracterizada como la *N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)naftalenosulfonamida, se observan dos dobles dobletes a 2.65 y 2.83 ppm, cuya integración corresponde a dos hidrógenos. Estos presentan valores de J propios de acoplamientos geminales ($J_{\text{gem}} = 15.8 \text{ Hz}$) y vecinales ($J = 7.3 \text{ Hz}$) en este tipo de anillos.



Debido a la simetría del compuesto, cada doblete integra para dos hidrógenos. **H7a** y **H9a**, resuenan como núcleos isocronos como un doblete por su acoplamiento geminal con **H7b** y **H9b** y, su acoplamiento vecinal con el hidrógeno metínico (**H8**); correspondiéndose el segundo doblete, a 2.83 ppm, a los hidrógenos **H7b** y **H9b** (figura 4.22).

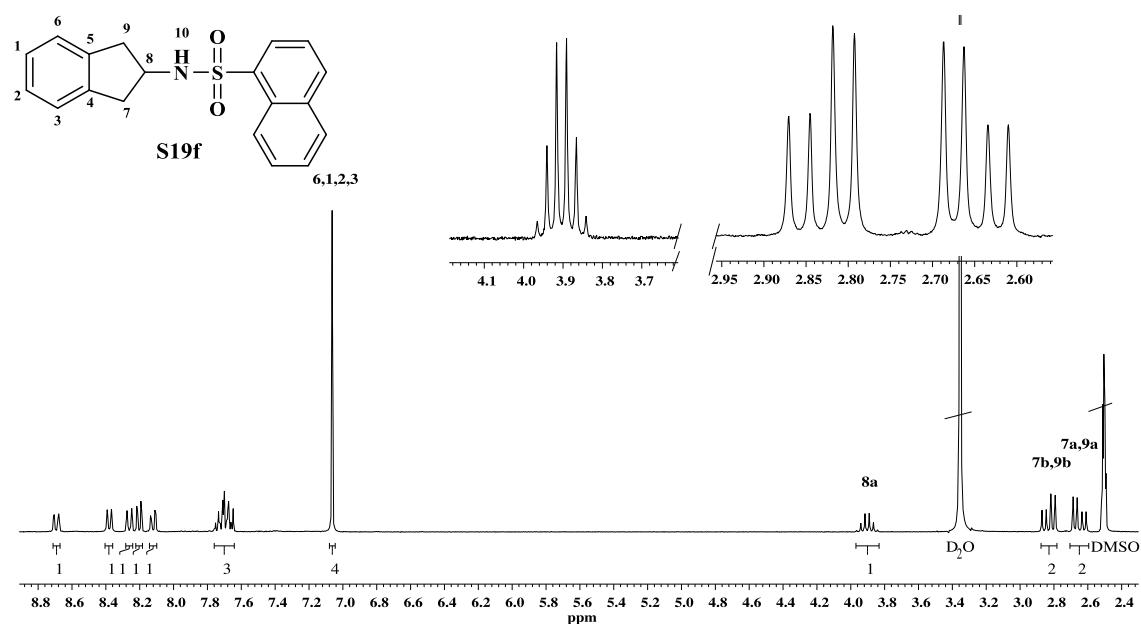
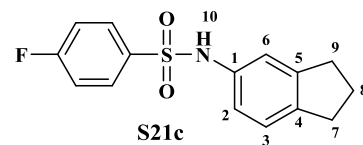
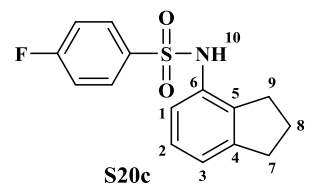


Figura 4.22. Ampliación del espectro de RMN ^1H del derivado **S19f**. $\delta = 2.4\text{-}9.0$ ppm. Se muestra la ampliación de las señales de los hidrógenos **H7**, **H8** y **H9**.

A campo más bajo, a 3.91 ppm, resuena **H8** como un sextuplete por su acoplamiento con los hidrógenos de las posiciones **C7**, **C9** y el hidrógeno del NH, **H10**.

Los derivados de las series **S20** y **S21** presentan el sustituyente sulfonamido en las posiciones 4 y 5 del anillo de indano, respectivamente.

En la zona alifática del espectro de RMN ^1H del derivado **S20c**, caracterizado como la *N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il)-4-fluorobenzenosulfonamida, las señales de los hidrógenos metilénicos se observan a 2.52 y 2.72 ppm como dos tripletes con una *J* vecinal de 7.5 Hz, cuya integración para dos hidrógenos determina a los núcleos de resonancia de las posiciones **H7** y **H9**. De acuerdo a este acoplamiento, se asigna **H8** al quintuplete, observado a campo más alto, con una misma *J*.



Estos valores de δ y multiplicidades registradas para los hidrógenos metilénicos del derivado **S20c** coinciden con las observadas en la sulfonamida **S21c** *N*-(2,3-dihidro-1*H*-inden-5-il)-4-fluorobenzenosulfonamida. No obstante, en el espectro registrado para este último, **H7** y **H9** resuenan como núcleos isocronos, cuyo solapamiento provoca una distorsión de los tripletes esperados, asignándose como un multiplete de integración para 4 hidrógenos a 2.73 ppm (figura 4.23).

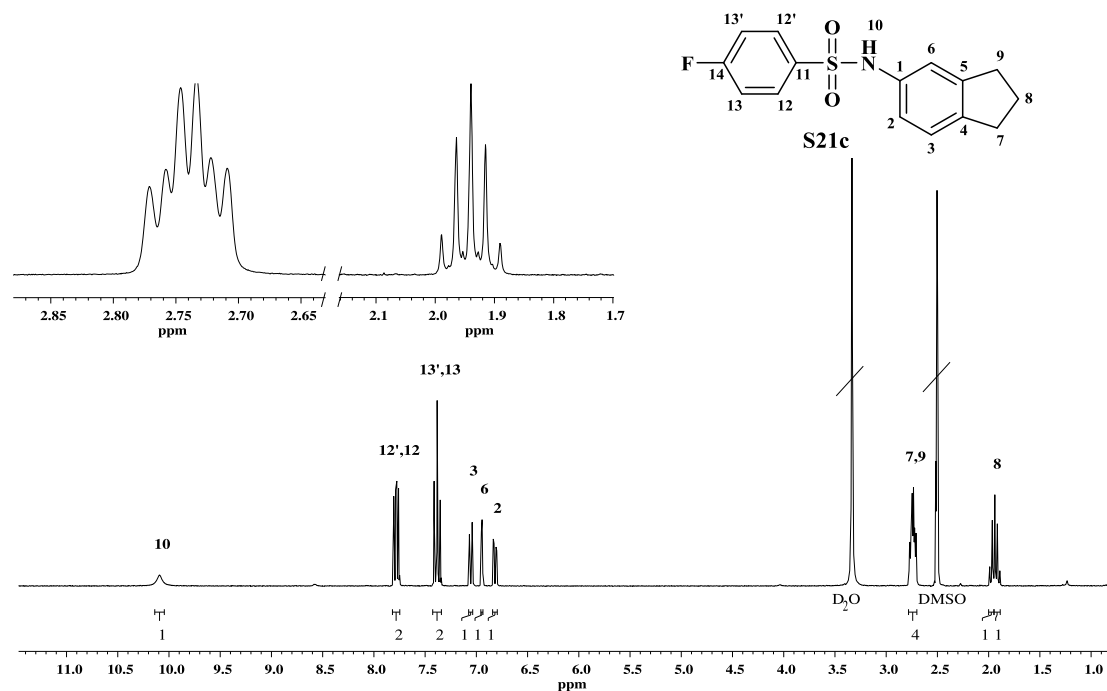
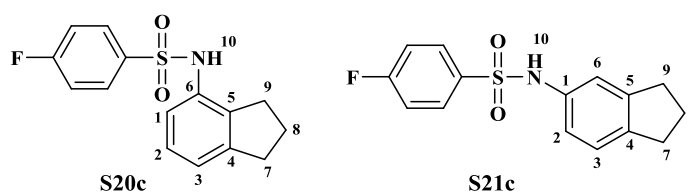


Figura 4.23. Espectro de RMN ^1H del derivado **S21c**. $\delta = 1.0\text{-}11.0$ ppm. Se muestra la ampliación de las señales de los hidrógenos **H7**, **H8** y **H9**.

En ambos derivados también son fácilmente discernibles las señales correspondientes al anillo benzénico del sistema benzofusionado, **H2**, **H3** y **H1** o **H6**, según se trate de **S20c** o **S21c**. En la *tabla 4.12*, se muestran las asignaciones para los sistemas de espines de estos hidrógenos, así como la asignación de todos los carbonos del anillo de indano realizada tras su análisis de correlación HSQC (*figura 4.24*).



H1		-
H2	7.02 (m) ^a	6.82 (dd, $J = 8, J = 2$)
H3	6.82 (dd, $J = 8, J = 2$)	7.03 (d, $J = 8$)
H6	-	6.94 (d, $J = 2$)
H7	2.77 (t, $J = 7.5$)	2.73 (m) ^b
H8	1.80 (q, $J = 7.5$)	1.93 (q, $J = 7$)
H9	2.52 (t, $J = 7.5$)	2.73 (m) ^b
H10	9.71 (s.a, NH)	10.13 (s.a, NH)
C1	122.6	135.8
C2	127.2	117.4
C3	122.4	125.0
C4	145.7	140.3
C5	133.0	145.1
C6	139.2	119.2
C7	33.0	32.6
C8	24.9	25.4
C9	30.5	32.0

Tabla 4.12. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, J) y ^{13}C de los derivados **S20c** y **S21c**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.^aMultiplete de integración para dos hidrógenos. ^bMultiplete de integración para cuatro hidrógenos. Se omiten los protones **H12/H12'** y **H13/H13'**.

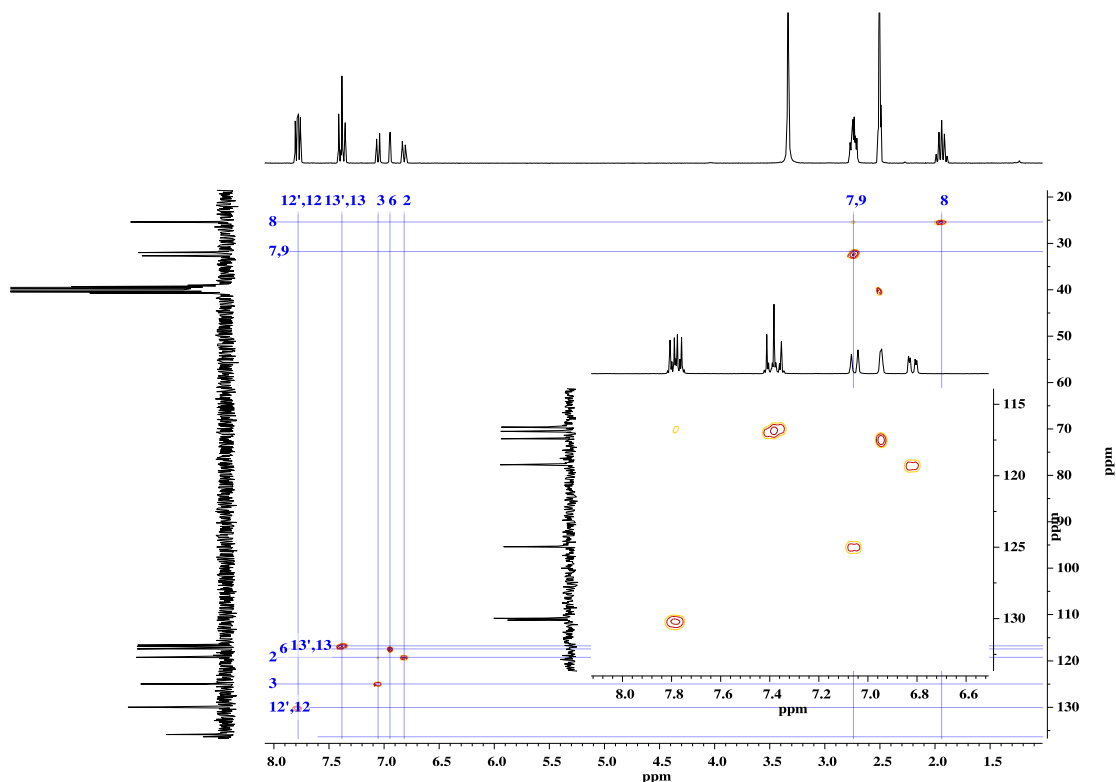
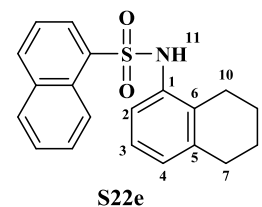


Figura 4.24. Espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC del derivado **S21c**

Análogamente a los derivados de indano, realizamos la caracterización estructural de los derivados de tetralina (**S22** y **S23**) a partir de la resonancia de sus hidrógenos metilénicos.

En el derivado **S22e**, caracterizado como la *N*-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-il)naftalenosulfonamida, los hidrógenos metilénicos, de las posiciones numeradas en nuestro análisis como 7, 8, 9 y 10, se observan a 1.34, 1.47, 2.34 y 3.38 ppm. A campo más alto, resuenan **H8** y **H9** con un patrón de acoplamiento AB, observándose como dos multipletes a 1.34 y 1.47 ppm. **H7** y **H10** se observan a 2.34 y 3.38 ppm, respectivamente, como un triplete por su acoplamiento vecinal con **H8** y **H9** ($^3J = 6.2$ Hz).



En la *tabla 4.13* se muestran los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y RMN de ^{13}C , así como las asignaciones realizadas. En la *figura 4.25* puede observarse el espectro de correlación COSY a partir del cual se han realizado las diferentes asignaciones de los hidrógenos del anillo de naftaleno.

RMN ^1H		1.33-1.37 (m)	H9
		1.46-1.48 (m)	H8
		2.34 (t, $J = 6.2$)	H10
		3.38 (t, $J = 6.2$)	H7
		6.63 (dd, $J = 7.5, J = 2$)	H2
		6.84 (dd, $J = 7.5, J = 2$)	H4
		6.89 (t, $J = 7.5$)	H3
		7.57 (dd, $J = 8.2, J = 7.4$)	H20
		7.61-7.69 (m)	H16, H19
		8.03 (dd, $J = 7.4, J = 1.3$)	H18
		8.05-8.10 (m)	H17
		8.22 (d, $J = 8.3$)	H21
		8.65-8.69 (m)	H15
		9.75 (s.a, 1H, NH)	H11
RMN ^{13}C		22.4 (CH ₂)	C9
		22.5 (CH ₂)	C8
		24.6 (CH ₂)	C10
		29.3 (CH ₂)	C7
		123.7 (CH)	C2
		124.9 (CH)	C20
		125.1 (CH)	C15
		125.6 (CH)	C3
		127.2 (CH)	C19
		127.6 (CH)	C4
		128.0 (CH)	C16
	129.2 (CH)	C17/C18	
	129.3 (CH)		
	134.4 (CH)	C21	

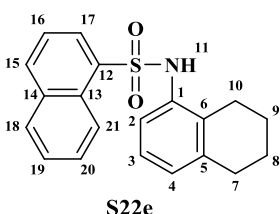


Tabla 4.13. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H (δ , m, J) y ^{13}C del derivado **S22e**. Los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios.

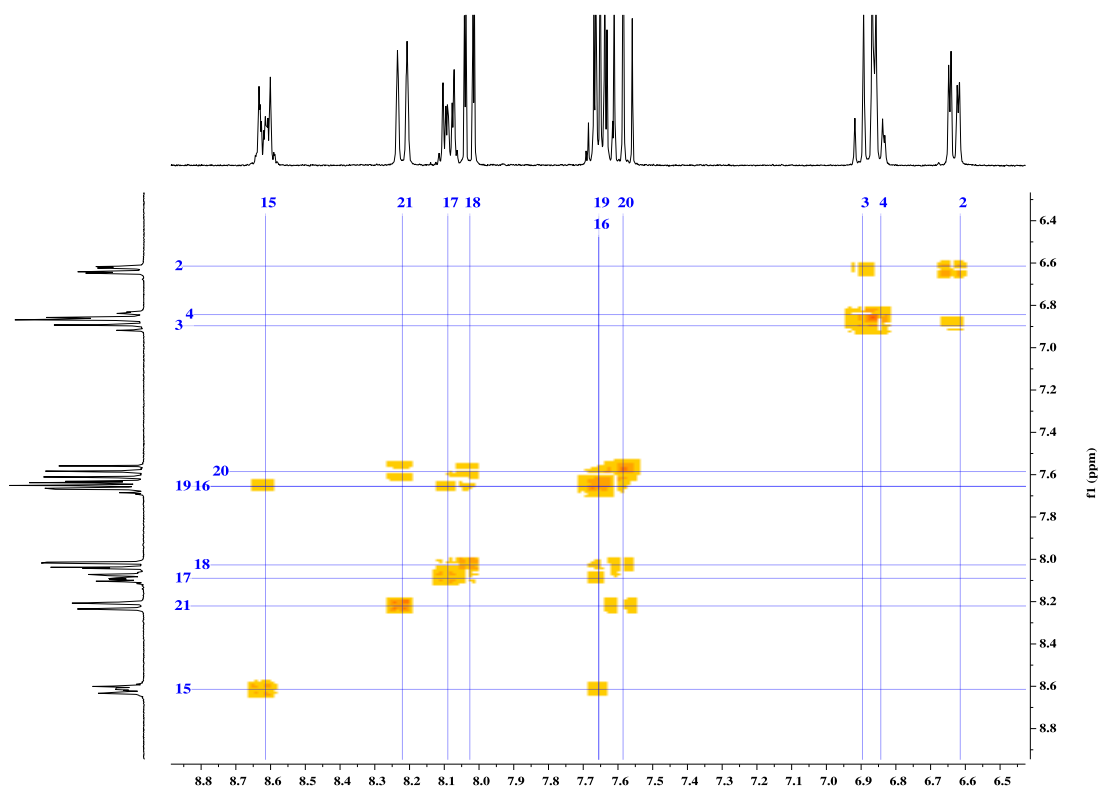
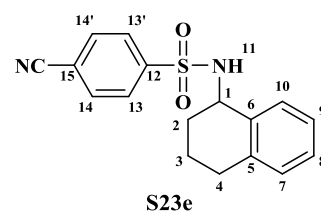


Figura 4.25. Espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY del derivado **S22e**.

En el espectro de RMN ^1H del derivado **S23e**, caracterizado como 4-ciano-*N*-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)bencenosulfonamida, los hidrógenos metilénicos resuenan como núcleos diastereotópicos, cuya complejidad en sus multiplicidades no permite una aproximación de los sistemas de acoplamiento, asignándose por tanto, como multipletes (*figura 4.26*).



Al igual que en el derivado **S22e**, identificamos las señales correspondientes a cada uno de los hidrógenos mediante los análisis de correlación COSY y HSQC (*figura 4.27 y 4.28*).

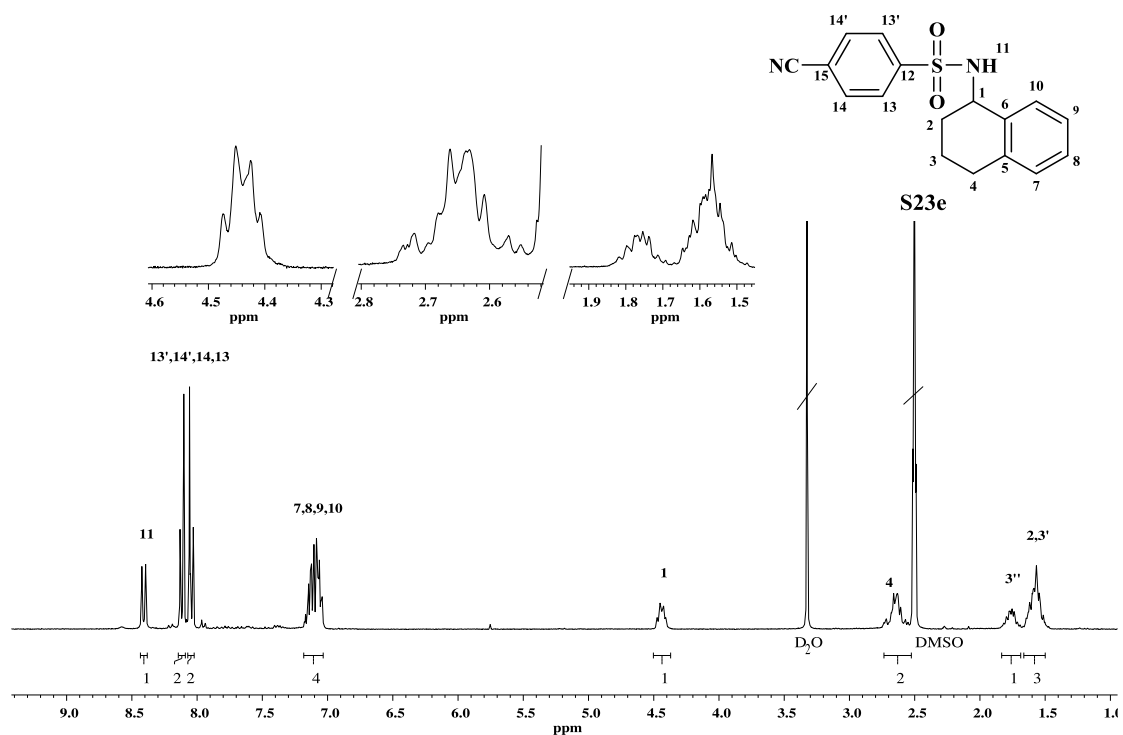


Figura 4.26. Ampliaciones del espectro de RMN ^1H del derivado **S23e**. $\delta = 1.0-10.0$ ppm.

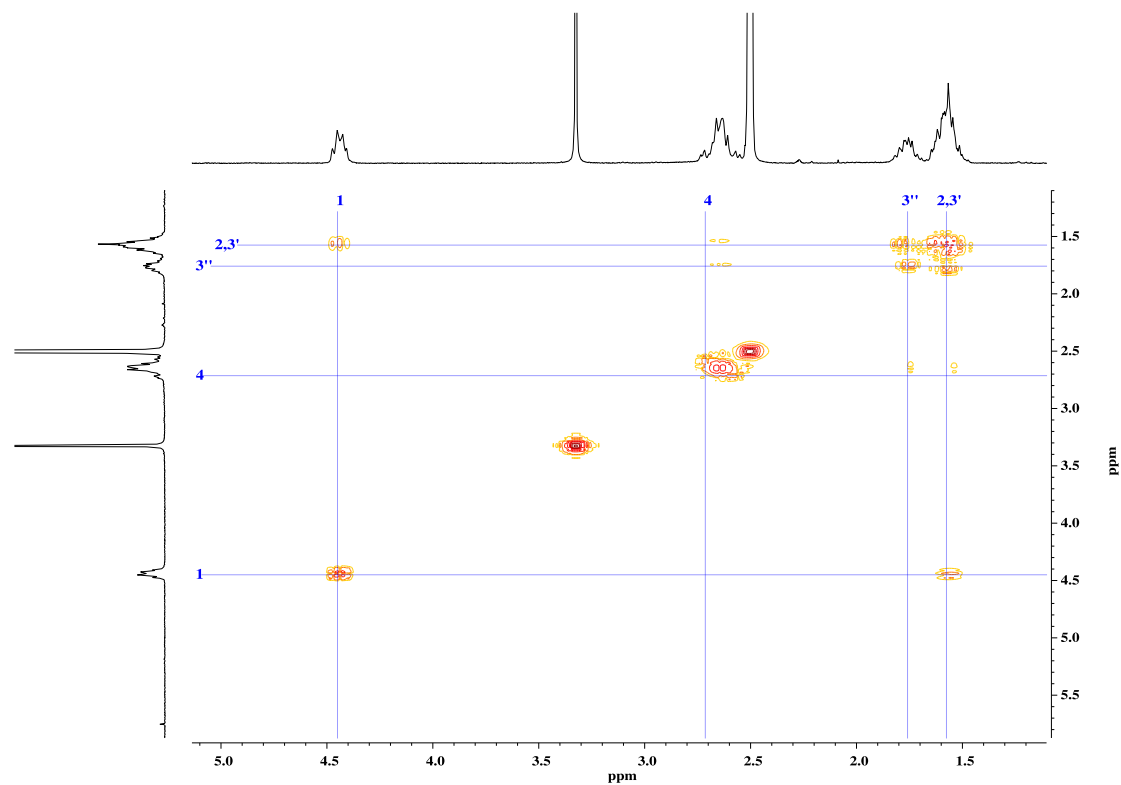


Figura 4.27. Espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY del derivado **S23e**.

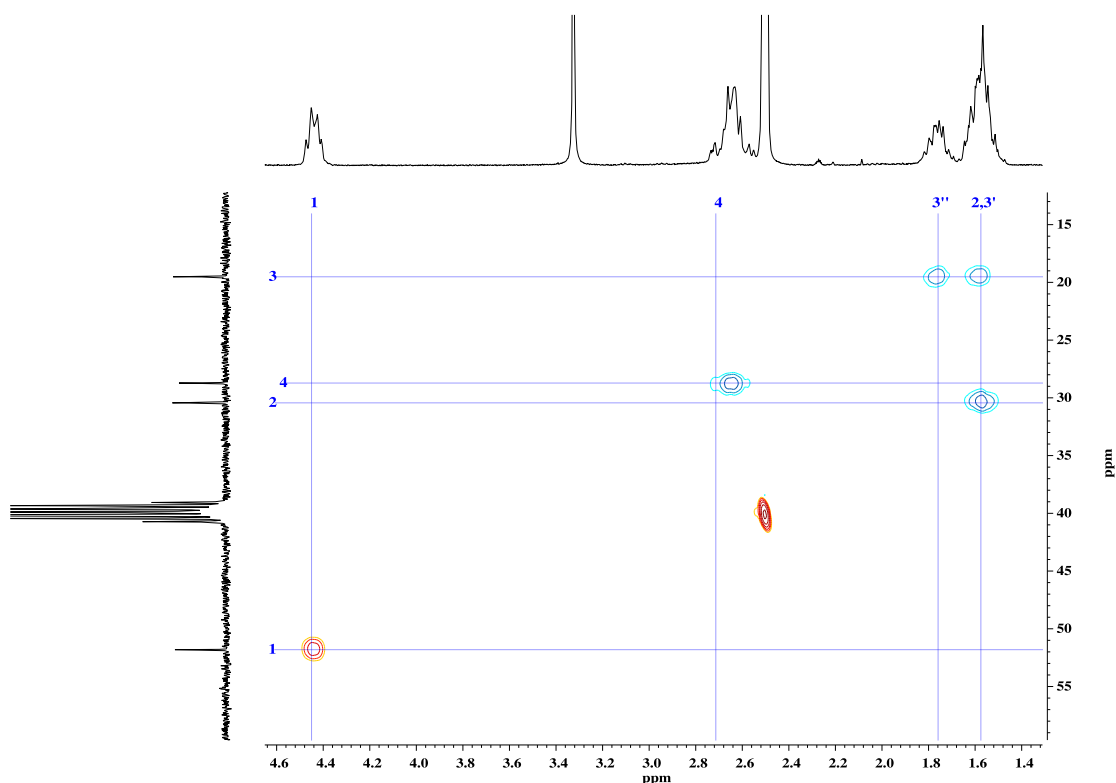


Figura 4.28. Espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC del derivado **S23e**.

F. Caracterización estructural de las sulfonamidas heterocíclicas hexagonales (**S24** y **S25**)

Los datos espectroscópicos registrados para los derivados de la serie **S24**, derivados de piperazina, permiten fácilmente su identificación. Debido a la simetría del anillo, los hidrógenos metilénicos resuenan como núcleos isocronos, observándose en el espectro de RMN de ^1H dos tripletes de integración para cuatro hidrógenos cada uno (*anexo 4*).

Los derivados de la serie **S25**, derivados 3-metilpiperidina, presentan espectros de RMN ^1H de elevada complejidad por los acoplamiento ecuatoriales y axiales de los hidrógenos metilénicos y metínico.

Se ha descrito que los hidrógenos más desapantallados del anillo piperidínico se corresponden con los hidrógenos α en ecuatorial, mientras que los hidrógenos axiales de la misma posición resuenan a campo más alto, registrándose, en función de la naturaleza y orientación de sus sustituyentes, constantes de acoplamiento de diferente magnitud.¹⁶

En nuestro estudio de caracterización, a partir de los datos espectroscópicos del derivado **S25c**, realizamos una aproximación en la asignación de las señales observadas con el análisis simultáneo del espectro de RMN de ^1H (*figura 4.29*) y los espectros de correlación de RMN 2D (*figura 4.30* y *figura 4.31*).

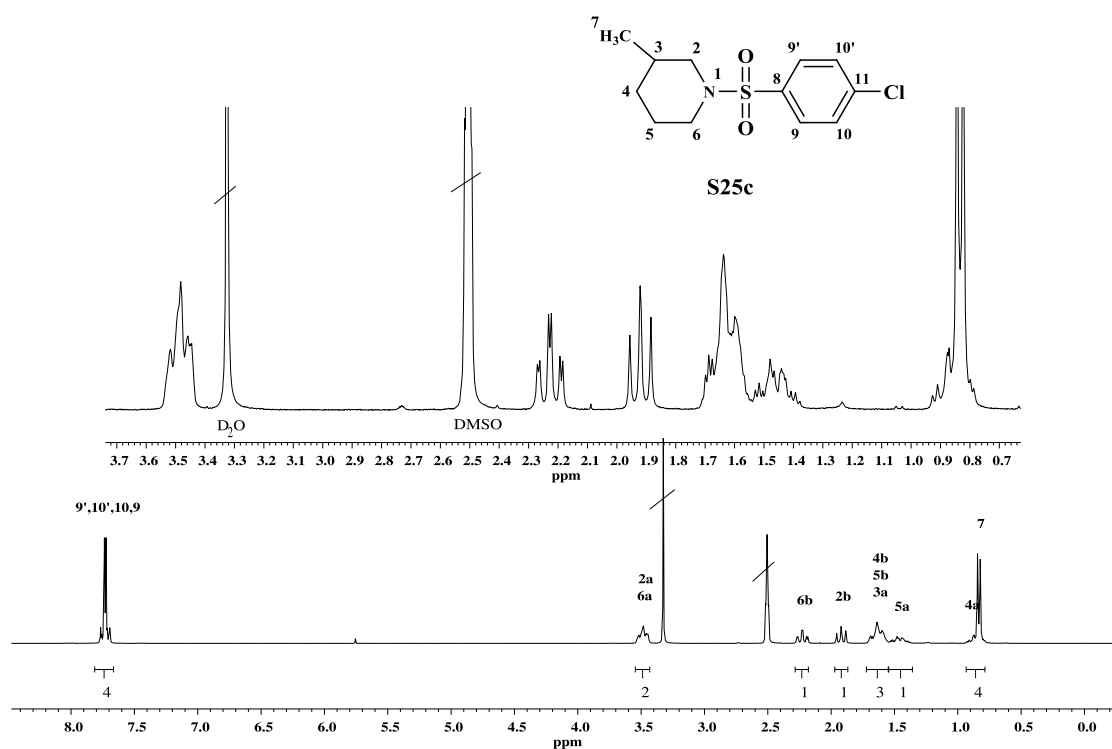


Figura 4.29. Espectro de RMN ^1H del derivado **S25c**. $\delta = 0.0\text{-}8.0$ ppm. Se muestra la ampliación de las señales de los hidrógenos metilénicos y metínico del anillo de piperidina.

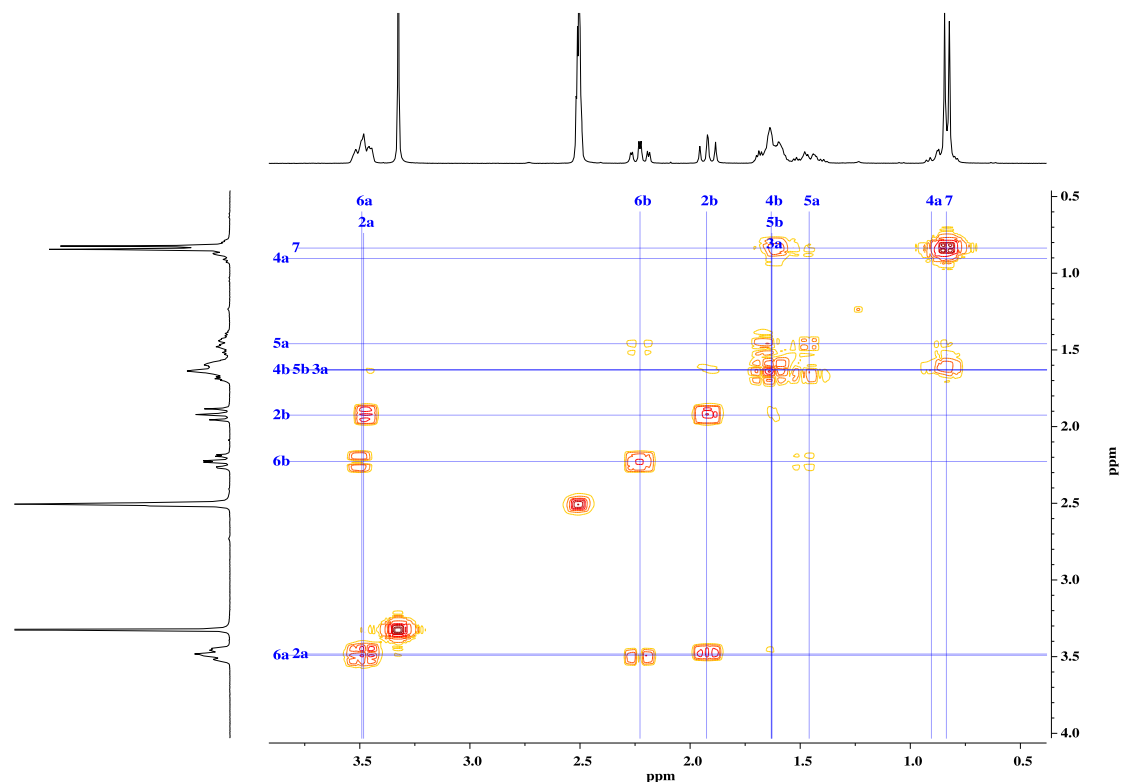


Figura 4.30. Espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY del derivado **S25c**.

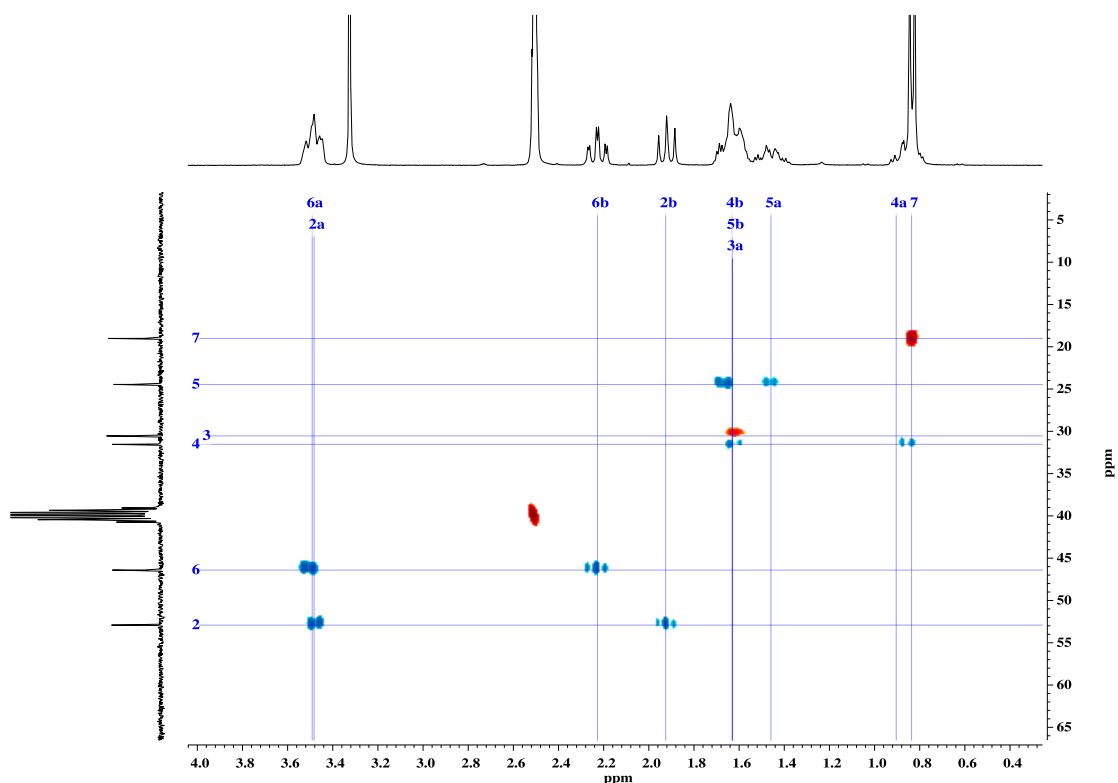


Figura 4.31. Espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC del derivado S25c.

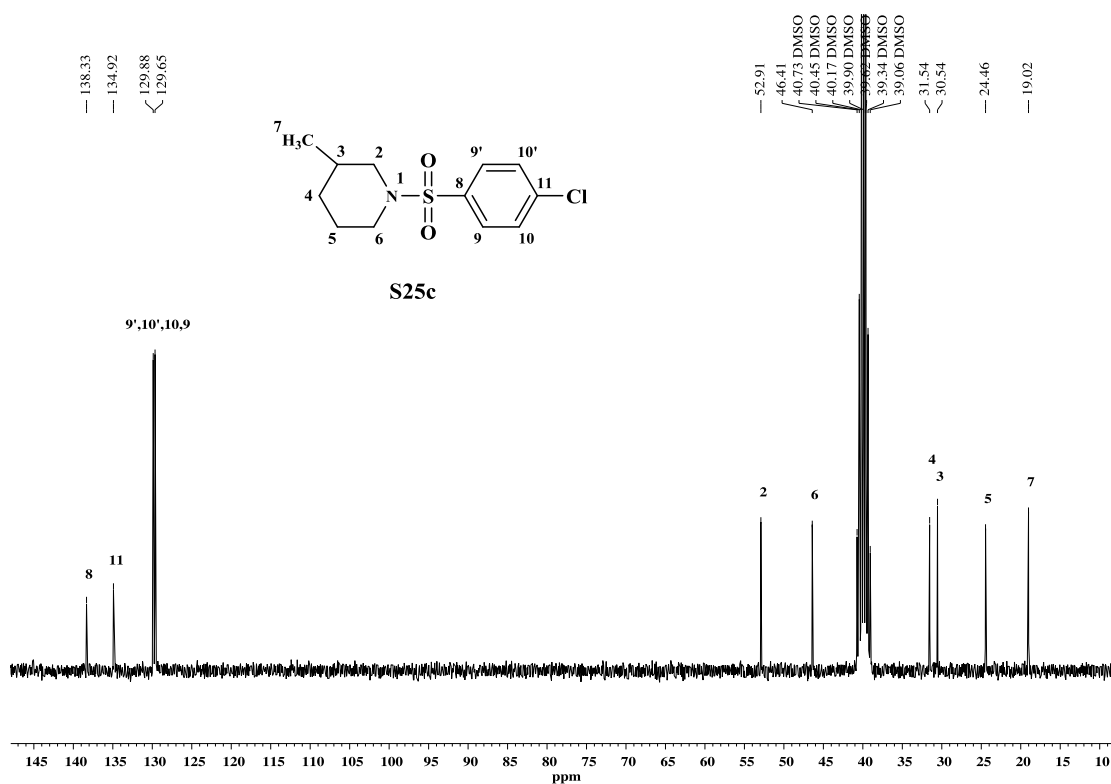


Figura 4.32. Espectro de RMN ^{13}C del derivado S25c. Se indica la asignación para los carbonos en función de la numeración establecida en el compuesto.

4.2. Estudios de actividad antiparasitaria de los derivados de sulfonamidas S1-S26

Uno de los objetivos del presente trabajo de investigación es la obtención de derivados de sulfonamidas con actividad leishmanicida y tripanocida frente a diferentes especies de *Leishmania* y a *Trypanosoma cruzi*.

Estos kinetoplastidos son los agentes etiológicos de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas, respectivamente. Ambas parasitosis se caracterizan por una elevada morbilidad y mortalidad, especialmente en zonas endémicas debido a la presencia de su vector natural. Dada su complejidad epidemiológica y clínica, el arsenal terapéutico para el tratamiento de estas enfermedades es limitado. Los fármacos convencionales producen graves reacciones adversas, requieren posologías que dificultan la adherencia al tratamiento y, en muchas ocasiones, resultan poco efectivos por la continua aparición de resistencias.

El principal objetivo en las primeras fases de búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos frente a estas parasitosis es encontrar pequeñas moléculas con índices selectivos óptimos y propiedades *drug likeness*^{*}, con rutas sintéticas establecidas y reproducibles que permitan obtener compuestos con un grado de pureza elevado (más del 90 %) y establecer grandes librerías de análogos estructurales para determinar la Relación Estructura-Actividad (REA). Además, teniendo en cuenta el estado socioeconómico de las regiones endémicas más afectadas, el desarrollo de fármacos de nueva síntesis deberá estar supeditado a procedimientos sintéticos caracterizados por su sencillez, bajo coste y escalabilidad a nivel industrial para garantizar la accesibilidad a los mismos.¹⁸

Entre las diferentes clases estructurales de compuestos orgánicos, las propiedades farmacológicas de las sulfonamidas son bien conocidas. Desde su descubrimiento como fármacos antibacterianos, se han descrito una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas.¹⁹ Dado su amplio espectro de acción, así como la sencillez y reproducibilidad de su síntesis, pueden constituir un elemento farmacofórico esencial en el desarrollo de fármacos frente a estas parasitosis.

En un estudio preliminar de nuestro grupo de investigación se evaluaron algunas sulfonamidas de las series **S1-S5**, **S7**, **S10** y **S21** (figura 4.33) frente a formas extracelulares de *L. infantum*, correspondiéndose con las sulfonamidas más activas y no citotóxicas los nitroderivados **S2b** y **S3b**, cuya evaluación posterior en un modelo murino de leishmaniosis visceral demostró su eficacia *in vivo*, con una reducción de la carga parasitaria en hígado y bazo del 97-99 %.²

* Características estructurales, fisicoquímicas, toxicológicas y de actividad que definen el potencial de un compuesto para convertirse en fármaco, denominándose como compuesto tipo fármaco o *drug-like*.¹⁷

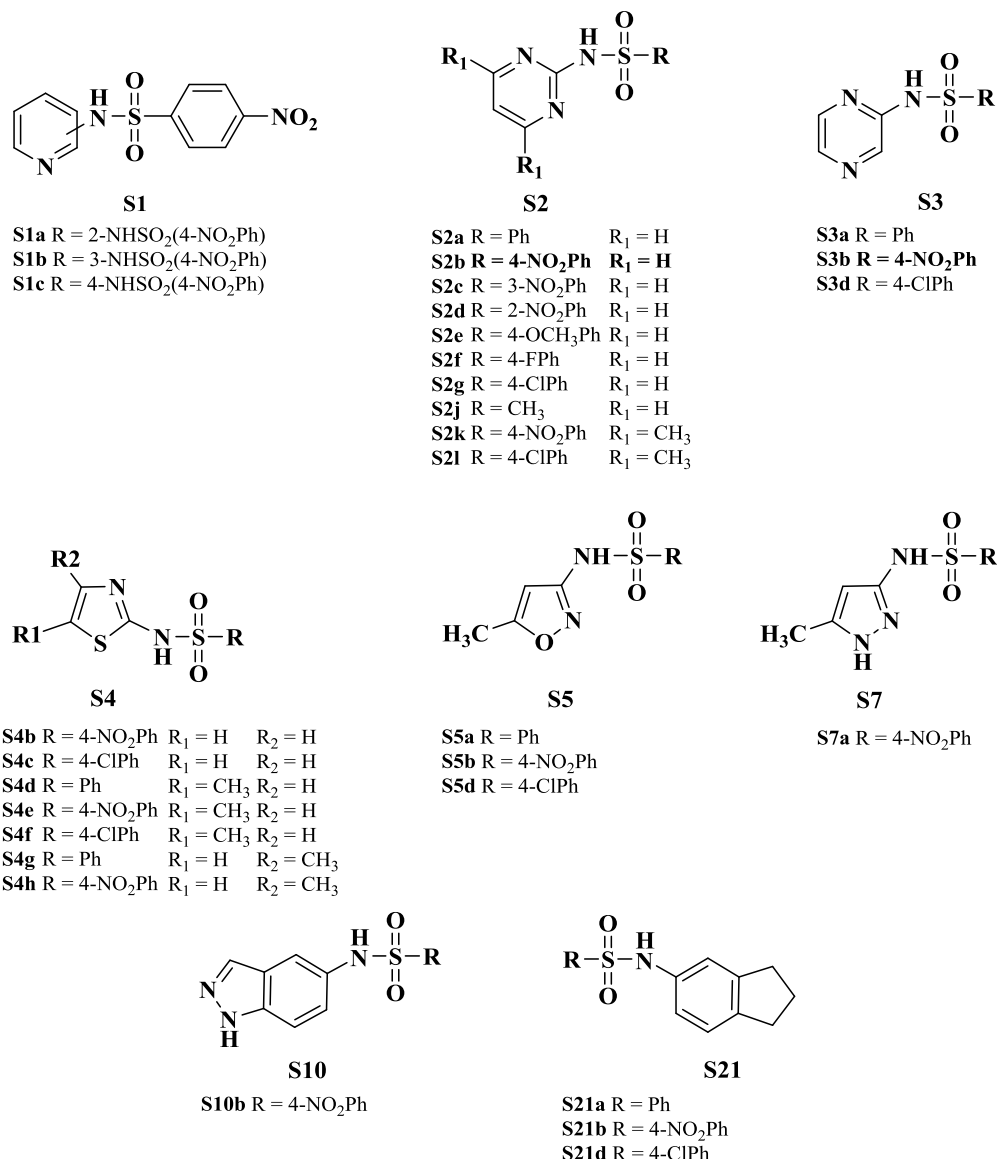


Figura 4.33. Estructura de las sulfonamidas de las series **S1-S5**, **S7**, **S10** y **S21**.

Basándonos en resultados previos descritos en la literatura, así como en los obtenidos por nuestro grupo investigación, nos propusimos ampliar los estudios de actividad de estas sulfonamidas (**S1-S5**, **S7**, **S10** y **S21**) frente a otras especies de *Leishmania* y otros kinetoplastidos (*T. cruzi*). Posteriormente, a partir de los resultados obtenidos, ampliamos la variedad estructural de nuestra librería de sulfonamidas con la síntesis de nuevos derivados, estableciéndose una metodología de trabajo de ciclos sucesivos de diseño, síntesis, evaluación biológica, estudios de REA, propuesta de un mecanismo de acción y reorientación de los objetivos sintéticos.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en la evaluación de las diferentes series de benceno- y naftalenosulfonamidas sintetizadas.

4.2.1. Actividad antiparasitaria de las sulfonamidas de las series S1-S5, S7, S10 y S21

4.2.1.1. Evaluación frente a promastigotes de *Leishmania* spp. y epimastigotes de *T. cruzi*

Dada la eficacia *in vitro* e *in vivo* de las sulfonamidas **S2b** y **S3b**, ampliamos nuestro estudio frente a formas promastigotes de tres aislados de *Leishmania* adicionales: *L. braziliensis* (2903), *L. guyanensis* (141/93) y *L. amazonensis* (MHOM/Br/79/Maria). Estas especies están asociadas, en la mayoría de los casos, con el desarrollo de las formas cutáneas y mucocutáneas por su principal tropismo de infección de macrófagos monocitos y células dendríticas, a diferencia de la infección de células de *Kupffer*, macrófagos esplénicos y de la médula ósea por las especies viscerotrópicas.²⁰

Por otra parte, considerando el amplio espectro de acción de las sulfonamidas frente a otros parásitos kinetoplástidos, concretamente como tripanocidas, evaluamos la susceptibilidad a este tipo de compuestos en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

La evaluación *in vitro* de los derivados **S1-S5**, **S7**, **S10** y **S21** en *Leishmania* spp. fue realizada por el grupo de investigación del Dr. Bolás y la Dra. Dea-Ayuela en la Universidad Complutense de Madrid (UCM), mediante el método fluorométrico de la resazurina reducida, de acuerdo al protocolo estandarizado por el propio grupo de investigación.²¹

El algoritmo de selección consistió en un cribado inicial en formas promastigotes a una dosis única de 100, 10 o 1 $\mu\text{g/mL}$ durante un período de 48 horas. Para las sulfonamidas que presentaron un porcentaje de inhibición (GI, *Growth Inhibition* (%)) significativo, en las especies evaluadas, se determinó su IC_{50} a partir de las curvas dosis-respuesta.

Como fármaco de referencia se utilizó la Miltefosina, hexadecilfosfocolina de administración oral aprobada por la FDA desde 2014 para el tratamiento de cualquier forma clínica de leishmaniosis.²² Paralelamente, se realizaron los estudios de citotoxicidad en macrófagos J774 hasta una concentración máxima de 256 μM , y definir así su índice de selectividad (IS) como criterio de selección para el cribado en las formas intracelulares.

Los estudios de la actividad tripanocida frente a *T. cruzi* fueron llevados a cabo por las Dras. Miriam Rolón y Celeste Vega, en el Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC) de Paraguay. La susceptibilidad de las sulfonamidas objeto de estudio frente a formas epimastigotes de *T. cruzi*, transfectado con el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* (clon B5), se determinó mediante el método del rojo clorofenol β -galactopiranósido tras 72 horas de tratamiento, empleándose como fármaco de referencia el Benznidazol.²³

En la *tabla 4.14* se muestran los resultados obtenidos de la actividad antiprotozoaria de las sulfonamidas evaluadas frente a formas extracelulares de ambos kinetoplástidos, así como su citotoxicidad en macrófagos J774. En la *tabla 4.15* se muestra, para cada uno de los derivados, el IS calculado, definido como el cociente entre el valor CC_{50} (concentración citotóxica que reduce la viabilidad celular de macrófagos J774 en un 50%) y el IC_{50} (concentración de sulfonamida que produce una reducción de la viabilidad de *Leishmania* spp. o *T. cruzi* de un 50% respecto al cultivo no tratado).

Compuesto	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. guyanensis</i>		<i>L. amazonensis</i>		<i>T. cruzi</i>		J774
	^a GI _L	^b IC ₅₀	GI _L	IC ₅₀	GI _L	IC ₅₀	GI _L	IC ₅₀	^c GI _r	IC ₅₀	^d CC ₅₀
S1a	39.3	ND ^e	20.2	ND	0	ND	13	ND	0.8	ND	ND
S1b	35.7	ND	78.2	74.6	76	ND	23	ND	22.8	ND	ND
S1c	46.3	ND	49.1	ND	0	ND	1	ND	17.5	ND	ND
S2a	20.3	ND	17	ND	28	ND	7	ND	ND	ND	ND
S2b	92.7	76.4	94	48.8	99	46.4	98	68.6	87.1	156.1	>256
S2c	0	ND	64.1	ND	43	ND	8	ND	ND	ND	ND
S2d	40.6	ND	43	ND	52	ND	5	ND	ND	ND	ND
S2e	29.6	ND	17.6	ND	39	ND	10	ND	41.1	ND	ND
S2f	5.4	ND	0	ND	68	ND	9	ND	ND	ND	ND
S2g	46.6	ND	69.1	ND	76	ND	16	ND	ND	ND	ND
S2j	ND	ND	ND	ND	37	ND	18	ND	ND	ND	ND
S2k	72.7	223.1	81.9	247.5	67	ND	31	ND	39.7	ND	>256
S2l	71.5	216	79.6	223.3	81	110	87	214.6	ND	ND	>256
S3a	37	ND	32.1	ND	53	ND	20	ND	4.01	ND	ND
S3b	90.8	66.2	84.3	61.5	94	84.2	30	ND	84.7	76.14	>256
S3d	3	ND	69.4	ND	0	ND	68	ND	20.6	ND	>256
S4b	58.6	ND	81.1	93.5	87	169	54	ND	32.6	ND	>256
S4c	65.0	175	73.2	139.4	87	169.2	62	ND	ND	ND	>256
S4d	84.4	112	91.9	147.5	91	108.4	41	ND	31.8	ND	>256
S4e	36.7	ND	67	ND	27	ND	25	ND	37.4	ND	ND
S4f	71	29.1	81	1.5	63	33.2	74.2	5	51	ND	>256
S4h	55.6	ND	47.4	ND	0	ND	99	230.5	41.4	ND	ND
S5a	17.8	ND	63.6	ND	84	110.8	56	ND	44	ND	>256
S5b	85.5	174	55	ND	0	ND	13	ND	18.5	ND	>256
S5c	15.7	ND	73.1	ND	91	132.0	41	ND	38	ND	>256
S7a	53	ND	73	ND	84	83.4	83	163.6	79	58.3	>256
S10b	98	61.3	89	80.8	94	139.6	97.9	66.7	58	ND	132.9
S21a	45.3	ND	73.1	ND	57	ND	53	ND	61.5	ND	ND
S21b	91.9	3.1	84.4	55.9	76	39	90	11.4	100	35.6	61
S21d	96	6.8	82	22	96	1.9	100	18	90.2	76.1	94
M ^f	93	17.7	95	17.7	98	19.4	98	30.7	–	–	135.9
B ^g	–	–	–	–	–	–	–	–	90.3	54.7	>256

Tabla 4.14. Susceptibilidad de las formas promastigotes de *Leishmania* spp. y epimastigotes de *T. cruzi* frente a las sulfonamidas evaluadas de las series S1-S5, S7, S10 y S21. ^aGI_L (%): porcentaje de inhibición del crecimiento a las 48 horas de tratamiento a una concentración de sulfonamida de 100 µg/mL; ^bIC₅₀: concentración de compuesto que produce una reducción de la viabilidad celular de un 50% respecto al cultivo no tratado; ^cGI_r (%): porcentaje de inhibición del crecimiento a las 72 horas de tratamiento a una concentración de sulfonamida de 100 µg/mL; ^dCC₅₀: concentración citotóxica que reduce la viabilidad celular en un 50%; ^eND: No Determinado; ^fM: Miltefosina; ^gB: Benznidazol.

Compuesto	IS ^a				
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>
S2b	>3.4	>5.2	>5.5	>3.7	>1.6
S2k	>1.2	>1.0	ND ^b	ND	ND
S2l	>1.2	>1.1	>2.3	>1.2	ND
S3b	>3.9	>4.2	>3.0	ND	>3.4
S4b	ND	>2.7	>1.5	ND	ND
S4c	>1.5	1.8	>1.5	ND	ND
S4d	>2.3	1.7	>2.4	ND	ND
S4f	>8.8	>170.7	>7.7	>51.2	ND
S5a	ND	ND	>2.3	ND	ND
S5c	ND	ND	>1.9	ND	ND
S7a	ND	ND	>3.1	>1.6	>4.4
S10b	2.2	1.6	0.6	2.0	ND
S21b	19.7	1.1	1.6	5.3	1.7
S21d	13.8	4.3	49.5	5.2	1.2
^c M	7.7	7.7	7.0	4.4	
^d B	ND	ND	ND	ND	>4.7

Tabla 4.15 Índices de selectividad de las sulfonamidas de las series **S2-S5**, **S7**, **S10** y **S21** con actividad leishmanicida y tripanocida *in vitro* frente a formas extracelulares de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*. ^aIS: Índice de selectividad (IS = CC₅₀/IC₅₀); ^bND: No Determinado; ^cM: Miltefosina; ^dB: Benznidazol.

A pesar de poseer las diferentes especies de *Leishmania* un tropismo principal, no existe una categorización absoluta y estática de asociación entre éstas y las diferentes formas clínicas de leishmaniosis. Así lo demuestran los casos descritos de leishmaniosis visceral producidos por *L. amazonensis*²⁴ y *L. tropica*,²⁵ de tropismo dermatrópico, como los casos de leishmaniosis cutánea producidos por *L. donovani*,²⁶ de tropismo viscerotrópico. Ante esta complejidad clínica, por acuerdo previo con diferentes expertos en las diferentes formas clínicas de leishmaniosis, entre las recomendaciones que establece el DNDi (*Drugs for Neglected Disease Initiative*)[†] respecto al perfil terapéutico de nuevos fármacos para estas parasitosis, bajo la denominación de *Target Product Profile* (TPP), se incluye su eficacia frente a todas las especies de *Leishmania* como criterio óptimo para su selección como prototipo o cabeza de serie.²⁷

En nuestro estudio (tablas 4.14 y 4.15), de los 31 derivados evaluados, las sulfonamidas **S2b**, **S2l**, **S4f**, **S10b**, **S21b** y **S21d** fueron activas frente a todas las especies de *Leishmania*. No obstante, **S21b** y **S21d** resultaron ser citotóxicas en macrófagos J774. A pesar de ello, la sulfonamida **S21b** presentó un IS superior al fármaco de referencia frente a *L. infantum* (IS_(S21b) = 19.7, IS_(M) = 7.7), y de manera significativa la sulfonamida **S21d** en *L. guyanensis* (IS_(S21d) = 49.5, IS_(M) = 7.7). Por otro lado, la sulfonamida **S10b** presentó una citotoxicidad *in vitro* comparable a la miltefosina (CC₅₀(S10b) =

[†] La Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi) es una organización de investigación y desarrollo, sin fines de lucro, de nuevos tratamientos para las enfermedades desatendidas, de más de 700 colaboraciones público-privadas y plataformas regionales en zona endémicas. <http://www.dndi.org>.

132.9, $CC_{50(M)} = 135.9$), pero con índices de selectividad mucho menores, debido a los elevados valores de IC_{50} obtenidos.

De entre los cuatro derivados activos y no citotóxicos a la concentración máxima establecida ($CC_{50} = 256 \mu M$), **S2b**, **S2i**, **S4f**, y **S10b**, la sulfonamida **S4f** presentó los mayores IS respecto al fármaco de referencia, muy similar para *L. guyanensis* ($IS_{(S4f)} > 7.7$, $IS_{(M)} = 7.7$), pero muy superiores para *L. braziliensis* ($IS_{(S4f)} = 170.7$, $IS_{(M)} = 7.7$) y *L. amazonensis* ($IS_{(S4f)} > 51.2$, $IS_{(M)} = 4.4$), con valores de $IC_{50} < 10 \mu M$ (1.5 y $5 \mu M$ en *L. braziliensis* y *L. amazonensis* respectivamente). Cabe destacar que el nitroderivado **S2b**, cuya actividad *in vitro* e *in vivo* en *L. infantum* se había demostrado en nuestro estudio anterior, también resultó moderadamente activo frente a las formas promastigotes de las especies adicionales, con valores de IC_{50} similares y con aceptables IS, aunque inferiores al compuesto **S4f**.

Los resultados obtenidos evidencian las diferencias inter-especie de *Leishmania* spp. en la susceptibilidad a las sulfonamidas estudiadas. Tres derivados fueron activos frente a todas las especies excepto en *L. amazonensis*, **S4c**, **S4d** y el nitroderivado **S3b**. Este último, con actividad *in vitro* e *in vivo* demostrada frente a *L. infantum*, presentó IS similares a **S2b** ($IS = 3-4$). Tres sulfonamidas fueron activas frente dos especies, **S2k** (*L. infantum*, *L. braziliensis*), **S4b** (*L. braziliensis* y *L. guyanensis*) y **S7a** (*L. guyanensis* y *L. amazonensis*); y 5 selectivas de especie, **S1b** para *L. braziliensis*, **S4h** para *L. amazonensis*, **S5b** para *L. infantum* y sus análogos estructurales **S5a** y **S5c** para *L. guyanensis*.

Las diferencias inter- o intra-especie de aislados de diversas zonas geográficas, en cuanto a la sensibilidad *in vitro* e *in vivo* frente a fármacos leishmanicidas han sido ampliamente descritas.²⁸ La causa de la diferente susceptibilidad se atribuye a las diferencias bioquímicas y moleculares entre las distintas especies que, a su vez, median la relación parásito-hospedador, la progresión y el mecanismo de supervivencia del parásito, la diferente localización de la infección y por tanto, la forma clínica.

Los estudios de la variación *in vitro* e *in vivo* de las diferentes especies de *Leishmania* para los tratamientos convencionales demuestran la diversidad de mecanismos que median la susceptibilidad, en la mayoría de ocasiones, asociadas a un proceso de selección de cepas resistentes.²⁹ Entre los múltiples mecanismos que están frecuentemente involucrados se incluye la disminución de la captación de fármaco y el aumento de su exportación, mecanismo asociado a la variabilidad inter-especie en respuesta a la Pentamidina³⁰ o la Miltefosina, en esta última mediada por un complejo transportador de membrana específico (MT, *Miltefosine Transporter*).³¹ Otros mecanismos descritos son la inactivación de fármaco por el metabolismo, o la disminución de su afinidad con la diana biológica, como se describe en la variabilidad de respuesta a la Anfotericina, por diferencias en el tipo y cantidad de esteroides de membrana,³² o al Alopurinol, por una menor afinidad a las enzimas de la ruta biosintética de purinas.³³

La base multifactorial de la respuesta terapéutica tiene especial relevancia clínica. Incluso a pesar de un mecanismo de acción y variabilidad inter-especie conocidos, puede no llegar a existir una correlación entre los resultados *in vitro* y la práctica clínica.³⁴

En nuestro estudio, si comparamos el espectro de actividad de las sulfonamidas de las series **S1-S5**, **S7**, **S10** y **S21**, observamos que *L. guyanensis* es la especie más sensible, seguida de *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. amazonensis*. Según estos resultados, podríamos considerar que las especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* (*Viana*), *L. guyanensis* y *L. braziliensis*, son más

susceptibles a estos compuestos que las pertenecientes al subgénero *Leishmania* (*Leishmania*), *L. amazonensis* y *L. infantum*.

Otra de las características destacables del perfil de actividad de estos compuestos es que ninguno presentó una actividad selectiva frente a formas epimastigotes de *T. cruzi*. De las diferentes series evaluadas frente a este kinetoplastido, las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S7a** resultaron activas y no citotóxicas. La sulfonamida **S2b**, la única sulfonamida activa frente a las formas extracelulares de ambos tripanosomátidos, no resultando citotóxica en macrófagos, presentó un bajo índice de selectividad frente a formas epimastigotes ($IS_{(S2b)} > 1.6$; $IC_{50(S2b)} = 156.1 \mu M$). Únicamente los compuestos **S3b** y **S7a** inhibieron el crecimiento de las formas extracelulares de *T. cruzi* de manera significativa ($p < 0.05$). El nitroderivado **S3b**, activo también frente a tres especies de *Leishmania*, presentó un IS de 3.4 para las formas epimastigotes de *T. cruzi* con un IC_{50} de $76.1 \mu M$. Curiosamente, el derivado **S7a**, que solo había sido activo frente *L. guyanensis* y *L. amazonensis*, resultó ser el compuesto más efectivo frente a *T. cruzi* con un IC_{50} de $58.3 \mu M$ y un IS de 4.4, valores muy próximos a los obtenidos con el fármaco de referencia, el Benznidazol ($IC_{50(B)} = 54.7 \mu M$, $IS_{(B)} = 4.7$).

En el análisis global de estos resultados, comparando la actividad frente a ambos kinetoplastidos, la eficacia tripanocida fue considerablemente menor. Por lo que aparentemente, la presencia del grupo sulfonamido parece estar más relacionada con la actividad leishmanicida que con su efecto tripanocida.

Si comparamos la estructura de las sulfonamidas, **S2b**, **S3b** y **S7a**, activas frente a *T. cruzi*, se observa que las tres poseen el sustituyente *p*-nitrobencono, un grupo nitro ($-NO_2$) unido a un anillo aromático, análogamente al Nifurtimox (un nitrofurano) y el Benznidazol (un nitroimidazol) (figura 4.34), fármacos comerciales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, o el Fexinidazol, fármaco de administración oral en ensayos clínicos avanzados, tanto para el tratamiento de las fases agudas y crónicas de la enfermedad de Chagas como en el tratamiento de las diferentes formas clínicas de leishmaniosis.³⁵

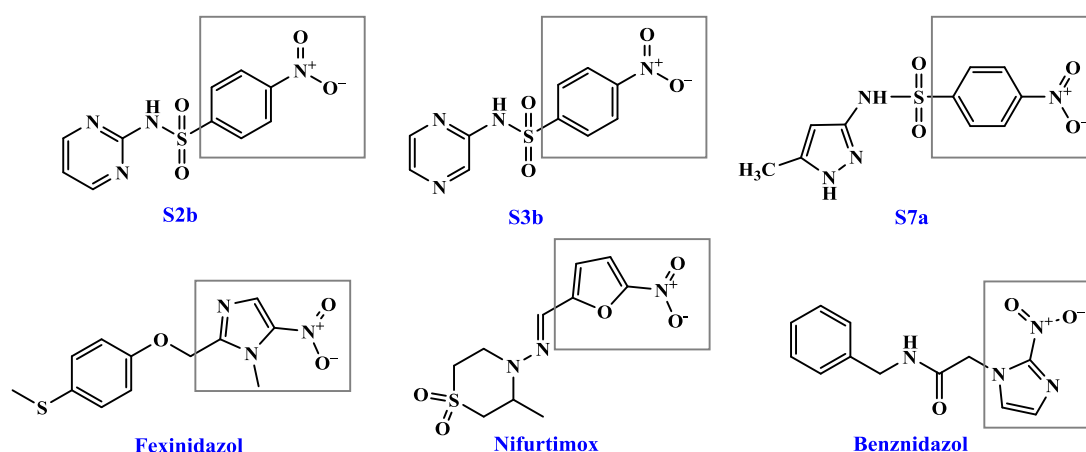


Figura 4.34. Relación estructural de las sulfonamidas activas frente a epimastigotes de *T. cruzi* (**S2b**, **S3b** y **S7a**) y los fármacos comerciales (Nifurtimox y Benznidazol) o en desarrollo clínico avanzado (Fexinidazol) para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

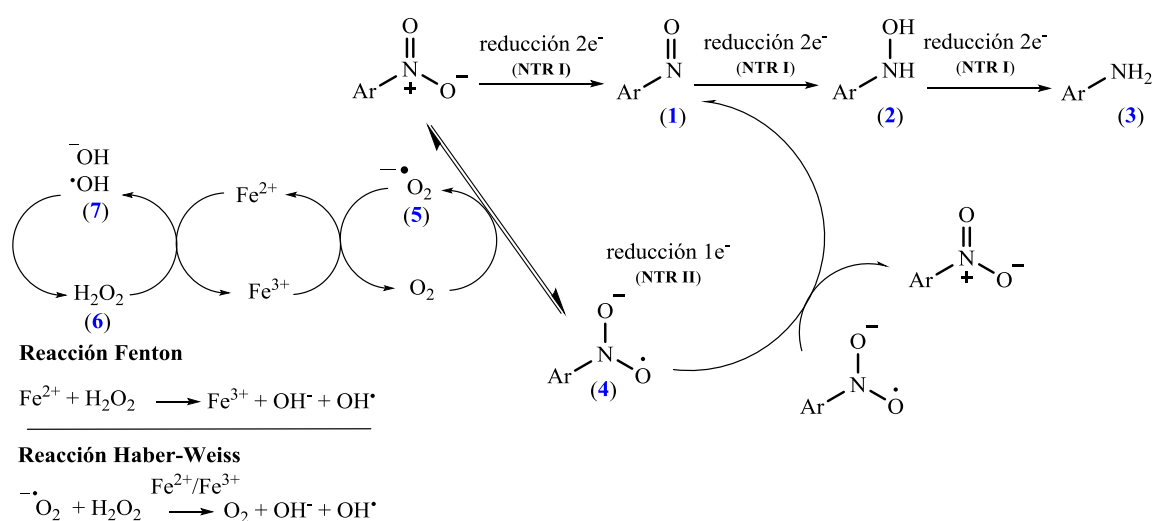
El resultado destaca por tanto, la importancia para la actividad tripanocida de un grupo $-\text{NO}_2$ unido a un anillo aromático, como así lo demuestra el interés de diversos laboratorios en desarrollar este tipo de compuestos, a medida que se conoce con mayor exactitud su mecanismo de acción.³⁶

Los nitroderivados pueden ejercer su acción por una unión directa a diversas macromoléculas, en su mayoría proteínas, donde el grupo $-\text{NO}_2$ actuaría como grupo funcional contribuyendo, directa o indirectamente, a la interacción del compuesto por la combinación única de propiedades que posee: grupo fuertemente electrón-atrayente, pequeño, polar y con capacidad de formación de puentes de hidrógeno.

Otra posibilidad es que el grupo $-\text{NO}_2$ sea reducido enzimáticamente y se generen especies reactivas, ejerciendo su acción a partir de un mecanismo adicional actuando como profármaco. Esta bioactivación estaría mediada por nitrorreductasas de tipo I (NTRs I) y/o nitrorreductasas de tipo II (NTRs II) (*esquema 4.1*).

Las NTRs I, comúnmente presentes en bacterias y ausentes en la mayoría de eucariotas, median la reducción secuencial del grupo $-\text{NO}_2$ por un proceso de transferencia de dos electrones en ausencia de oxígeno generándose especies citotóxicas, un intermedio nitroso (**1**) y la consiguiente reducción a hidroxilamina (**2**), la cual puede además ser convertida a cationes nitronio altamente reactivos con el ADN, o finalmente reducirse para dar lugar a la amina correspondiente (**3**).³⁷

La reducción mediada por las NTRs II se debe a un proceso de transferencia de un solo electrón. El grupo $-\text{NO}_2$ actúa como aceptor originándose un anión nitro radical (**4**). La inestabilidad de este radical, deslocalizándose el electrón desapareado entre el nitrógeno y los dos oxígenos, hace que en condiciones aerobias entre a formar parte de un ciclo redox dando lugar a un radical superóxido (**5**) y se revierta al nitroderivado de partida. El anión radical superóxido dismuta generando peróxido de hidrógeno (**6**), reacción catalizada por la Superóxido Dismutasa (SOD), y el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno forman radical hidroxilo (**7**) mediante *reacciones tipo Fenton y Haber-Weiss*.



Esquema 4.1. Activación de nitroderivados por nitrorreductasas tipo I (NTRI) y tipo II (NTRII). Modificado de *Patterson y col.*³⁸

Esta generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y/o metabolitos electrofílicos, mediada por las NTR II, es el mecanismo comúnmente aceptado por el cual ejercen su acción tripanocida el Nifurtimox y el Benznidazol, atribuyéndose su relativa especificidad a una deficiencia de los sistemas defensivos frente al estrés oxidativo (catalasa y glutatión peroxidasa) en *T. cruzi*,³⁹ así como a la principal causa de la citotoxicidad de este tipo de compuestos.

El grupo -NO₂, por su elevada reactividad en condiciones aerobias, es considerado como una “*estructura de alerta*”. Como consecuencia, este tipo de compuestos son excluidos, en muchas ocasiones, de las grandes librerías de compuestos de nueva síntesis.^{38, 40} Sin embargo, en los últimos años, diferentes estudios han demostrado que la relativa toxicidad selectiva del Nifurtimox se debe principalmente a su reducción por NTR I, reemplazando a estudios previos, donde estaban implicadas otras enzimas como la tripanotión reductasa.⁴¹

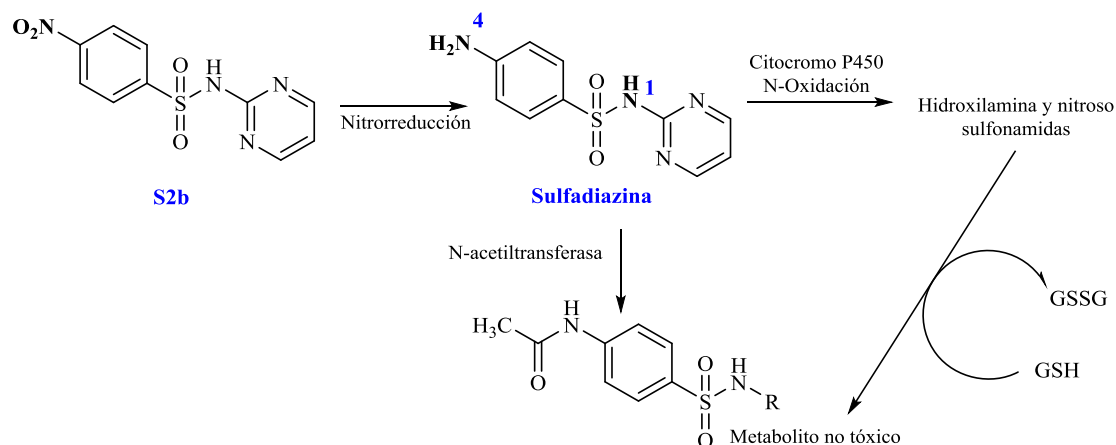
Por otro lado, se han identificado diversas peroxidasas en *T. cruzi* capaces de detoxificar H₂O₂, hidroperóxidos orgánicos de cadena corta y peroxinitrilos, por lo que el buen sistema defensivo que el parásito posee no parece explicar la actividad del Nifurtimox mediada por ROS en su totalidad.⁴²

La presencia de NTRs I, propias de bacterias, en determinados parásitos protozoos, como *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* sp., constituye una excepción en eucariotas, no existiendo su homólogo en mamíferos, por lo que el desarrollo de compuestos nitroderivados para el tratamiento de estas parasitosis adquiere especial relevancia. En nuestro caso, podría explicar la actividad selectiva de las *N*-4-nitrobenzenosulfonamidas sustituidas, **S2b**, **S3b** y **S7a**.

En el estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación de las sulfonamidas de las series **S1-S5**, **S7**, **S10** y **S21**, frente a *L. infantum*, se demostró que la presencia del grupo -NO₂ en el cabeza de serie **S2b** era esencial para su actividad, ya que la sulfadiazina, sulfonamida antibacteriana de amplio espectro, y análogo reducido de la sulfonamida **S2b**, no presentó actividad *in vitro* frente a *L. infantum*.

La sustitución del grupo -NO₂, de la sulfonamida **S2b**, por un grupo amino (-NH₂), resultó en una pérdida total de actividad, por lo que se concluyó que la actividad de la sulfonamida **S2b**, no se debía a su forma reducida tras su metabolización *in vivo*: el nitroderivado **S2b**, por reacciones de biotransformación de fase I, se reduciría a un metabolito inactivo que posteriormente, de acuerdo a la metabolización hepática de los fármacos sulfa sería rápidamente acetilado para dar lugar a un metabolito no tóxico, más hidrofílico y poder ser eliminado por el organismo⁴³ (*esquema 4.2*).

La ausencia de actividad para la forma reducida de la sulfonamida **S2b** también planteaba que pudiera descartarse como mecanismo de acción la vía clásica de inhibición de la síntesis de folatos, puesto que atendiéndonos a la REA de las sulfonamidas antibacterianas como antagonistas competitivos del PABA en su inhibición con la dihidropteroato sintetasa, el grupo amino en la posición 4 es esencial en la actividad antibacteriana.⁴⁴



Esquema 4.2. Metabolización hepática de las *para*-aminobencenosulfonamidas antibacterianas. N¹/N⁴: elementos farmacofóricos de la acción antibacteriana de los fármacos *sulfa*; GSH: glutatión; GSSG: glutatión disulfuro. Modificado de Solensky y col.^{43b}

4.2.1.2. Evaluación frente a amastigotes de *Leishmania infantum*

Una vez seleccionadas las sulfonamidas S2b, S3b y S4f, por su actividad *in vitro* en el primer cribado frente a formas extracelulares de *Leishmania* spp., determinamos su actividad en formas amastigotes, forma parasitaria causante de la patogenicidad en el hombre. Los estudios fueron realizados por el grupo de investigación de los Dres. Bolás y Dea-Ayuela, a partir de un modelo de infección en macrófagos de *L. infantum*, previamente establecido por el mismo grupo.²¹

La susceptibilidad de las formas intracelulares de *L. infantum* fue menor para estos compuestos respecto al fármaco de referencia (tabla 4.16), por lo que aun no siendo citotóxicas a la concentración máxima evaluada en macrófagos J774, la Miltefosina presentó un mejor IS. Estos resultados coinciden, en términos generales, con los obtenidos en la mayoría de los cribados iniciales de desarrollo de fármacos leishmanicidas, donde se observa una disminución de la eficacia *in vitro* en las formas intracelulares.⁴⁵

La localización de los amastigotes de *Leishmania* spp. en el interior del fagolisosoma del macrófago restringe la biodisponibilidad del fármaco. Éste debe ser lo suficientemente lipófilo y acceder a los mismos mediante un transporte pasivo, a través de la membrana externa del macrófago, de la vacuola parasitófora y de la membrana del amastigote intracelular.

El descriptor molecular ampliamente utilizado que define la lipofilia de un fármaco es el logP, coeficiente de partición de una molécula neutra entre dos fases inmiscibles, comúnmente entre *n*-octanol y agua.⁴⁶ Como se muestra en la tabla 4.16, el ACD/logP[‡] de los derivados S2b, S3b y S4f resultó inversamente proporcional a la disminución de la actividad en las formas intracelulares. La

[‡] Algoritmo basado en la contribución de átomos separados, fragmentos estructurales e interacciones intramoleculares entre los diferentes fragmentos, de *Advanced Chemistry Development, Inc.* (ACD/labs) <http://support.acdlabs.com>.

sulfonamida **S4f**, con un valor de logP superior a los nitroderivados **S2b** y **S3b**, presentó una menor eficacia en las formas amastigotes, por lo que, según este modelo predictivo, no puede asociarse la actividad de los compuestos con su lipofilia.

Compuesto	<i>Promastigotes</i>		<i>Amastigotes</i>		ACD/LogP ^c
	IC ₅₀ ^a (μM)	IS ^b	IC ₅₀ (μM)	IS	
S2b	76.4	3.3	88	2.9	1.04 ± 0.26
S3b	66.2	3.9	79	3.2	1.20 ± 0.38
S4f	29.1	8.8	90	2.8	2.63 ± 0.33
M^c	17.7	7.9	23.7	5.7	-

Tabla 4.16. Actividad *in vitro* frente a formas extra- e intracelulares de *L. infantum* e índices de selectividad. ^aIC₅₀: concentración de compuesto que produce una reducción de la viabilidad celular de un 50% respecto al cultivo no tratado; ^bIS: Índice de selectividad (IS = CC₅₀/IC₅₀); ^cACD/LogP: ACD/labs logP (<http://acdlabs.com>).

Otros mecanismos descritos que determinan la ineficacia en las formas intracelulares pueden asociarse a: 1) la inestabilidad del compuesto en el ambiente ácido y oxidativo del interior del fagolisosoma, 2) la metabolización del compuesto por el mismo macrófago dando lugar a un metabolito inactivo, 3) la extrusión de fármacos mediada por MRP-1 (*Multidrug Resistance Protein-1*) o P-gp (*Permeability glycoprotein*) en la membrana plasmática o que, 4) el mecanismo sea propio de la forma parasitaria.⁴⁷

4.2.1.3. Análisis morfológico y ultraestructural en promastigotes de *L. infantum* tras el tratamiento con las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S4f**

Con el objeto de determinar el mecanismo de acción, analizamos los cambios morfológicos y alteraciones ultraestructurales en promastigotes de *L. infantum* tras el tratamiento con las sulfonamidas más activas **S2b**, **S3b** y **S4f**, a una concentración correspondiente a su valor IC₅₀ (IC_{50(S2b)} = 76.4 μM; IC_{50(S3b)} = 66.2 μM; IC_{50(S4f)} = 29.1 μM) durante 48 horas.

Como se observa en las imágenes de la *figura 4.35* obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, los promastigotes correspondientes al grupo control presentaron las características morfológicas propias de esta forma parasitaria en la fase de crecimiento logarítmico: forma elongada, provistos de un gran flagelo polar y formando rosetas. Por el contrario, en los promastigotes tratados con las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S4f**, se evidenció la formación de poros de tamaño variable próximos al núcleo con pérdida del contenido intracelular. Además, en aquellos tratados con las sulfonamidas **S2b** y **S4f**, se observaron alteraciones más extensas en la membrana, con daño exacerbado del citoesqueleto del parásito.

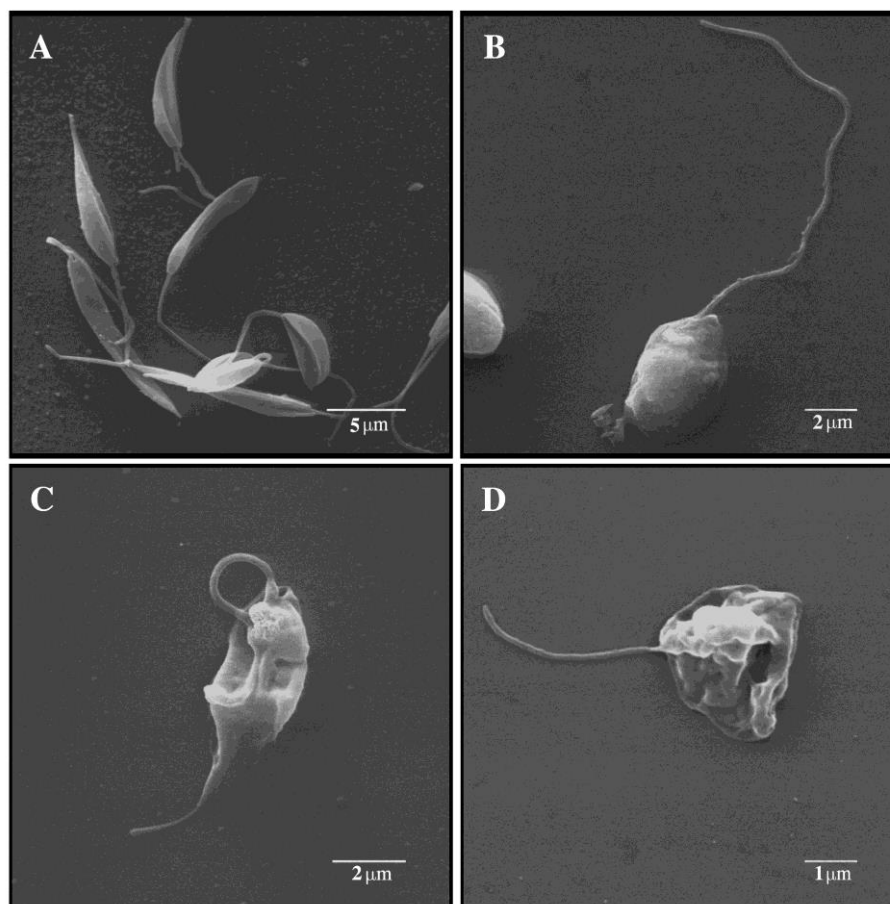


Figura 4.35. Alteraciones morfológicas en promastigotes de *L. infantum* en fase de crecimiento exponencial tratados con las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S4f**. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (Zeiss DSM-950). **A.** Promastigotes no tratados. **B. S2b** (76.4 μM). **C. S3b** (66.2 μM). **D. S4f** (29.1 μM).

En el análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión también se evidenciaron notables diferencias de los promastigotes tratados respecto al grupo control (*figura 4.36* y *tabla 4.17*). En estos últimos se observaron las características ultraestructurales propias del parásito, distinguiéndose fácilmente las diferentes organelas: el núcleo (N) de gran densidad electrónica, con su nucléolo (Nu) en la zona central y la red de microtúbulos (Mt) extendiéndose desde los polos al ecuador del núcleo, el kinetoplasto (K), como una extensión mitocondrial, la bolsa flagelar (FP, *flagelar pocket*), el flagelo (F) y grandes vacuolas (V).

En los promastigotes tratados con las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S4f** se observaron daños de diferente localización en función del compuesto. En el tratamiento con los derivados **S2b** y **S3b** se observaron daños fácilmente apreciables en el núcleo, bolsa flagelar y especialmente en la mitocondria, junto con múltiples vacuolas y cuerpos electrodensos y aumento del número de acidocalcisomas. Mientras que en los promastigotes tratados con la sulfonamida **S4f** se observó una desorganización intracitoplasmática y nuclear generalizada, siendo el orgánulo de mayor afectación el flagelo (*figura 4.36* y *tabla 4.17*).

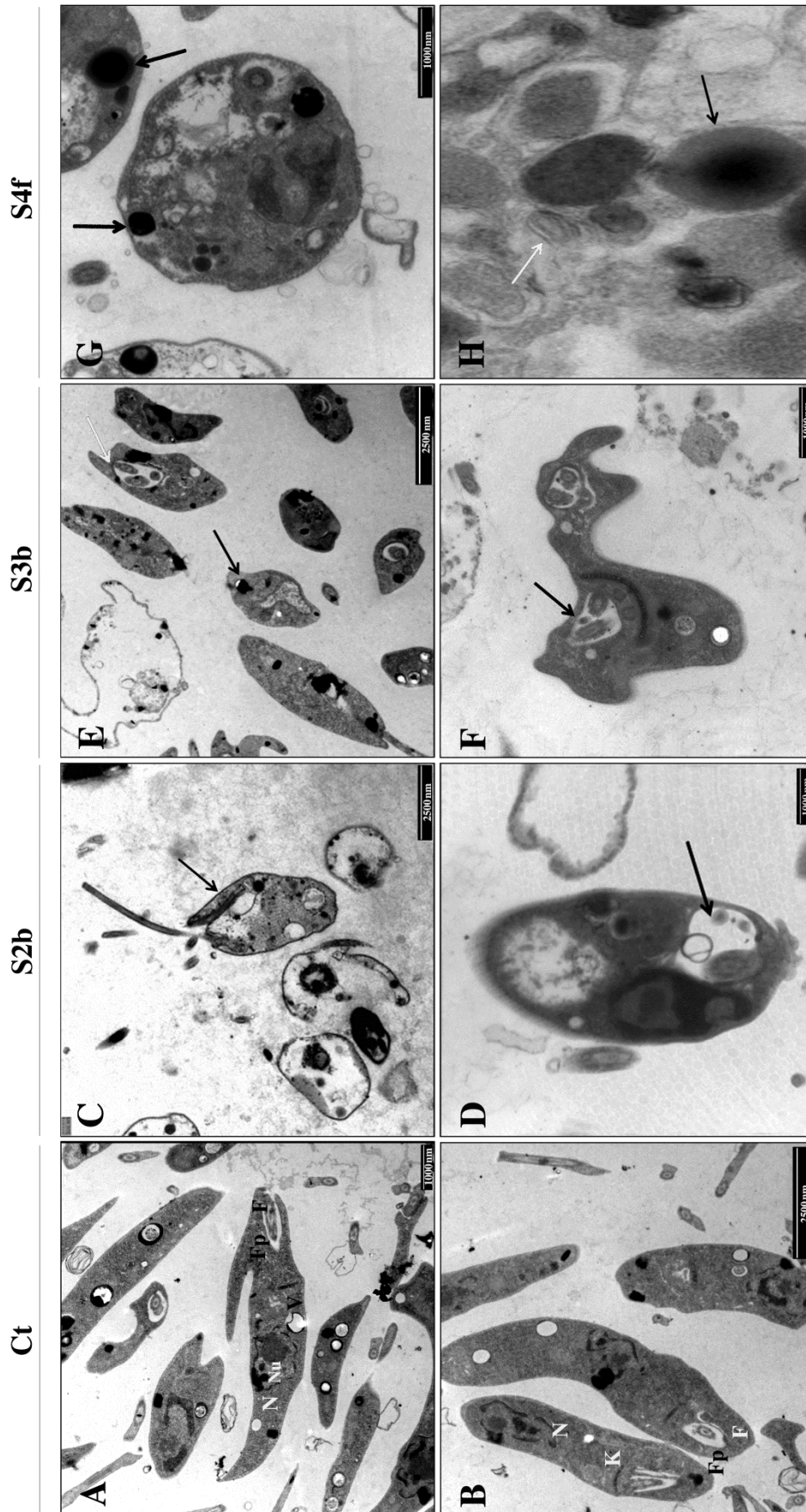


Figura 4.36. Alteraciones ultraestructurales en promastigotes de *L. infantum*, en fase logarítmica de crecimiento, inducidas por las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S4f**. Imágenes representativas obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. **A-B.** Promastigotes no tratados; **N:** núcleo; **Nu:** nucleolo; **K:** kinetoplasto; **Fp:** bolsa flagelar; **V:** vacuola. **C-D.** Promastigotes tratados con la sulfonamida **S2b** (76.4 μM). Se indica la localización de la bolsa flagelar, uno de los orgánulos de mayor afectación. **E-F.** Promastigotes tratados con la sulfonamida **S3b** (66.2 μM). Se indica la localización de acidocalcisomas (E, flecha negra) y promastigotes multiflagelados (E, flecha blanca, F, flecha negra). **G-H.** Promastigotes tratados con la sulfonamida **S4f** (29.1 μM). Se indica la localización de cuerpos electrodensos (**G** y **H**, flecha negra) y residuos laminares (**H**, flecha blanca)

Estructura	Frecuencia de daño (%)			
	S2b	S3b	S4f	Control
Núcleo	17	56	79	11
Membrana nuclear	38	38	75	14
Kinetoplasto	44	36	60	0
Membrana plasmática	33	50	30	15
Flagelo	0	67	100	0
Bolsa flagelar	71	75	0	0
Mitocondria	78	80	33	18

Tabla 4.17. Frecuencia de daño observada en promastigotes de *L. infantum* por microscopia electrónica de transmisión después de 48 horas de exposición a las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S4f**.

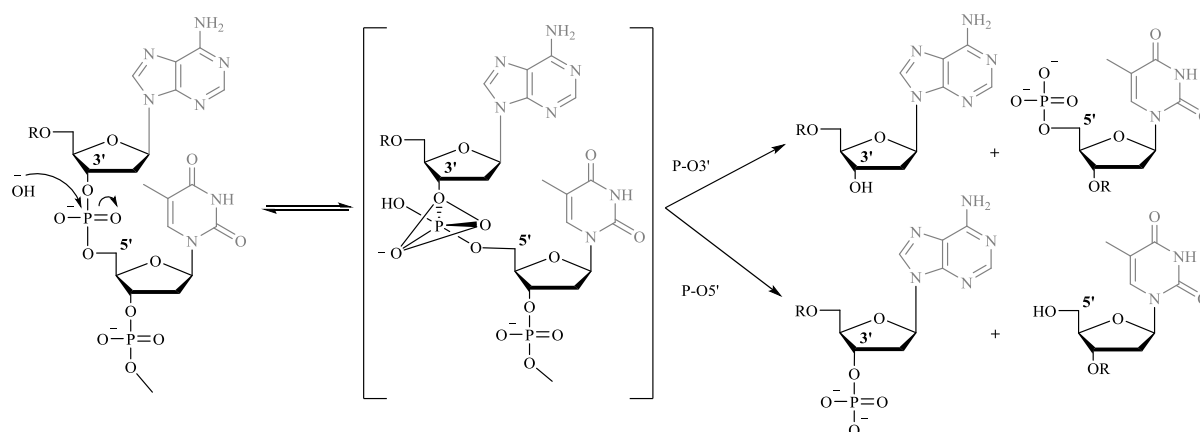
La vacuolización y la dilatación mitocondrial son alteraciones ultraestructurales comúnmente observadas tras el tratamiento con diferentes agentes terapéuticos, como en *L. major* tras el tratamiento con óxido nítrico,⁴⁸ en *L. amazonensis* tras el tratamiento con Pentamidina⁴⁹ o en *T. cruzi* tras el tratamiento con nitroderivados heteroaromáticos.⁵⁰ Su detección, tras el tratamiento con **S2b** y **S3b**, siendo la mitocondria el orgánulo de mayor afectación ultraestructural, podría ser atribuido a la localización mitocondrial de las nitrorreductasas que median su reducción generando ROS y/o especies nitrosas.

Dada la relevancia de los sulfonamidas **S2b** y **S3b** para el tratamiento de ambas parasitosis y su eficacia *in vitro* frente a *Leishmania* spp. y *T. cruzi* e *in vivo* frente a *L. infantum*, en ausencia de citotoxicidad, los convierte en compuestos de especial interés para profundizar en su mecanismo de acción, si éste se asocia a una bioactivación por nitroreducción y las enzimas implicadas en la misma, así como determinar la relevancia de la *para*-sustitución, por las diferencias conformacionales, estereoeléctricas y en su potencial redox entre **S2b** y sus análogos estructurales, los nitroderivados *meta* - y *orto* -sustituidos **S2c** y **S2d**.

4.2.1.4. Estudios de actividad nucleasa de las sulfonamidas S2b, S3b y S4f

Las nucleasas son enzimas que catalizan la escisión del ADN, mediante hidrólisis de los enlaces fosfodiéster, regulando procesos vitales en el desarrollo celular, como son la replicación, transcripción, recombinación y reparación. Su actividad puede ser específica de ARN (*ribonucleasas*), de ADN (*desoxirribonucleasas*) o escindir inespecíficamente ambos polinucleótidos. La posición de hidrólisis en el mismo también las permite clasificarse como *exo*- o *endonucleasas*, según se produzca la hidrólisis en un extremo o entre los nucleótidos intermedios, o ser determinadas de *tipo a* o *tipo b* según se produzca la hidrólisis entre el P y los grupos hidroxilo 3'-OH o 5'-OH.⁵¹

El proceso de escisión llevado a cabo por las nucleasas deriva de su naturaleza como metaloenzimas, actuando los metales de sus centros activos como ácidos de Lewis. El mecanismo comúnmente aceptado conlleva el ataque nucleofílico del grupo fosfato, generándose en el estado de transición un fosforano, en el que el nucleófilo y el grupo saliente ocupan posiciones axiales, con la subsiguiente escisión del enlace entre el grupo 3'-OH o 5'-OH y el grupo fosfato, dando lugar a grupos terminales 5'-fosforilo o 3'-fosforilo respectivamente (*esquema 4.3*).⁵²



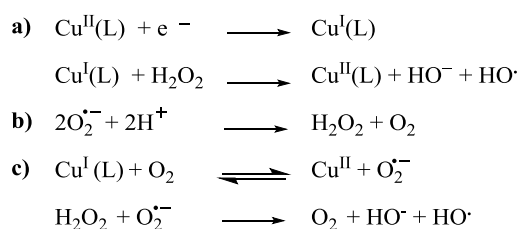
Esquema 4.3. Mecanismo de escisión hidrolítica de ADN. Propuesto por Mancin *et al.*⁵² y Williams *et al.*⁵³ R: desoxinucleótido.

La precisa capacidad de escisión de las nucleasas naturales y el mayor conocimiento de los aspectos mecanísticos por los cuales se rige han despertado gran interés en el desarrollo de metalonucleasas artificiales con distintas aplicaciones. Así, en los últimos años, se han desarrollado numerosos complejos de metales divalentes con actividad nucleasa, como agentes antitumorales y antibacterianos. Entre los diferentes tipos de compuestos empleados como ligandos de coordinación, las sulfonamidas *N*-sustituidas son uno de los más estudiados. Estas actúan, en su estado desprotonado, como ligandos bidentados por coordinación a través del nitrógeno del grupo sulfonamido y a través del sustituyente, generalmente un sistema heterocíclico, formando complejos diméricos o ternarios, los cuales proporcionan las condiciones apropiadas, como el entorno hidrofóbico y estado de coordinación, para facilitar la reactividad del metal y el reconocimiento de sustrato, en este caso el ADN.⁵⁴

Las metalonucleasas artificiales provocan la escisión del ADN, principalmente, por medio de dos mecanismos, un mecanismo hidrolítico, al igual que las enzimas naturales, o mediante un mecanismo oxidativo. En este último, el cobre (II) es uno de los metales más estudiados en el diseño de complejos de sulfonamidas *N*-derivadas, en las cuales se combinan las propiedades redox del centro metálico y del dióxígeno para formar especies reactivas.

A diferencia de las nucleasas hidrolíticas, el mecanismo oxidativo mediado por metalonucleasas requiere la presencia de un agente activante en el medio de reacción, bien un agente oxidante como H₂O₂,⁵⁵ o un agente reductor como el ácido ascórbico.^{54a, 54b, 56} La transferencia de un

electrón desde la forma reducida del metal al O₂ (o su derivado reducido, el H₂O₂) genera una propagación de ROS como superóxido (O₂^{•-}), oxígeno singlete (O₂¹) y radical hidroxilo (HO[•]), por medio de reacciones tipo *Fenton o Haber-Weiss*⁵⁷ (*esquema 4.4*). También pueden formarse especies RMOS (*Reactive metal-oxo species*) como consecuencia de la coordinación del O₂ y/o H₂O₂ a un ion cuproso.⁵⁸



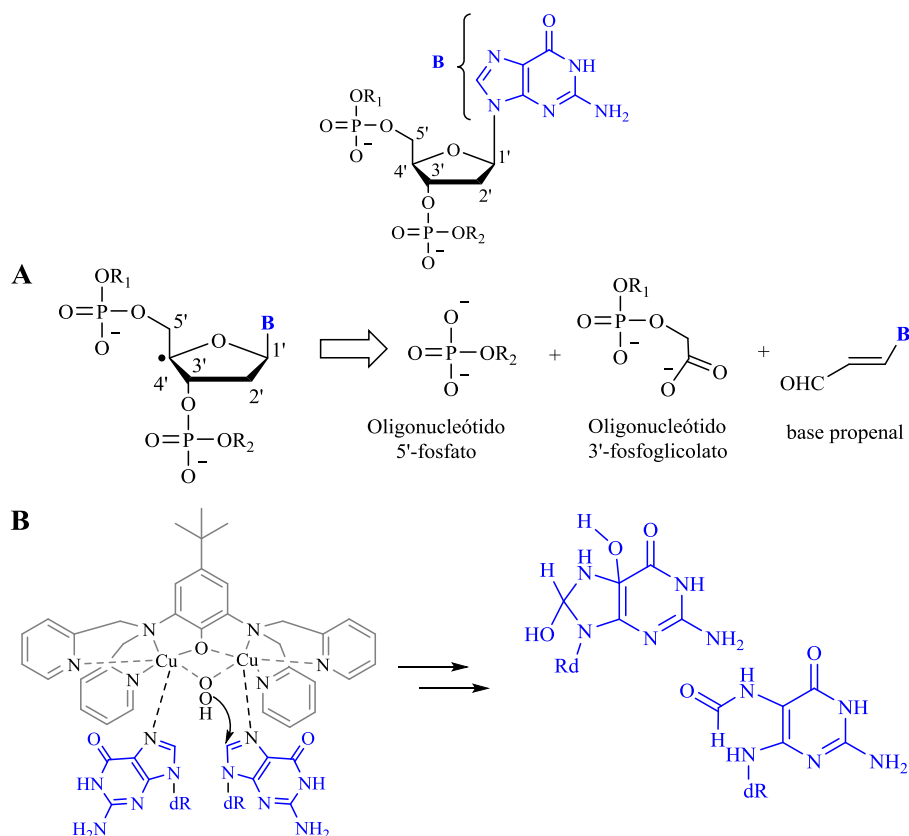
Esquema 4.4. Formación de ROS por reacciones redox a partir de complejos de Cu^{II}, en presencia de un agente reductor, O₂ y/o H₂O₂. **a)** Reacción tipo *Fenton* **b)** Reacción de dismutación. **c)** Reacción de *Haber-Weiss*.

Las especies reactivas ROS/RMOS provocan la escisión del ADN por abstracción de uno de los siete hidrógenos de la desoxirribosa y/o la oxidación de las nucleobases.

En el mecanismo de reacción con la unidad de desoxirribosa, la escisión tiene lugar por abstracción de un hidrógeno específico. El radical resultante adiciona una molécula de oxígeno, resultando en un radical peroxilo que puede atacar a un nuevo nucleótido iniciándose una fase propagación. Los radicales formados por medio de diferentes eliminaciones darán lugar a diferentes intermediarios.⁵⁹ En el *esquema 4.5A* se ejemplifica un patrón de fragmentación del ADN por abstracción del H-4' de la desoxirribosa.

La abstracción del hidrógeno de la desoxirribosa depende de la fuerza del enlace C-H y de la accesibilidad del agente oxidante. Las preferencias de abstracción de los diferentes hidrógenos son del orden C5'>C4'>C2'>C3'>C1'. Los hidrógenos de C1', C4' y C5' son más accesibles a partir de agentes de unión al surco menor del B-DNA, mientras que los hidrógenos de las posiciones C2' y C3' son más accesibles a partir de agentes de unión al surco mayor.

En el caso de la oxidación de las bases nitrogenadas no se produce una escisión directa, sino la formación de sitios abásicos que conducen a la rotura posterior de la doble hebra en condiciones alcalinas o en presencia de luz. Entre las cuatro bases nitrogenadas, la guanina es considerada la base más susceptible por la elevada frecuencia de detección de sus productos de oxidación.⁶⁰ En el *esquema 4.5B* se ejemplifica un mecanismo de reconocimiento de la guanina por RMOS y sus productos de oxidación.



Esquema 4.5. Mecanismos oxidativos de escisión de ADN. Modificado de Jiang y col.⁶⁰ **A**). Abstracción del hidrógeno 4' de la desoxirribosa; mecanismo propuesto por Pogozelski y col.⁵⁹ **B**). Modificación oxidativa de la guanina por un complejo dinuclear de Cu^{II}; mecanismo propuesto por Li y col.⁶¹

En un trabajo anterior de nuestro grupo investigación se describe la capacidad de interacción del derivado **S2b**, sulfonamida con actividad *in vitro* e *in vivo* frente a *L. infantum*, con ctDNA (*calf thymus DNA*). Los estudios de desnaturalización térmica y viscosimetría determinaron que la sulfonamida no interaccionaba con el ctDNA, sin embargo, se observó que presentaba actividad nucleasa en presencia de Cu^{II} y un agente reductor como el ácido ascórbico.²

En el presente trabajo nos propusimos determinar la actividad nucleasa de las sulfonamidas **S3b** y **S4f** que habían mostrado una actividad interesante *in vitro* frente a *Leishmania spp.* y *T. cruzi*. Adicionalmente, identificamos las especies radicalarias implicadas en el proceso de escisión y la selectividad en la unión al ADN, tanto de la sulfonamida **S2b**, como de **S3b** y **S4f**.

Los diferentes estudios fueron realizados por la Dra. Marta González en la Universidad Miguel Hernández de Elche.

La actividad de los sulfonamidas **S3b** y **S4f** como metalonucleasas fue evaluada en función de la migración de ADN plasmídico (pUC18) en tampón cacodilato 0.1 M (pH = 6), mediante electroforesis en gel de agarosa, de acuerdo al protocolo previamente descrito.²

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN covalentemente cerradas. La escisión de una sus hebras provoca una disminución de la tensión de superenrollamiento, pasando de la forma superenrollada (*forma I*) a una conformación circular más relajada (*forma II*), que puede pasar a su forma lineal (*forma III*) tras la escisión de las dos hebras. La diferente migración de estas tres conformaciones en geles de agarosa permite determinar la capacidad de generación de ROS. La forma I superenrollada migrará más rápidamente que la forma II más relajada, mientras que la forma III migrará en una posición intermedia a ambas (*figura 4.37*).⁶²

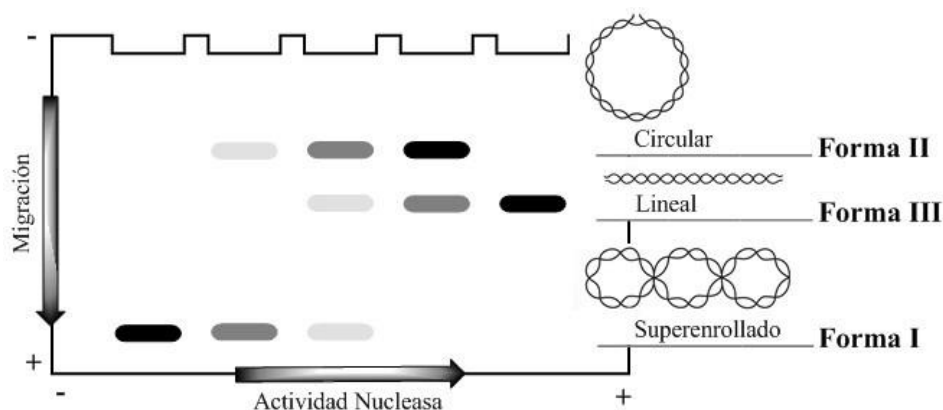


Figura 4.37. Conformaciones plasmídicas y su migración electroforética en geles de agarosa en los estudios de actividad nucleasa.

En un primer estudio se evaluaron las sulfonamidas **S3b** y **S4f** en ausencia de Cu^{II} , en un rango de concentraciones de $30 \mu\text{M}$ a $60 \mu\text{M}$. Como se observa en la *figura 4.38* los compuestos **S3b** y **S4f** no presentaron actividad nucleasa a las concentraciones ensayadas.

Considerando que previamente habíamos demostrado la actividad nucleasa de la sulfonamida **S2b** en presencia de Cu^{II} , evaluamos la capacidad de escisión de las sulfonamidas **S3b** y **S4f** en las mismas condiciones de ensayo. Siguiendo el mismo procedimiento, se incubó el plásmido pUC18 con las respectivas sulfonamidas a dos concentraciones, 15 y $45 \mu\text{M}$, en presencia de CuCl_2 a una relación molar 1:1 y un agente reductor en exceso, en este caso ácido ascórbico. Como control positivo se incluyó el complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, uno de los primeros complejos de cobre reconocido como nucleasa artificial.⁶³ Tras una hora de incubación las diferentes mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa ($0,8 \%$) en tampón TBE durante 1h a 80 v.

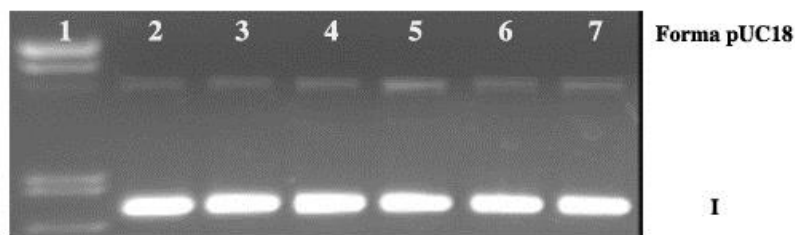


Figura 4.38. Gel de agarosa representativo de la migración electroforética del plásmido pUC18 incubado con las sulfonamidas **S3b**, **S4f** y ácido ascórbico. Tiempo de incubación 60 min (37 °C). **1:** Marcador λ ADN/EcoRI+HindIII; **2:** Control_1 plásmido pUC18; **3:** Control_2 (plásmido pUC18 + ácido ascórbico); **4:** **S3b** 30 μ M; **5:** **S3b** 60 μ M; **6:** **S4f** 30 μ M; **7:** **S4f** 60 μ M.

Como se muestra en la *figura 4.39*, ambas sulfonamidas presentaron actividad nucleasa, aunque con diferente eficiencia. La sulfonamida **S3b** a 15 μ M fue capaz de escindir sólo una fracción del plásmido superenrollado (*carrera 5*). Sin embargo, al aumentar la concentración a 45 μ M se observó una degradación completa de la forma I superenrollada a las formas II y III, circular relajada y lineal (*carrera 6*).

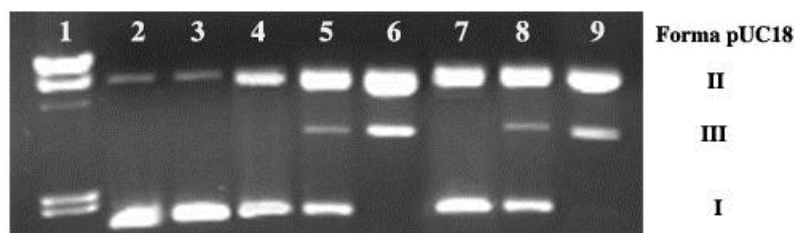


Figura 4.39. Gel de agarosa representativo de la migración electroforética del plásmido pUC18 incubado con las sulfonamidas **S3b**, **S4f**, en presencia de CuCl_2 (1:1) y ácido ascórbico en exceso. Tiempo de incubación 60 min (37 °C). **1:** Marcador λ ADN/EcoRI+HindIII; **2:** Control_1 plásmido pUC18; **3:** Control_2 (plásmido pUC18 + ácido ascórbico); **4:** CuCl_2 45 μ M; **5:** **S3b** 15 μ M; **6:** **S3b** 45 μ M; **7:** **S4f** 15 μ M; **8:** **S4f** 45 μ M; **9:** $\text{Cu}[(\text{phen})]^{2+}$ 15 μ M.

La actividad nucleasa de la sulfonamida **S4f** fue menor. A una concentración de 15 μ M sólo una pequeña cantidad de plásmido fue escindido a la forma circular relajada, prácticamente inapreciable (*carrera 7*). Aunque se observó una mayor actividad a una concentración de 45 μ M, no se escindió completamente, coexistiendo por tanto las tres formas (*carrera 8*). No obstante, la actividad observada para ambos compuestos fue mayor que las sales de cobre en las mismas condiciones (comparar *carreras 6 y 8* con *carrera 4*). En consecuencia, los compuestos **S3b** y **S4f** pueden ser considerados como nucleasas químicas en las condiciones de ensayo *in vitro* en presencia de Cu^{II} y un agente reductor, análogamente a los resultados obtenidos previamente con la sulfonamida **S2b**.²

Posteriormente, realizamos nuevos ensayos para elucidar determinados aspectos del mecanismo de escisión, concretamente, si es coincidente con un mecanismo oxidativo con la formación de radical hidroxilo, oxígeno singlete y superóxido. La metodología utilizada para su identificación consistió en observar la ausencia de escisión del ADN en presencia de agentes captadores de radicales o *scavengers*, que bloquean la fase propagación por reacción con algunas de estas especies radicalarias.

Como se observa en la *figura 4.40*, la adición de DMSO y *tert*-butanol (*carreras 5 y 6*), captadores de radicales HO[•], de 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (*carrera 7*), captador de especies O₂^{•-} y Tiron (*carrera 9*), agente captador típico de O₂^{•-}, inhibieron la escisión del ADN por los tres compuestos, **S2b**, **S3b** y **S4f**. Por tanto, en base a estos resultados podríamos afirmar que las tres especies están implicadas en el proceso de escisión.

Curiosamente, la inhibición en presencia de la enzima SOD (*carrera 8*) no resultó con la misma eficiencia. La formación de O₂^{•-} como especie radicalaria implicada en el proceso de escisión, de acuerdo a los resultados obtenidos en presencia de Tiron, sólo pudo confirmarse con la incubación de las sulfonamidas **S2b** y **S4f**. Contrariamente, la adición de SOD no presentó ningún efecto aparente en la escisión mediada por **S3b**, por lo que, como se describe en otros procesos oxidativos mediados por complejos de cobre,⁶⁴ puede considerarse que el anión O₂^{•-} no es la especie activa en el mecanismo de escisión oxidativo mediado por **S3b**; si bien, no puede descartarse su generación, posterior dismutación en H₂O₂ y formación de radical HO[•], el cual parece ser requerido para la escisión del ADN. Además, la presencia de neocuproína, agente quelante de Cu^I, en la mezcla de reacción, también inhibió la actividad nucleasa de las tres sulfonamidas (*carrera 10*), confirmando, por tanto, que la re-oxidación de Cu^I a Cu^{II}, proceso que genera radicales O₂^{•-}, es necesaria para la escisión del ADN.

La actividad nucleasa de **S2b**, **S3b** y **S4f** en presencia de CuCl₂ implicaría la formación de un complejo de coordinación de la sulfonamida con el Cu^{II} de relativa estabilidad y afinidad por el ADN. Para poder actuar como metalonucleasas, el paso previo y necesario en la escisión oxidativa es la unión de este complejo al ADN. Por ello, determinamos a continuación si estas sulfonamidas con actividad nucleasa en presencia de Cu^{II} presentaban selectividad de unión al ADN en las condiciones ensayadas.

Como esta ha descrito en la bibliografía, la interacción de compuestos orgánicos o sus complejos con el ADN puede producirse mediante enlaces no covalentes, como (i) su intercalación entre pares de bases por interacciones π -stacking, (ii) su unión al surco mayor y/o menor por interacciones electrostáticas o establecimiento de puentes de hidrógeno; o (iii) por la formación de enlaces covalentes mediante la coordinación del metal con los nitrógenos de las bases nitrogenadas o grupos fosfatos.⁶⁵

En nuestro caso, estudiamos la selectividad de las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S4f**-Cu^{II} (1:1) en su unión a los surcos mayor y menor del ADN. El procedimiento se llevó a cabo por inclusión en la mezcla de reacción de distamicina (oligopéptido con capacidad para unirse preferentemente al surco menor del ADN) o el verde de metilo (unión a través del surco mayor) (*figura 4.40*). Como se observa en las *carreras 11 y 12*, mientras **S3b**-Cu^{II} se unió exclusivamente al surco menor (*carrera 12*), las sulfonamidas **S2b** y **S4f**-Cu^{II} se unieron al surco mayor o a ambos surcos.

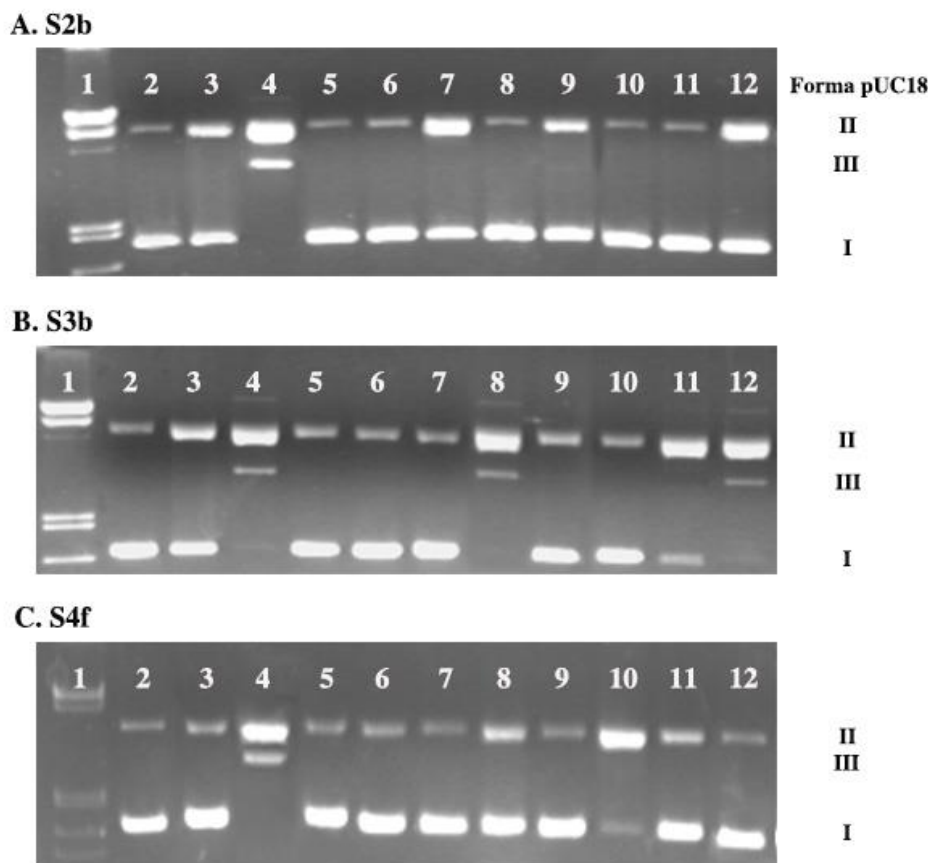
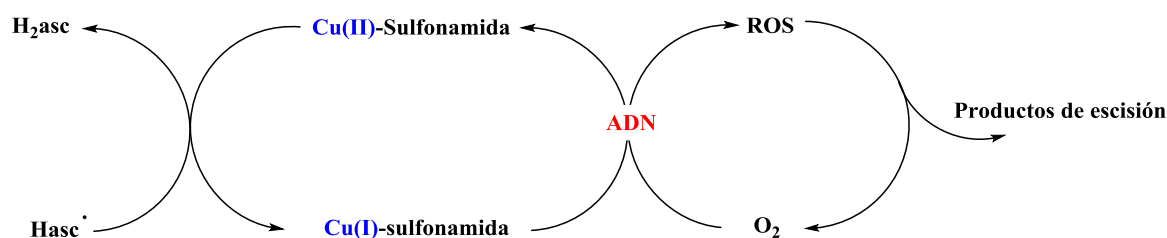


Figura 4.40. Gel de agarosa representativo de la migración electroforética del plásmido pUC18 incubado con las sulfonamidas **S2b** (A), **S3b** (B) y **S4f** (C) (45 μ M) en presencia de ácido ascórbico, CuCl_2 y agentes captadores de ROS. Tiempo de incubación: 1h (37°C). 1: Marcador λ ADN/EcoR1+HindIII; 2: Control_1 plásmido pUC18; 3: Control_2 (plásmido pUC18 + ácido ascórbico); 4: Compuesto; 5: Compuesto + DMSO (1 M); 6: Compuesto + *tert*-butanol (1 M); 7: Compuesto + 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (100 mM); 8: Compuesto + SOD (15 unidades); 9: Compuesto + Tiron (0.4 M); 10: Compuesto + neocuproína (1 mM); 11: Compuesto + distamicina (8 μ M); 12: Compuesto + verde de metilo (0.00125 mg/mL).

El análisis de los resultados expuestos nos ha llevado a establecer la siguiente sucesión de eventos que definen la actividad nucleasa de las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S4f**, por medio de un mecanismo oxidativo en presencia de Cu^{II} (*esquema 4.6*):

1. Las sulfonamidas, que por sí solas no presenta actividad nucleasa, en presencia de Cu^{II} presentan mayor actividad que la misma concentración de sales de cobre en ausencia de compuesto. Esta propiedad implicaría la unión del complejo sulfonamida- Cu^{II} en el surco menor para el complejo **S3b**- Cu^{II} y en ambos surcos (mayor y/o menor) para **S2b**- Cu^{II} y **S4f**- Cu^{II} .
2. El Cu^{II} se reduciría a Cu^{I} , en presencia del exceso de ácido ascórbico, produciendo la activación del dioxígeno y generando especies ROS.

- Entre las diferentes ROS intermediarias obtenidas por reacciones tipo *Fenton* y *Haber-Weiss* se formarían los radicales: HO[•], O₂^{•-} y O₂¹.
- De acuerdo a este mecanismo oxidativo de las metonucleasas, las especies reactivas producirían la escisión del ADN por abstracción de uno de los hidrógenos de las desoxirribosas o modificación de las bases nitrogenadas.



Esquema 4.6. Mecanismo de escisión del ADN propuesto para las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S4f** en presencia de Cu^{II}. Modificado de García-Giménez y col.^{54a}

El mecanismo de acción nucleasa propuesto para justificar la actividad antiparasitaria de las sulfonamidas implicaría la formación del complejo sulfonamida-Cu^{II} en el interior del parásito.

Aunque el Cu^{II} es el tercer metal de transición más abundante en organismos, por detrás del Zn^{II} y el Fe^{II}, se encuentra mayoritariamente formando parte de los centros activos de, al menos, la mitad de las metaloenzimas, siendo los niveles de Cu^{II} libres en el organismo relativamente bajos.⁶⁶

El cobre, junto con el zinc, es un micronutriente esencial en las infecciones producidas, tanto por bacterias como protozoos, debido a su implicación en el desarrollo de la respuesta inmune. Diferentes estudios demuestran que el cobre regula la función antimicrobiana en los macrófagos, contribuyendo a la actividad bactericida por generación de ROS, mediada por reacciones *tipo Fenton* en el interior de los fagolisosomas.⁶⁷

Ante una infección bacteriana, la activación de citoquinas IFN- γ y TNF- α en el macrófago aumenta la expresión de los transportadores de Cu^{II}, tanto de la membrana plasmática como del fagolisosoma, por medio de un proceso altamente regulado a nivel génico, cuyo resultado es un aumento de los niveles de Cu^{II} específicamente en el interior del fagolisosoma,⁶⁸ en contraposición a una mayor exclusión de Fe^{II} y Mn^{II}.⁶⁹

Se ha demostrado que, a partir de este mecanismo homeostático en los fagolisosomas, diversos compuestos antibacterianos actúan mediante un mecanismo dependiente de la quelación de cobre intracelular, u otros mecanismos donde el cobre potencia la actividad antimicrobiana.⁷⁰

La relevancia de la actividad nucleasa de las sulfonamidas antiparasitarias **S2b**, **S3b** y **S4f**, considerando su capacidad de actuar como metalonucleasas en presencia de Cu^{II}, podría residir en las formas intracelulares de estos kinetoplástidos como un mecanismo de acción adicional por el cual actúan en las formas promastigotes. No obstante, debería confirmarse la causa de la disminución de su

actividad en las formas intracelulares, la concentración que alcanzan en el interior del fagolisosoma, y su coordinación con Cu^{II} en las condiciones *in vivo*.

Los resultados obtenidos en este primer estudio de evaluación antiparasitaria de las sulfonamidas de las series **S1-S5**, **S7**, **S10** y **S21**, sustentan la consideración como cabeza de serie a la sulfonamida **S2b**, por su actividad *in vitro* frente a *Leishmania* spp. e *in vivo* frente a *L. infantum*. Su similitud estructural con las sulfonamidas **S3a** y **S7a**, ambas activas en las formas epimastigotes de *T. cruzi*, por la presencia de un anillo bencénico sustituido en posición *para*- por un grupo NO₂, pone de manifiesto la relevancia terapéutica descrita de los compuestos nitroderivados en el tratamiento de estas parasitosis, por lo que, en estudios posteriores podría analizarse la nitrorreducción selectiva en tripanosomátidos como potencial mecanismo de acción.

4.2.2. Actividad antiparasitaria de las sulfonamidas de las series S2-4, S6, S8, S10-16 y S24-26

Una vez estudiada la actividad leishmanicida y tripanocida de las sulfonamidas de las series **S1a-c**, **S2(a-g; j-l)**, **S3(a, b, d)**, **S4(b-h)**, **S5(a, b, d)**, **S7a**, **S10b** y **S21 (a, b, d)**, de acuerdo a nuestro plan de trabajo, ajustado a un esquema de ciclos sucesivos de diseño, síntesis, evaluación, estudios de REA y reorientación de los objetivos sintéticos, aumentamos las variaciones moleculares a partir del cabeza de serie o prototipo, la sulfonamida **S2b**, con actividad leishmanicida *in vivo* frente a *L. infantum*.

Las variaciones consideradas en los dominios de diversidad estructural del cabeza de serie **S2b**, no sólo incluyen al dominio **D1**, por introducción de nuevos anillos benzofusionados, heterocíclicos o saturados, sino también al anillo bencénico *para*-sustituido (**D2**) (figura 4.41).

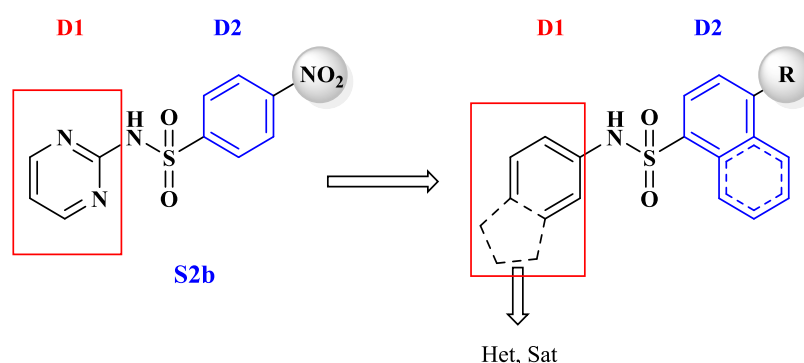
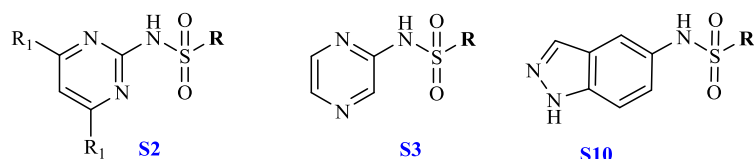


Figura 4.41. Variaciones moleculares introducidas en los dominios de diversidad estructural de la sulfonamida **S2b**. **Het:** Heterociclo. **Sat:** Saturado.

A continuación, se detallan las modificaciones estructurales realizadas en **D2**, en las series previamente establecidas **S2-4** y **S10** y, en **D1**, en la serie **S5**, así como las diez nuevas series sintetizadas con la introducción de diferentes heterociclos en **D1**.

Los nuevos análogos estructurales en las series previamente establecidas se indican con distinta tipografía.

- Modificaciones en **D2** de las sulfonamidas de las series **S2**, **S3** y **S10**. Los anillos bencénicos *para*-sustituidos de los derivados previamente estudiados (**S2**, **S3**, y **S10**) se sustituyeron por otros grupos electrón-atrayentes como $-\text{CN}$ y $-\text{F}$. Esta modificación estructural permite determinar la influencia de la sustitución en posición *para* por grupos o átomos de diferente tamaño o electronegatividad. De tal manera que la serie quede determinada por, al menos, la *para*-sustitución de $-\text{H}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$ o $-\text{CN}$. Además, el anillo bencénico se sustituyó por su homólogo benzofusionado, un grupo naftaleno.

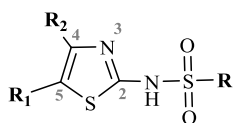


S2a R = Ph R₁ = H
S2b R = 4-NO₂Ph R₁ = H
S2c R = 3-NO₂Ph R₁ = H
S2d R = 2-NO₂Ph R₁ = H
S2e R = 4-OCH₃Ph R₁ = H
S2f R = 4-FPh R₁ = H
S2g R = 4-ClPh R₁ = H
S2h R = 4-CNPh R₁ = H
S2i R = Naftilo R₁ = H
S2j R = CH₃ R₁ = H
S2k R = 4-NO₂Ph R₁ = CH₃
S2l R = 4-ClPh R₁ = CH₃

S3a R = Ph
S3b R = 4-NO₂Ph
S3c R = 4-FPh
S3d R = 4-ClPh
S3e R = 4-CNPh
S3f R = Naftilo

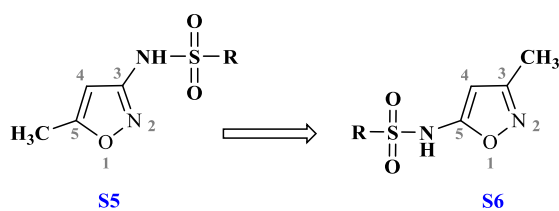
S10a R = Ph
S10b R = 4-NO₂Ph
S10c R = 4-FPh
S10d R = 4-ClPh
S10e R = Naftilo

- b) Modificaciones en **D1** y **D2** de la sulfonamida **S4f**. Se incluyeron análogos estructurales del derivado **S4f**, uno de los compuestos más activos *in vitro* frente a *Leishmania* spp: la benzenosulfonamida **S4a**, por la eliminación del sustituyente *para*-cloro de **S4f** y las benzenosulfonamidas **S4g** y **S4i**, en las cuales se llevó a cabo un cambio de la posición del sustituyente metilo, de la posición 5 del anillo de tiazol en **S4f** a la posición 4.

**S4**

S4a R = Ph R₁ = H R₂ = H
S4b R = 4-NO₂Ph R₁ = H R₂ = H
S4c R = 4-ClPh R₁ = H R₂ = H
S4d R = Ph R₁ = CH₃ R₂ = H
S4e R = 4-NO₂Ph R₁ = CH₃ R₂ = H
S4f R = 4-ClPh R₁ = CH₃ R₂ = H
S4g R = Ph R₁ = H R₂ = CH₃
S4h R = 4-NO₂Ph R₁ = H R₂ = CH₃
S4i R = 4-ClPh R₁ = H R₂ = CH₃

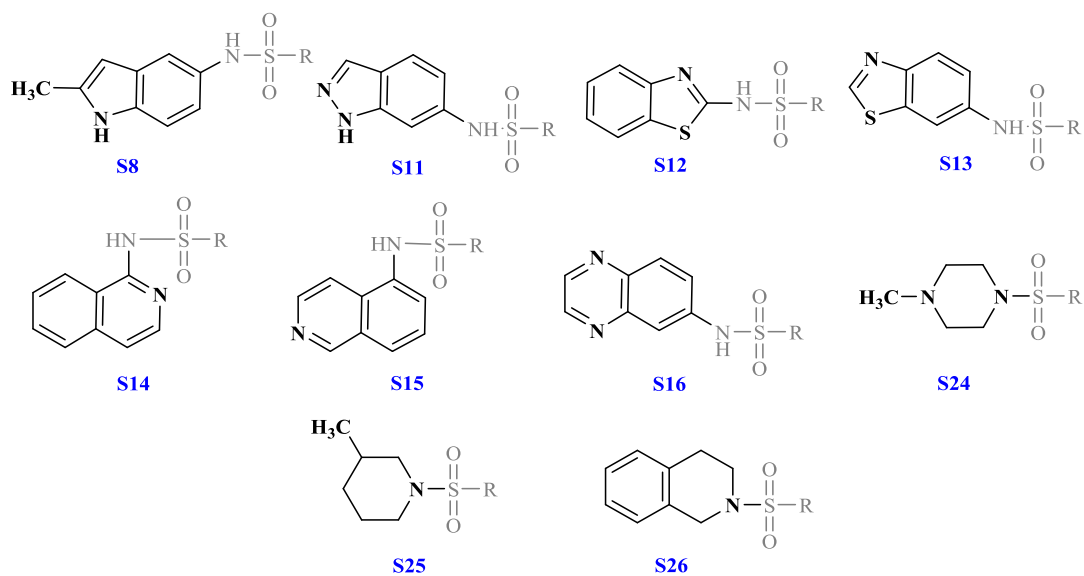
- c) Modificaciones en **D1** de los derivados de la serie **S5**. En los tres derivados de la serie **S5** (**a**, **b** y **d**) se modificó la regioquímica mediante un intercambio de los sustituyentes en las posiciones 3 y 5 del anillo de isoxazol, asignándose como serie **S6** los análogos correspondientes.



S5a R = Ph
S5b R = 4-NO₂Ph
S5d R = 4-ClPh

S6a R = Ph
S6b R = 4-NO₂Ph
S6d R = 4-ClPh

- d) Modificaciones en **D1**. Se introducen diferentes anillos benzofusionados, heterocíclicos o saturados, o anillos monocíclicos saturados y se mantiene en **D2** la *para*-sustitución de las bencenosulfonamidas con grupos electrón-atrayentes como -NO₂, -Cl, y en ocasiones -F, o un grupo naftaleno.



La totalidad de los nuevos derivados evaluados en este estudio se incluyen en la *figura 4.42*. Con fines comparativos, se introducen las estructuras y los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* frente a *Leishmania* spp. y *T. cruzi*, de los derivados **S2b**, **S3b**, **S4b**, **S4g**, **S5a-b**, **S5d** y **S10b**.

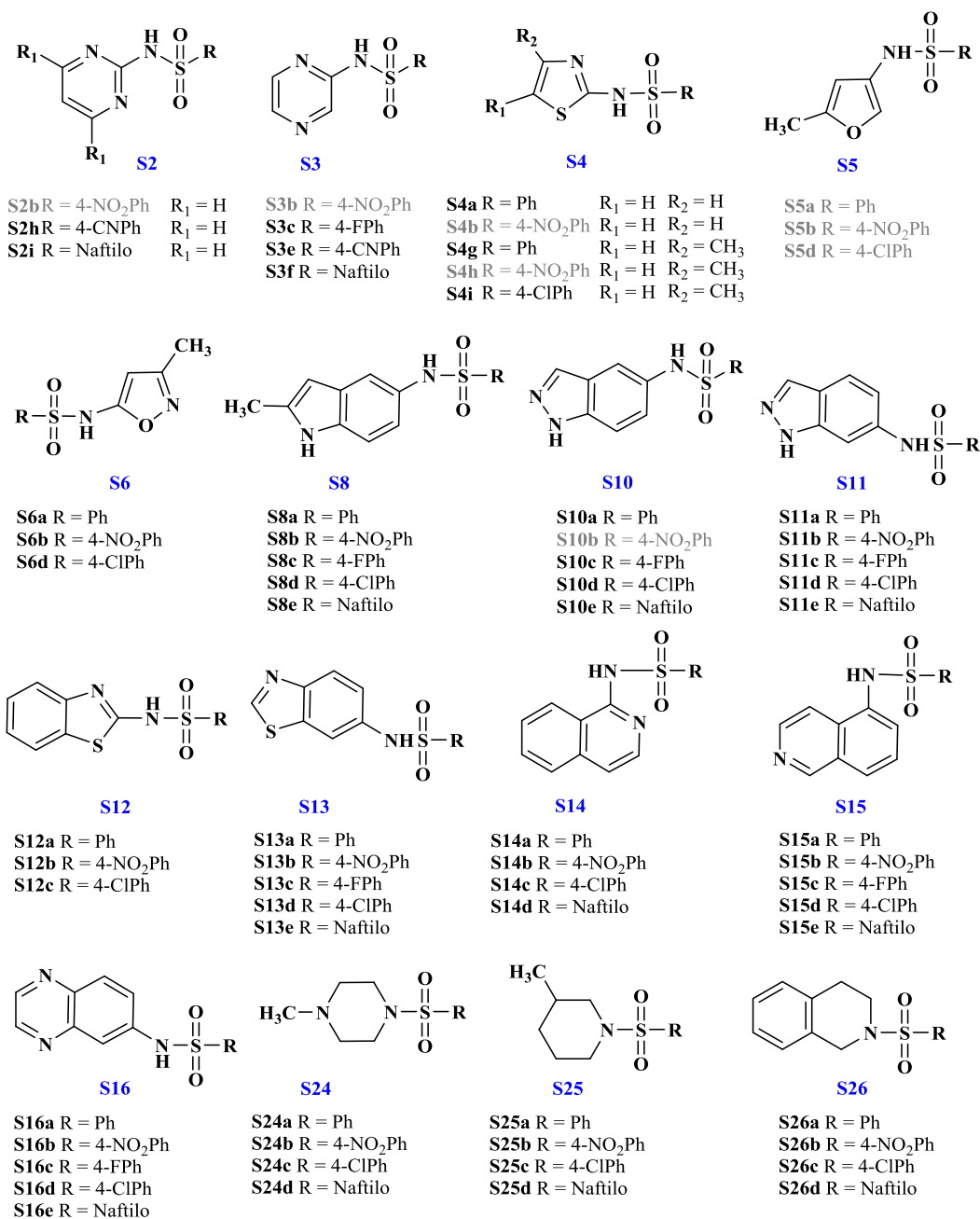


Figura 4.42. Estructura de los nuevos derivados de sulfonamidas de las series S2-4, S6, S8, S10-16 y S24-26 evaluados en el segundo cribado de selección frente a formas extracelulares de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*.

4.2.2.1. Evaluación frente a promastigotes de *Leishmania* spp. y epimastigotes de *T. cruzi*

La evaluación antiparasitaria *in vitro* de esta nueva serie de derivados se realizó siguiendo el mismo procedimiento y metodología de trabajo que en los estudios anteriores, así como los diferentes aislados de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*, a excepción de la introducción de una nueva línea celular de fibroblastos de ratón, NCTC292, para evaluar la citotoxicidad de los diferentes compuestos, adicionalmente a la línea de macrófagos J774.

Los resultados de actividad de las sulfonamidas frente a formas extracelulares de *Leishmania* spp y *T. cruzi* se presentan en la *tabla 4.18*. A modo de simplificación se excluyen aquellos compuestos que no presentaron actividad.

Si analizamos los valores de IC_{50} obtenidos en este cribado de selección frente a formas promastigotes, observamos que de los 61 derivados evaluados, 24 presentaron relativa actividad, en un amplio rango de valores de IC_{50} . No obstante, considerando los índices de selectividad (IS) frente a estos estadios respecto a su toxicidad en macrófagos J774 (*tabla 4.19*), como parámetro o coeficiente de eficacia según las recomendaciones del DNDi ($IS \geq 10$) o, al menos, superior al fármaco de referencia para las cuatro especies evaluadas, el número de sulfonamidas activas con los mayores IS resultaron ser los compuestos: **S8a** ($IC_{50} = 15.4-29$, $IS > 12-22.7$), **S10a** ($IC_{50} = 37.3-47.9$, $IS > 7.5-9.6$), **S13a** ($IC_{50} = 23.7-82.3$, $IS > 74.2-18.7$), **S15e** ($IC_{50} = 15.8-20.3$, $IS > 14.6-17.2$) y **S25d** ($IC_{50} = 6.7-24.6$, $IS > 13.4-49.2$), siendo esta última la sulfonamida que presentó los mayores IS, superiores a la Miltefosina, en todas las especies de *Leishmania*.

En cuanto a la eficacia en las formas extracelulares de *T. cruzi*, al igual que en el estudio anterior, un menor número de sulfonamidas presentó actividad en comparación con *Leishmania* spp. Así, además de las sulfonamidas correspondientes al primer estudio **S2b** y **S3b**, se identificaron como compuestos activos las sulfonamidas **S11c**, **S11d**, **S14b** y **S15e**, coincidentes en su actividad leishmanicida. La sulfonamida **S26d** resulto ser la única sulfonamida identificada con actividad exclusiva frente *T. cruzi*. De entre estas sulfonamidas, de eficacia relativa frente a formas epimastigotes en *T. cruzi*, fue la sulfonamida **S11c** la que presentó un menor IC_{50} (1.3 μ M) alcanzándose un IS muy superior al Benznidazol ($IS_{(S11c)} = 171.5$, $IS_{(B)} = 3.5$).

C ^a	IC ₅₀ ^b (µM)					CC ₅₀ ^c (µM)	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>	J774	NCTC292
S2b	76.4	48.8	46.4	68.6	156.1	NC ^d	ND ^e
S3b	66.2	61.5	84.2	NA	76.1	NC	317
S8a	23.4	29	20.9	15.4	NA	NC	ND
S8b	35.2	16.8	19.6	15.8	ND	132	ND
S8c	34.5	42.7	116.6	12.5	ND	40.4	ND
S8d	12.4	23	10.4	18.2	ND	194.8	ND
S8e	11.9	11.6	13.6	7.4	ND	24.6	ND
S10a	37.3	40.3	47.9	38.7	NA	NC	ND
S10b	61.3	80.8	139.6	66.7	ND	132.9	ND
S10c	65.4	86.6	101.9	115.7	NA	NC	ND
S10e	37.3	39.7	52.8	37.7	ND	30	ND
S11b	43.3	21.7	48.1	60.3	NA	NC	ND
S11c	94.8	88.8	96.3	107.9	1.3	NC	223
S11d	43.5	35.6	46.1	59.1	25.9	NC	211
S13a	18.4	30.6	23.7	82.6	NA	NC	ND
S13b	85.5	31	53.7	89.6	NA	NC	ND
S14a	NA	162.1	93.5	93.5	ND	NC	ND
S14b	39.5	42.5	24.6	27	136.3	41.3	ND
S14c	51.4	37	4.3	82.8	NA	NC	ND
S15d	21	29.8	22.6	8.4	ND	60.8	ND
S15e	20.3	23	15.8	24.5	97.6	NC	187
S16b	81.7	60.8	101.4	197.7	NA	NC	ND
S16c	33.4	13.4	29.8	14.2	ND	43.9	ND
S16d	51.5	80.9	25.9	46.2	ND	23.8	ND
S25a	112.4	115.3	54.3	40.9	NA	NC	ND
S25d	6.7	9.9	7.2	24.6	NA	NC	ND
S26d	NA	NA	NA	NA	113.7	NC	>310
M ^f	17.7	17.7	19.4	30.7	—	135.9	ND
B ^g	—	—	—	—	54.7	NC	>194

Tabla 4.18. Susceptibilidad de las formas promastigotes de *Leishmania* spp. y epimastigotes de *T. cruzi* frente a las sulfonamidas evaluadas de las series S2, S3, S8, S10, S11, S13, S14, S15, S16, S25 y S26.C: Compuesto; ^aC: Compuesto; ^bIC₅₀: concentración de compuesto que produce una reducción de la viabilidad celular de un 50% respecto al cultivo no tratado; ^cCC₅₀: concentración citotóxica media; ^dNC: No Citotóxico (CC₅₀ >256 µM); ^eND: No Determinado; ^fM: Miltefosina; ^gB: Benznidazol.

C ^a	IS ^b				
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>
S2b	> 4.7	> 7.3	> 7.7	> 5.2	ND ^c
S3b	> 5.8	> 5.8	> 4.2	ND	4.2
S8a	> 14.9	> 12.0	> 16.7	> 22.7	ND
S8b	0.6	1.3	1.1	1.4	ND
S8c	1.2	0.9	0.3	3.2	ND
S8d	15.7	8.5	18.7	10.7	ND
S8e	2.1	2.1	1.8	3.3	ND
S10a	>9.6	>8.9	>7.5	>9.2	ND
S10b	2.5	1.9	1.1	2.3	ND
S10c	>5.3	>4.0	>3.4	>3.0	ND
S10e	0.8	0.8	0.6	0.8	ND
S11b	> 7.3	> 14.5	> 6.5	> 5.2	ND
S11c	> 3.6	> 3.9	> 3.6	> 3.2	171.5
S11d	> 7.5	> 9.1	> 7.0	> 5.5	8.1
S13a	> 18.7	> 11.3	> 14.5	> 4.2	ND
S13b	> 3.5	> 9.6	> 5.6	> 3.3	ND
S14a	ND	> 2.2	> 3.8	> 3.8	ND
S14b	1.0	1.0	1.7	1.5	ND
S14c	> 6.1	> 8.5	> 73.0	> 3.8	ND
S15d	2.9	2.0	2.7	7.2	ND
S15e	> 17.2	> 15.5	> 22.6	> 14.6	1.9
S16b	> 3.7	> 5.0	> 3.0	> 1.5	ND
S16c	1.3	3.3	1.5	3.1	ND
S16d	0.5	0.3	0.9	0.5	ND
S25a	> 3.7	> 3.6	> 7.7	> 10.2	ND
S25d	> 49.2	> 33.3	> 45.8	> 13.4	ND
S26d	ND	ND	ND	ND	> 2.7
^d M	7.7	7.7	7.0	4.4	-
^e B	ND	ND	ND	ND	3.55

Tabla 4.19. Índices de selectividad de las sulfonamidas evaluadas de las serie **S2, S3, S8, S10, S11, S13, S14, S15, S16, S25** y **S26** con actividad leishmanicida y tripanocida *in vitro* frente a formas extracelulares de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*. ^aC: Compuesto; ^bIS: Índice de selectividad (IS = CC₅₀/IC₅₀); ^cND: No Determinado; ^dM: Miltefosina; ^eB: Benznidazol;

4.2.2.2. Evaluación frente a amastigotes de *L. infantum*, *L. amazonensis* y *T. cruzi*

Dada la eficacia *in vitro* frente a formas promastigotes de *Leishmania* spp. sin presentar citotoxicidad en macrófagos J774, las sulfonamidas **S8a**, **S10a**, **S13a**, **S15e** y **S25d** fueron seleccionadas para su posterior cribado en formas amastigotes de *L. amazonensis* y *L. infantum*. Como se observa en la *tabla 4.20*, si comparamos la eficacia entre las formas extra- e intracelulares para un mismo compuesto se observan tres perfiles de actividad: 1) compuestos activos en formas promastigotes cuya evaluación en formas amastigotes resulta en una pérdida total de actividad a la máxima concentración evaluada (100 µg/mL), correspondiéndose con las sulfonamidas **S3b**, **S11c** y **S11d**; 2) compuestos cuyo IC₅₀ aumenta en las formas intracelulares de una de las dos especies, como las sulfonamidas **S10a** y **S13a** en *L. infantum* y la sulfonamida **S15e** en *L. amazonensis*; y 3) la sulfonamida **S25d**, que presentó valores de IC₅₀ similares en ambas formas parasitarias y especies evaluadas, con IS muy superiores a la Miltefosina (*L. infantum*: IS_(S25d) > 36.1, IS_(M) = 5.7; *L. amazonensis*: IS_(S25d) > 14.2, IS_(M) = 6.5).

Análogamente, los compuestos **S3b**, **S11c**, **S11d** y **S15e** fueron evaluados en un modelo de infección intracelular frente a formas amastigotes de *T. cruzi*. Al igual que en las formas amastigotes de *Leishmania*, se registraron valores inferiores en las formas amastigotes de *T. cruzi*. La excepción fue la sulfonamida **S11d**, la cual además presentó el mayor IS (IS_(S11d) = 17.1).

C ^a	<i>L. infantum</i>		<i>L. amazonensis</i>		<i>T. cruzi</i>	
	IC ₅₀ ^b	IS ^c	IC ₅₀ (µM)	IS	IC ₅₀ (µM)	IS
S3b	88.0	2.9	NA ^d	-	223.7	1.4
S8a	47.3	> 5.4	64.1	> 4.0	NA	-
S10a	83.2	> 3.1	30.8	> 8.3	NA	-
S11c	NA	-	NA	-	28.5	7.8
S11d	NA	-	NA	-	12.35	17.1
S13a	39.2	> 6.53	77.5	> 3.3	NA	-
S15e	23.0	> 11.1	42.9	> 6.0	141.15	1.3
S25d	7.1	> 36.1	18.0	>14.2	NA	-
M^e	23.7	5.7	20.9	6.5	NA	-
B^f	NA		NA		192.1	>1

Tabla 4.20. Actividad *in vitro* e índices de selectividad frente a formas intracelulares de *L. infantum*, *L. amazonensis* y *T. cruzi*. ^aC: Compuesto; ^bIC₅₀: concentración de compuesto que produce una reducción de la viabilidad celular de un 50% respecto al cultivo no tratado; ^cIS: Índice de selectividad (IS = CC₅₀/IC₅₀); ^dNA: No activo a las concentraciones evaluadas; ^eM: Miltefosina; ^fB: Benznidazol.

4.2.2.3. Evaluación *in vivo* en un modelo murino de leishmaniosis visceral

Las sulfonamidas **S8a**, **S10a**, **S13a**, **S15e** y **S25d**, activas *in vitro* con buenos IS, fueron seleccionadas para su evaluación *in vivo* en un modelo murino de leishmaniosis visceral de *L. infantum*, establecido a partir de un inóculo de infección de 10^7 promastigotes en ratones BALB/c. Los estudios fueron realizados por el grupo de investigación de los Dres. Bolás y Dea-Ayuela en la Universidad Complutense de Madrid.

El tratamiento con las sulfonamidas seleccionadas se inició a los 21 días post-infección a una dosis de 5 mg/kg/día por vía intraperitoneal durante 5 días, determinándose la carga parasitaria en hígado y bazo a los 7 días tras finalizar el tratamiento (*tabla 4.21*). Curiosamente, tan solo se alcanzó una reducción de la carga parasitaria de manera significativa, tanto en las formas esplénicas como hepáticas, tras la administración del derivado **S10a**, el cual había presentado un IC_{50} superior, respecto a los otros compuestos evaluados en las formas amastigotes de *L. infantum*. En el caso de las sulfonamidas **S8a** y **S15e** la reducción de la carga parasitaria fue prácticamente nula en ambos órganos. Con las sulfonamidas **S13a** y **S25d** tan sólo se observó una reducción en las formas esplénicas, evidenciándose además, signos de hiperactividad y una reacción cutánea local tras el tratamiento con la sulfonamida **S25d**.

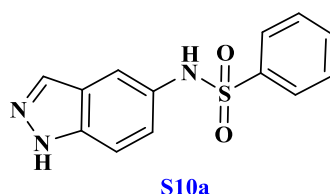
La falta de eficacia *in vivo* de las sulfonamidas **S8a** y **S15e** podría asociarse a diferentes factores farmacocinéticos así como una baja biodisponibilidad por su elevada hidrofilia, su excesiva unión a proteínas plasmáticas o su vía de administración.

La administración intraperitoneal es considerada una vía de administración parenteral; sin embargo, la farmacocinética de compuestos administrados por esta vía puede llegar a ser similar a aquella que se observa tras una administración oral, siendo su biodisponibilidad mucho más baja que la esperada. Los fármacos deben absorberse a través de los vasos mesentéricos, los cuales drenan la vena porta y pasan al hígado. Por tanto, pueden sufrir un paso previo de metabolización hepática antes de alcanzar la circulación sistémica.⁷¹ Una rápida metabolización hepática por las enzimas microsomales que median las reacciones de biotransformación de fase I⁷² podría explicar la reducción específica de la carga parasitaria de las sulfonamidas **S13a** y **S25d** tan sólo en el bazo.

C ^a	% Reducción de la carga parasitaria (media ± SD ^b)	
	Bazo	Hígado
S8a	NS ^c	NS
S10a (5 mg/kg)	55.50 ± 18.53*	78.90 ± 37.10*
S10a (10 mg/kg)	96.34 ± 3.83**	97.57 ± 2.55**
S13a	53.51 ± 67.09	NS
S15e	NS	NS
S25d	80.17 ± 18.53**	NS

Tabla 4.21. Actividad *in vivo* de las sulfonamidas **S8a**, **S10a**, **S13a**, **S15e** y **S25d** en un modelo murino de leishmaniosis visceral de *L. infantum*. ^aC: Compuesto; ^bSD: *Standard deviation*; ^cNS: No supresión de la carga parasitaria. El análisis estadístico U de Mann-Whitney indica diferencias significativas entre el tratamiento y el control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Tras el tratamiento con la sulfonamida **S10a** se alcanzó una reducción de la carga parasitaria del 55.5 % en bazo y del 78.9 % en hígado, por lo que se realizó un ensayo adicional con una posología de 10 mg/Kg/día durante 5 días. A los 7 días post-tratamiento se determinó una reducción de la carga parasitaria muy significativa, tanto en formas esplénicas como hepáticas ($R_{\text{Bazo}} (\%) = 96.34$, $R_{\text{Hígado}} (\%) = 97.57$). Además, el compuesto fue bien tolerado, no observándose efectos adversos como pérdida de peso o alopecia al finalizar el tratamiento. Por lo que la sulfonamida **S10a** puede ser considerada como un nuevo cabeza de serie o prototipo en el tratamiento de la leishmaniosis.



4.2.2.4. Evaluación *in vivo* en un modelo murino de infección aguda de *T. cruzi*

La actividad *in vivo* de las sulfonamidas **S3b**, **S15e**, **S11c** y **S11d**, que habían demostrado eficacia *in vitro* y que no eran citotóxicas, fue evaluada por las Dras. Rolón y Vega en el Centro de Desarrollo para la Investigación Científica (CEDIC) de Paraguay. La evaluación se realizó en un modelo murino de infección aguda en ratones BALB/c de *T. cruzi*, establecido a partir de un inóculo de 10^4 tripomastigotes de la cepa Y. A los 5 días post-infección (dpi), se inició el tratamiento con los diferentes compuestos a una posología de 10 mg/kg/día y de 100 mg/kg/día con Benznidazol durante 5 días consecutivos por vía intraperitoneal.

La parasitemia se determinó a los 8 días post-infección, habiéndose administrado 3 dosis, y a los 10 días post-infección con la administración de 5 dosis. Como se muestra en la *tabla 4.22* y *figura 4.43.A*, la mayor reducción de la parasitemia se alcanzó tras el tratamiento con la sulfonamida **S15e**, tanto a los 8 dpi ($R^8_{(S15e)} = 72\%$) como a los 10 dpi ($R^{10}_{(S15e)} = 60\%$).

El derivado **S3b**, aunque presentó un porcentaje de reducción de la parasitemia mínimo a los 8 dpi, tras la administración de las 5 dosis alcanzó una reducción similar a la producida por el compuesto **S15e**. Curiosamente, los compuestos de la serie **S11** (**S11c** y **S11d**), identificados previamente como las sulfonamidas con menor IC_{50} y elevados IS en las formas intracelulares, y de manera significativa la sulfonamida **S11d**, no resultaron ser activos *in vivo*. Tras la administración de 3 dosis se determinó un aumento de la parasitemia para ambos compuestos, que tan sólo consiguió reducirse posteriormente tras la administración de dos dosis adicionales del compuesto **S11c** ($R^{10}_{(S11c)} = 44\%$).

Por tanto, de las sulfonamidas estudiadas, **S3b**, **S11c**, **S11d** y **S15e**, los mejores resultados *in vivo*, en cuanto a la reducción de la parasitemia a los 10 dpi, se obtuvieron tras el tratamiento con las sulfonamidas **S3b** y **S15e**.

Compuesto	% Reducción de la parasitemia (media \pm SD ^a)	
	8 dpi ^b (3 dosis)	10 dpi (5 dosis)
S3b	14 \pm 7	57 \pm 24
S11c	-50 \pm 20	44 \pm 19
S11d	-10 \pm 25	14 \pm 15
S15e	72 \pm 20	60 \pm 9

Tabla 4.22. Reducción de la parasitemia en un modelo *in vivo* de infección aguda de *T. cruzi* tras el tratamiento con las sulfonamidas **S3b**, **S11c**, **S11d** y **S15e**. ^aSD: *Standard deviation*; ^bdpi: días post-infección.

Por último, se determinó el porcentaje de supervivencia (% S) de los ratones a los 30 días de finalizar el tratamiento. Como se observa en la *figura 4.43.B*, el S (%) obtenido tras el post-tratamiento con la sulfonamida **S15e** se correlacionó con los niveles de parasitemia determinados anteriormente, coincidiendo con el mayor S (%) respecto al grupo control. Por el contrario, la supervivencia tras el post-tratamiento con el nitroderivado **S3b** se redujo drásticamente a partir de los 15 días post-tratamiento, alcanzándose el 0% de supervivientes en tan sólo dos días posteriores. Para los compuestos **S11c** y **S11d**, a pesar de los bajos niveles de parasitemia detectados tras el tratamiento, los porcentajes registrados fueron mayores que para el nitroderivado **S3b**, pero en ningún caso, superiores al control.

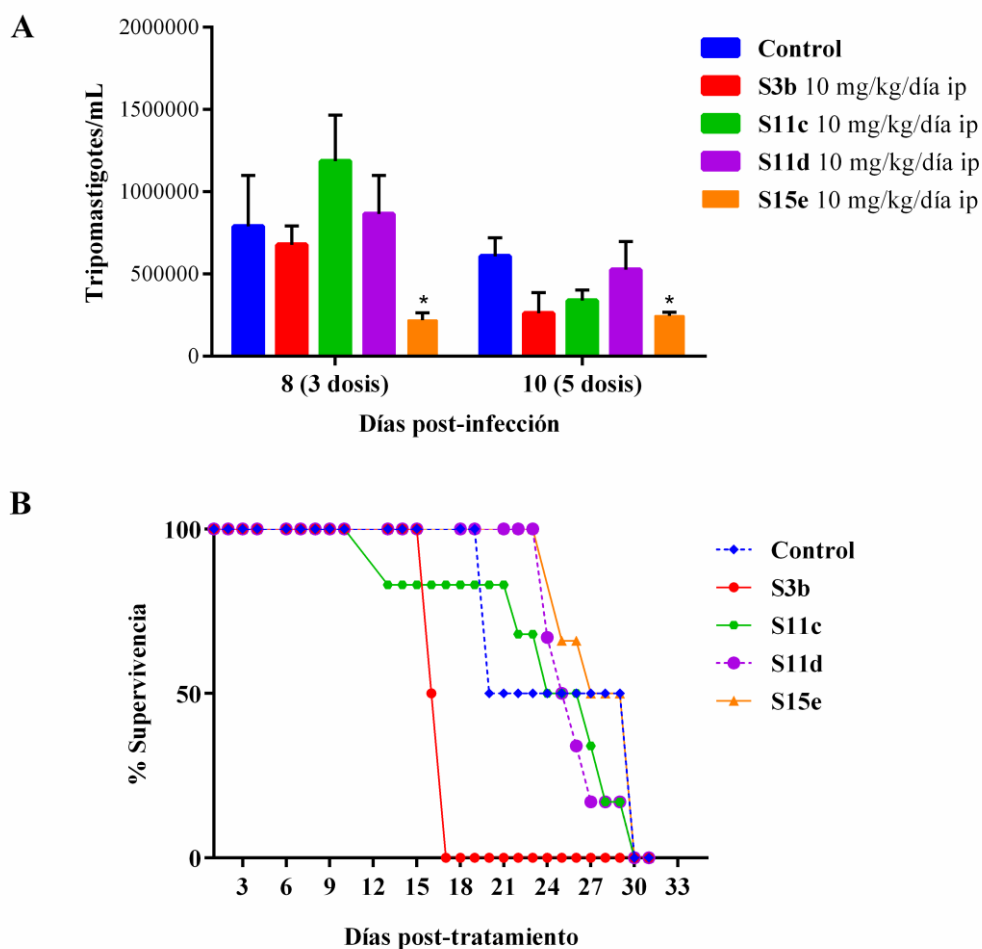
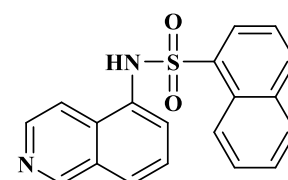


Figura 4.43. Niveles de parasitemia post-infección y porcentaje de supervivencia post-tratamiento con las sulfonamidas **S3b**, **S11c**, **S11d** y **S15e**. **A.** Niveles de parasitemia en el período de infección aguda de ratones BALB/c, establecido con un inóculo de 10^4 tripomastigotes sanguíneos, tras la administración de 3 y 5 dosis de 10 mg/kg/día de los compuestos seleccionados. El análisis estadístico U de Mann-Whitney revela diferencias significativas entre el tratamiento y el control ($p < 0.05$). **B.** Porcentaje de supervivencia de ratones BALB/c a los 30 días post-tratamiento con los compuestos seleccionados.

Los reducidos niveles de parasitemia alcanzados tras la administración intraperitoneal de la sulfonamida **S15e**, a una dosis mucho más inferior que el Benznidazol, proponen a este compuesto como nuevo cabeza serie o prototipo en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.



S15e

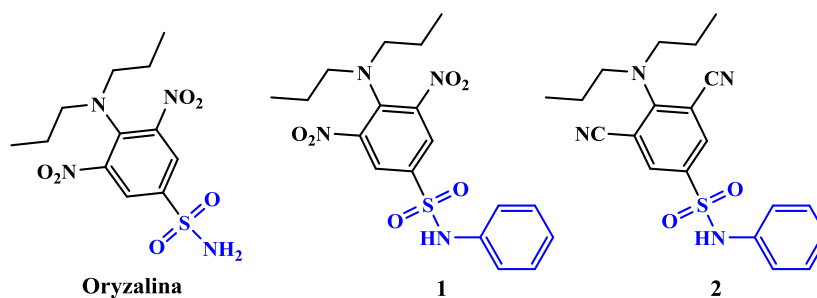
4.2.2.5. Efecto de las sulfonamidas S10a y S25d sobre los microtúbulos de promastigotes de *L. infantum*

La tubulina es una proteína heterodimérica formada por dos isoformas, α - y β - tubulina, cuya polimerización conforman los microtúbulos dinámicos, esenciales para determinadas funciones en eucariotas, como la segregación de los cromosomas durante la división celular, el transporte intracelular, el desarrollo y mantenimiento de la forma celular, la motilidad celular y la distribución de moléculas en la membrana celular.⁷³ Es una diana terapéutica validada en el desarrollo de fármacos anticancerígenos por la elevada tasa de división de las células tumorales, como así lo demuestran los diferentes fármacos de unión a la tubulina que constituyen la primera línea de la quimioterapia.⁷⁴

Al igual que en mamíferos, la integridad y dinamismo de los microtúbulos en kinetoplastidos es esencial para su supervivencia, no sólo por su elevada tasa de duplicación, sino que además resultan críticos para su locomoción. En estos parásitos, la tubulina citoplasmática interviene en la segregación de cromosomas, los microtúbulos subpediculares, conectados entre sí debajo de la membrana plasmática, mantienen la forma del parásito, y el axonema, con la estructura microtubular básica 9+2 del flagelo, permite su locomoción mediante un proceso dependiente de ATP⁷⁵ (figura 4.44.A).

La tubulina es una proteína filogenéticamente conservada, con elevada identidad de secuencia entre los organismos eucariotas; sin embargo, diversos estudios demuestran una susceptibilidad diferente entre mamíferos y parásitos kinetoplastidos a los agentes antimitóticos.⁷⁶ Así, el taxol o derivados de la Vinca, utilizados como agentes antitumorales, han mostrado ser activos frente a estos parásitos, por aumento o inhibición de la polimerización de la tubulina.⁷⁷ Sin embargo, la colchicina no presenta ningún efecto. La diferente respuesta se asocia a mutaciones en la secuencia de la β -tubulina de kinetoplastidos que producen un cambio de aminoácido y en consecuencia, en la topología del motivo de unión, dificultando el acceso a la Colchicina.⁷⁸ (figura 4.44.B)

El desarrollo de diferentes derivados de sulfonamidas con capacidad de unión a la tubulina, principalmente como agentes antitumorales de acción antimitótica, se ha extendido al desarrollo de agentes leishmanicidas y tripanocidas, de inhibición selectiva de la tubulina de estos parásitos,⁷⁹ siendo las más estudiadas las dinitroanilinas (**1,2**) derivadas del herbicida oryzalina descritas por Werbotetz *et al.*⁸⁰



Considerando la capacidad de interacción con la tubulina de las bencenosulfonamidas en su acción antiparasitaria, estudiamos la disposición microtubular en promastigotes de *L. infantum* tras el tratamiento con aquellos derivados que presentaron una mayor eficacia *in vivo*, las sulfonamidas **S10a** y **S25d**. Para ello, se realizaron estudios de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal, a

partir de un anticuerpo específico frente al monómero β -tubulina tras un periodo de incubación de 24 y 48 horas con los compuestos seleccionados.

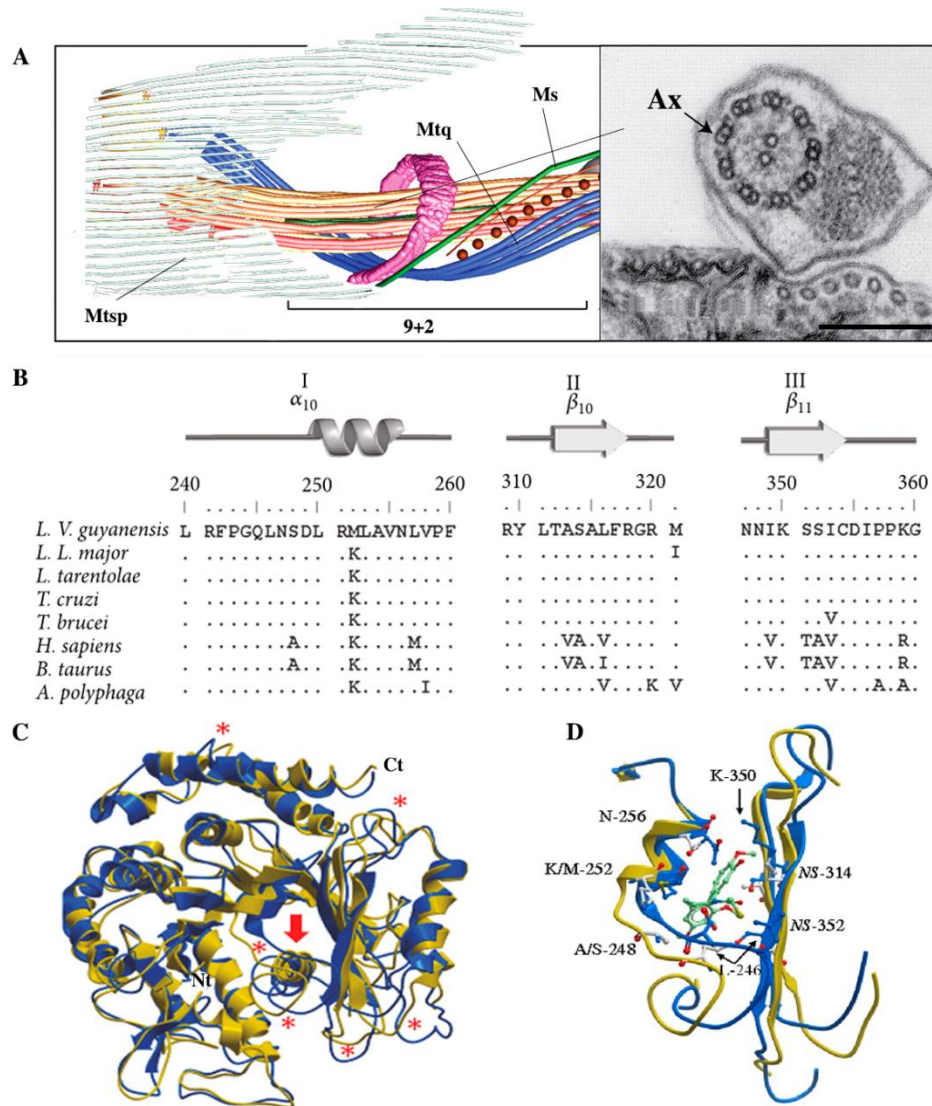


Figura 4.44. Estructura de los microtúbulos en tripanosomátidos y cambios conformacionales en el sitio de unión de la Colchicina. **A.** Organización de estructuras microtubulares en tripanosomátidos; **Mtsp:** microtúbulos subpelliculares; **Mtq:** *Microtubule Quartet*; **Ms:** *Microtubule single*; **Ax:** Axonema; barra de escalado: 200 nm. Modificado de Lamcomble y col.⁸¹ **B.** Alineamiento de secuencia de los residuos de aminoácidos y estructura secundaria de los dominios de unión de la Colchicina en la β -tubulina de diferentes organismos. Se muestran 11 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que causan un cambio de aminoácido. **C.** Superposición del modelo cristalográfico de la β -tubulina bovina (*B. Taurus* (PDB 1z2b) en amarillo) y el modelo predictivo de *L. guyanensis* (en azul). Se indican dominios que presentan diferencias significativas (*) y el sitio de unión a la Colchicina (flecha roja). **D.** Visualización de la superposición del sitio de unión a la Colchicina. Se indican las mutaciones no sinónimas en la secuencia de la β -tubulina de *L. guyanensis*. **B, C y D** modificado de Luis y col.⁸²

En los promastigotes control (*figura 4.45, A1-A6*) se observó una distribución homogénea del anticuerpo a lo largo del citoesqueleto manteniendo su forma elongada. Este modelo de organización resultó visiblemente alterado con un patrón de unión irregular a las 24 horas de incubación tras el tratamiento con el compuesto **S25d** (*figura 4.45, B1-B3*). A las 48 horas de tratamiento se acrecentó la desorganización microtubular (*figura 4.45, B4-B6*) evidenciándose en la tinción de yoduro de propidio la afectación tanto del ADN nuclear, por la presencia de un núcleo característico apoptótico, como del kinetoplasto.

En las inmunofluorescencias correspondientes al tratamiento con la sulfonamida **S10a** también se observó una disposición microtubular desorganizada a las 48 horas (*figura 4.45, C1-C4* en comparación a *A1-A4*); sin embargo, a diferencia del compuesto **S25d**, no se evidenció daño en el ADN nuclear ni del kinetoplasto. Además, en concordancia con las alteraciones morfológicas descritas para diferentes compuestos antitubulina en formas promastigotes de *Leishmania*,⁸³ se observaron las células más redondeadas, en ocasiones formando rosetas, sin afectación de los flagelos, por lo que parece que los compuestos afectan más a la tubulina citoplasmática que flagelar.

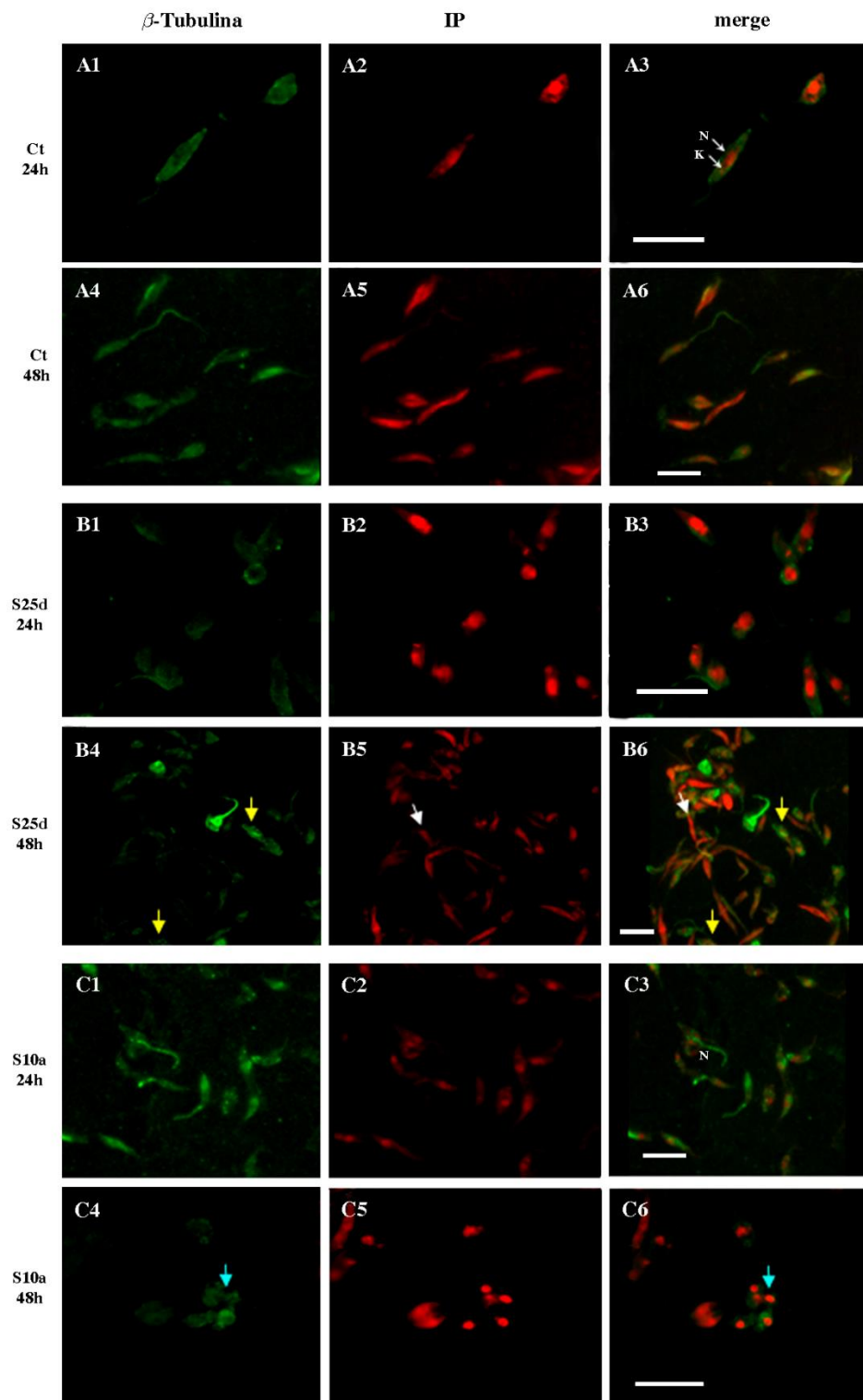


Figura 4.45. Efecto de las sulfonamidas **S25d** y **S10a** sobre los microtúbulos de promastigotes en fase de crecimiento exponencial de *L. infantum*. **A.** promastigotes no tratados después de 24 horas (**A1–A3**) y 48 horas (**A4–A6**) de incubación. **B.** promastigotes tratados con la sulfonamida **S25d** después de 24 horas (**B1–B3**) y 48 horas (**B4–B6**) de incubación. **C.** promastigotes tratados con la sulfonamida **S10a** después de 24 horas (**C1–C3**) y 48 horas (**C4–C6**) de incubación.

4.2.3. Actividad antiparasitaria de las sulfonamidas de las series S17-S23

Del total de los 94 derivados evaluados hasta el momento, identificamos como leishmanicidas y/o tripanocidas potenciales por su actividad *in vitro* y/o *in vivo* 6 derivados (**S2b**, **S3b**, **S4f**, **S7a**, **S10a** y **S15e**).

Del primer cribado de selección *in vitro*, con la evaluación de derivados de bencenosulfonamidas, en su mayoría con un anillo heterocíclico monocíclico en **D1** identificamos las sulfonamidas **S2b** y **S3b**, de eficacia *in vivo* en *L. infantum* previamente demostrada, por su actividad *in vitro* frente a *Leishmania spp.* y *T. cruzi*. Adicionalmente, en el mismo cribado, identificamos las sulfonamidas **S4f** y **S7a** por su actividad exclusiva *in vitro* frente a *Leishmania spp.* y *T. cruzi* respectivamente (figura 4.46A).

En el segundo cribado de selección, en su mayoría benceno- y naftalenosulfonamidas con anillos heterocíclicos bicíclicos en **D1**, identificamos derivados con mayor potencia y selectividad *in vitro* en ambos kinetoplástidos, cuya evaluación *in vivo* posterior permitió identificar a la sulfonamida **S10a**, por su actividad frente a *L. infantum* y **S15e**, por su actividad frente a *T. cruzi* como nuevos cabezas de serie de nuestra librería (figura 4.46.A).

Siguiendo con la metodología de trabajo, de ciclos sucesivos de diseño y síntesis en función de la actividad antiparasitaria de los compuestos evaluados, consideramos la posibilidad de estudiar la influencia de anillos benzofusionados saturados en la actividad antiprotozoaria.

En los últimos años, con el diseño de fármacos basados en fragmentos (FBDD, *fragment-based drug Discovery*)⁵, se ha demostrado que la presencia de anillos saturados favorece la diversidad de reconocimiento por las dianas proteicas. Esta versatilidad de interacción se atribuye al denominado carácter 3D de los núcleos saturados, con átomos de carbono sp^3 , a diferencia de los anillos aromáticos o sistemas co-planares con carácter 2D, considerándose a los anillos benzofusionados como anillos saturados como sistemas híbridos 2D/3D.⁸⁵ Por otro lado, la introducción de este tipo anillos en el diseño de fármacos es considerada como una estrategia para aumentar su liposolubilidad e hidrofobicidad simultáneamente, permitiendo la obtención de fármacos con mejores propiedades *drug-likeness*.⁸⁶

En los cribados anteriormente descritos, tan sólo se habían evaluado los derivados con anillos benzofusionados saturados de la serie **S21**, 5-indano-*para*-bencenosulfonamidas sustituidas **S21a**, **S21b** y **S21d** y de la serie **S26**, 1,2,3,4-tetraisoquinolina-*para*-bencenosulfonamidas **S26a-c** y la naftalenosulfonamida **S26d**. Los derivados de la serie **S21** resultaron ser citotóxicos en macrófagos J774 y los de la serie **S26** no presentaron actividad antiprotozoaria en las formas extracelulares de *Leishmania spp.* y *T. cruzi*. No obstante, considerando la mayor actividad de los sistemas bicíclicos, como las sulfonamidas **S10a** y **S15e**, respecto a los monocíclicos (**S2b** y **S3b**), y las propiedades fisico-químicas y de reconocimiento descritas en fármacos con anillos saturados, aumentamos la variabilidad estructural de nuestra librería con la sustitución de los sistemas heterocíclicos

⁵ Descomposición de cabezas de serie en fragmentos más pequeños, que permite simplificar el análisis computacional de unión a diferentes dianas y optimizar las interacciones de cada fragmento con su sitio particular, e integrarlo en una sola molécula cuya afinidad por la diana es la suma de interacciones de cada fragmento.⁸⁴

benzofusionados por sus homólogos saturados. (*figura 4.46. B*). Concretamente, sintetizamos 6 series adicionales, manteniendo la sustitución en **D2** anteriormente descrita, con la introducción en **D1** de:

- a) Anillos benzofusionados saturados pentagonales (**S18-S21**): Derivados del núcleo de indano *N*-sustituido en las posiciones 1, 2 y 4. Además, completamos el patrón de sustitución de la serie **S21** con la síntesis del derivado **S21c**, una *para*-bencenosulfonamida sustituida con -F y el derivado **S21e**, una naftalenosulfonamida.
- b) Anillos benzofusionados saturados hexagonales: Derivados del anillo de tetrahidronaftaleno *N*-sustituido en dos posiciones 1 (**S22**) ó 5 (**S23**).

Por último, introducimos en nuestra librería la serie **S17**, de derivados de antraceno, no habiéndose evaluado sulfonamidas *N*-sustituidas con un anillo aromático no heterocíclico en **D1**.

La evaluación antiparasitaria *in vitro* de estas nuevas series de sulfonamidas se realizó siguiendo el mismo procedimiento y metodología de trabajo que en los estudios anteriores, así como los diferentes aislados de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*, y su evaluación citotóxica en macrófagos J774.

En la *tabla 4.23* se muestran los resultados obtenidos frente a formas extracelulares, promastigotes de *Leishmania* spp. y epimastigotes de *T. cruzi*. A continuación, al igual que en los estudios anteriores, se muestran los índices de selectividad (IS) (*tabla 4.24*) para cada uno de los derivados evaluados en ambos kinetoplástidos.

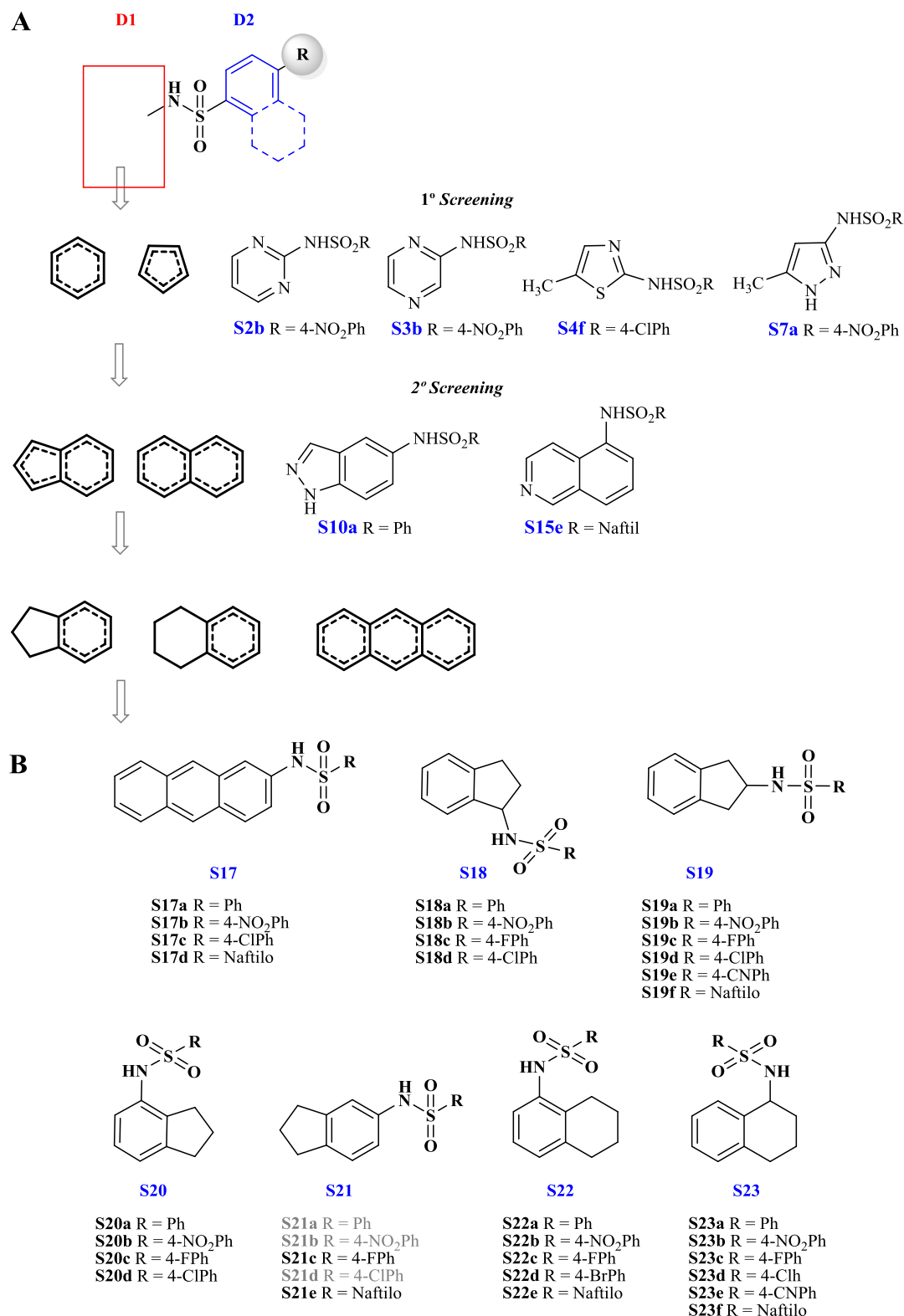


Figura 4.46. Variaciones estructurales consideradas en el diseño de las sulfonamidas de las series S17-S23. **A.** Variaciones estructurales en el dominio de diversidad estructural **D1** y sulfonamidas seleccionadas por su actividad *in vitro* y/o *in vivo* en *Leishmania* spp. y *T. cruzi* en cribados anteriores. **B.** Estructura de las sulfonamidas S17-S23.

C ^a	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. guyanensis</i>		<i>L. amazonensis</i>		<i>T. cruzi</i>		J774
	GI _L ^b	IC ₅₀ ^c	GI _L	IC ₅₀	GI _L	IC ₅₀	GI _L	IC ₅₀	GI _T ^d	IC ₅₀	CC ₅₀ ^e
S17a	95	103.5	96.6	68.1	97	32.9	91.3	23.4	67.6	ND ^f	23.4
S17b	99	65.1	97.9	43.3	82	125.6	86.6	21.4	69.8	ND	37.9
S17c	92	19.3	80	19.0	98	9.2	99	18.7	69.2	ND	55
S17d	96	26.3	99	17.3	99	27.2	99	18	ND	ND	144,7
S18a	44	ND	51	ND	43	ND	41.5	ND	54	ND	ND
S18b	95	64.1	99	46.8	95	31.2	97.9	55	67	ND	>256
S18c	0	ND	47.4	ND	69	ND	0	ND	83	44.4	76.7
S18d	57	ND	58	ND	69	ND	81	102.3	ND	ND	11.9
S19a	97	75.5	96	52.3	98	75.1	98	113.4	61.9	ND	>256
S19b	72	16	85	0.9	75	35.2	61	108.1	35	ND	>256
S19c	93	141.1	97	54.1	99	71	98	74	1.77	ND	>256
S19d	95	17.9	98	28.8	100	26.1	99	60.3	100	0.75	>256
S19e	69	ND	56	ND	90	177	66	ND	ND	ND	>256
S19f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	2.24	ND
S20a	98	34.7	95	24.1	93	31.4	99	31.1	100	1	>256
S20b	93	2.5	91	0.31	81	11.9	93	7.5	53	ND	>256
S20c	100	35.1	98	35.2	100	38.6	99	35.9	46	ND	78.9
S20d	99	14.4	94	11.7	100	12.5	99	15.3	ND	ND	14.5
S21c	86	29.5	96	23.5	95.8	6.5	96	10.5	ND	ND	56.6
S21d	97	15.6	99	23.8	99	7.7	98	25.7	73.6	ND	77.6
S22a	96	44.9	99	34.1	100	39.7	99	35.8	ND	ND	119.3
S22b	96	14.2	99	1.57	100	9.38	99	8.7	61.5	ND	>256
S22c	96	52.2	100	42.2	100	39	99	34	ND	ND	22.9
S22d	91	20.4	100	11.2	100	13.6	99	12.6	ND	ND	89.3
S22e	43	ND	47	ND	21	ND	0	ND	ND	ND	ND
S23a	31.6	ND	66.8	ND	ND	ND	38	ND	37.7	ND	ND
S23b	80.7	4.3	83.4	2.3	86	51.1	76	87.7	57.1	ND	>256
S23c	82.2	29.1	86.9	56	86.4	46.1	98	97.3	71.2	91.2	206
S23d	85.1	23.3	90	28.6	90.7	17.1	84.4	26.1	69.6	98.1	132.2
S23e	87	53.5	81	59.2	94	23.7	96.2	36.8	ND	ND	19.5
S23f	98	16.6	97.8	28.1	98	5.1	98.3	11.2	55.1	ND	117
M ^g	93	17.7	95	17.7	98	19.4	98	30.7	–	–	135.9
B ^h	–	–	–	–	–	–	–	–	90.3	54.7	>256

Tabla 4.23. Susceptibilidad de las formas promastigotes de *Leishmania* spp. y epimastigotes de *T. cruzi* frente a las sulfonamidas evaluadas de las series S17-S23. ^aC: Compuesto; ^bGI_L (%; *Growth Inhibitory* en *Leishmania* spp.): porcentaje de inhibición del crecimiento a las 48 horas de tratamiento a una concentración de sulfonamida de 100 µg/mL; ^cIC₅₀: concentración de compuesto que produce una reducción de la viabilidad celular de un 50% respecto al cultivo no tratado; ^dGI_T (%; *Growth Inhibitory* en *T. cruzi*): porcentaje de inhibición del crecimiento a las 72 horas de tratamiento a una concentración de sulfonamida de 100 µg/mL; ^eCC₅₀: concentración citotóxica que reduce la viabilidad celular en un 50%; ^fND: No Determinado; ^gM: Miltefosina; ^hB: Benznidazol.

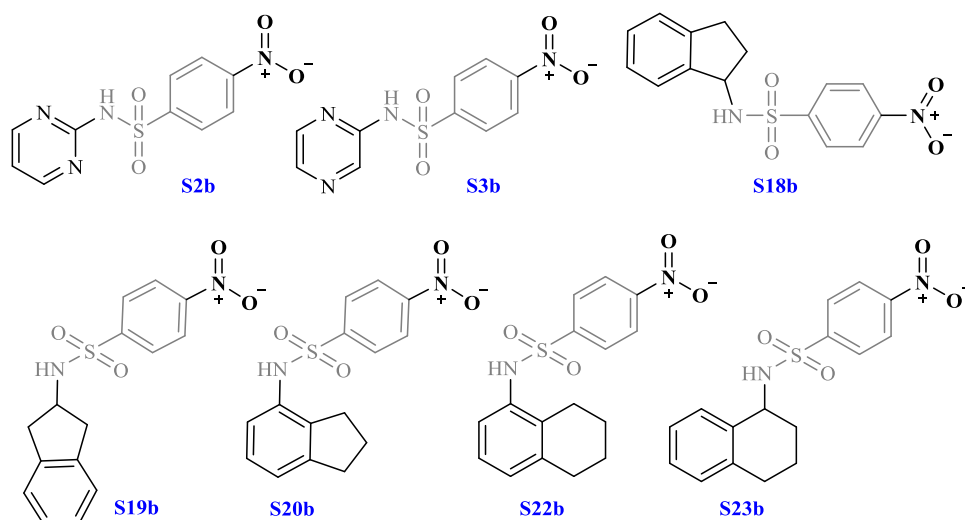
Compuesto	IS ^a				
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>
S17c	2.8	2.9	6.0	2.9	ND ^b
S17d	5.5	8.4	5.3	8.0	ND
S18b	4.0	5.5	8.2	4.7	ND
S18c	ND	ND	ND	ND	1.7
S19a	>3.4	>4.9	>3.4	>2.3	ND
S19b	>16.0	>284.4	>7.3	>2.4	ND
S19c	>1.8	>4.7	>3.6	>3.5	ND
S19d	>14.3	>8.9	>9.8	>4.2	>341.3
S20a	>7.4	>10.6	>8.2	>8.2	>256.0
S20b	>102.4	>825.8	>21.5	>34.1	ND
S20c	2.2	2.2	2.0	2.2	ND
S20d	1.0	1.2	1.2	0.9	ND
S21c	1.9	2.4	8.7	5.4	ND
S21d	5.0	3.3	10.1	3.0	ND
S22a	2.7	3.5	3.0	3.3	ND
S22b	18.0	163.1	27.3	29.4	ND
S22c	0.4	0.5	0.6	0.7	ND
S22d	4.4	8.0	6.6	7.1	ND
S23b	>59.5	>111.3	>5.0	>2.9	ND
S23c	7.1	3.7	4.5	2.1	2.3
S23d	5.7	4.6	7.7	5.1	1.3
S23e	0.4	0.3	0.8	0.5	ND
S23f	7.0	4.2	22.9	10.4	ND
M ^c	7.7	7.7	7.0	4.4	ND
B ^d	ND	ND	ND	ND	4.7

Tabla 4.24. Índices de selectividad de las sulfonamidas de las series S17-S23 con actividad leishmanicida y tripanocida *in vitro* frente a formas extracelulares de *Leishmania spp.* y *T. cruzi*. ^aIS: Índice de selectividad (IS = CC₅₀/IC₅₀); ^bND: No Determinado; ^cM: Miltefosina; ^dB: Benznidazol.

Si observamos los valores de IC₅₀ e IS calculados, en términos generales, estas nuevas series evaluadas presentaron una mayor potencia y selectividad *in vitro* frente a formas extracelulares de ambos kinetoplastidos. Con la excepción de las series S17 y S21, que presentaron relativa citotoxicidad, en las demás series de sulfonamidas evaluadas (S18, S19, S20, S22, y S23), se identificaron derivados con IC₅₀ e IS significativos (S18b, S19b/d, S20a/b, S22b, y S23b).

Curiosamente, las series S18, S19, S20, S22 y S23 fueron coincidentes en presentar como uno de los compuestos más activos el nitroderivado correspondiente, con IS superiores respecto a las nitrobenzenosulfonamidas S2b y S3b, cabezas de serie de nuestra librería.

En la *tabla 4.25* se muestran los valores correspondientes a los IC₅₀ e IS de los nitroderivados de cada serie (**S18b**, **S19b**, **S20b**, **S22b**, y **S23b**) junto con los valores de las sulfonamidas **S2b** y **S3b** con fines comparativos.



Compuesto	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. guyanensis</i>		<i>L. amazonensis</i>	
	^a IC ₅₀	IS ^b	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS
S2b	76.4	>3.4	48.8	>5.2	46.4	>5.5	68.6	>3.7
S3b	66.2	>3.9	61.5	>4.2	84.2	>3	ND	ND ^c
S18b	64.1	4.0	46.8	5.5	31.2	8.2	55	4.7
S19b	16	>16.0	0.9	>284.4	35.2	>7.3	108.1	>2.4
S20b	2.5	>102.4	0.31	>825.8	11.9	>21.5	7.5	>34.1
S22b	14.2	18.0	1.57	163.1	9.38	27.3	8.7	29.4
S23b	4.3	>59.5	2.3	>111.3	51.1	>5.0	87.7	>2.9
M^d	17.7	7.7	17.7	7.7	19.4	7.0	30.7	4.4

Tabla 4.25. Valores IC₅₀ e índices de selectividad de las nitrobenzenosulfonamidas **S2b**, **S3b**, **S18b**, **S19b**, **S20b**, **S22b** y **S23b** frente a formas extracelulares de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*. ^aIC₅₀: concentración de compuesto que produce una reducción de la viabilidad celular de un 50% respecto al cultivo no tratado; ^bIS: Índice de selectividad (IS = CC₅₀/IC₅₀); ^cND: No Determinado; ^dM: Miltefosina.

Si comparamos los valores de estos nitroderivados observamos que existe una correlación entre *L. infantum* y *L. braziliensis*, como especies más susceptibles y, entre *L. guyanensis* y *L. amazonensis*.

En *L. infantum* y *L. braziliensis*, el nitroderivado más activo se corresponde con **S20b**, con valores de IC₅₀ entre 0.31-2.5 μM y, en consecuencia elevados IS, especialmente en *L. braziliensis*

($IS_{(S20b)} > 825.5$); el nitroderivado **S22b** mostró una actividad intermedia con mayor selectividad en *L. braziliensis* ($IS_{(S22b)} > 163.1$); y **S18b** presentó la menor actividad con IS inferiores a los de la Miltefosina. Los valores obtenidos para los derivados de la serie **S19** y **S23** muestran una mayor actividad en *L. infantum* y *L. braziliensis* en comparación con *L. guyanensis* y *L. amazonensis*. Ambos presentan elevados IS, especialmente significativos en *L. braziliensis* ($IS_{(S19b)} > 284.4$; $IS_{(S23b)} > 111.3$).

La mayor susceptibilidad de las especies de *Leishmania* spp. a las nitrobenzenosulfonamidas evaluadas en este cribado (**S18**, **S19**, **S20**, **S22**, y **S23**), respecto a los otros derivados de las mismas series, y su coincidente potencia y selectividad entre *L. infantum* y *L. braziliensis* en comparación con *L. guyanensis* y *L. amazonensis*, sugieren que estos compuestos podrían actuar sobre una diana determinada.

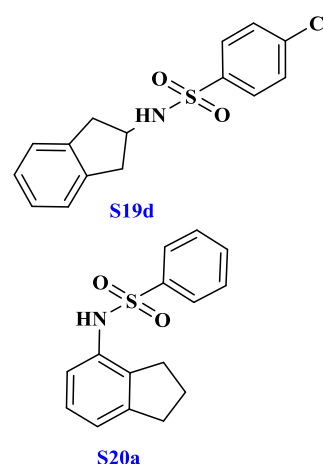
En el primer cribado de selección con la identificación de los nitroderivados **S2b** y **S3b**, como las sulfonamidas más activas frente a *Leishmania* spp. y *T. cruzi* y el nitroderivado **S7a**, de actividad exclusiva en *T. cruzi*, señalamos la importancia del desarrollo de nitrocompuestos para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas. Este tipo de compuestos pueden actuar de manera selectiva por la generación de especies nitrosas reactivas tras su biorreducción por NTRs de tipo I, ausentes en mamíferos. Aunque se han descrito NTRs en ambos kinetoplástidos, este tipo de compuestos, atendiéndonos a las referencias bibliográficas, se han evaluado preferentemente en *Trypanosoma* sp., probablemente por la similitud estructural y el mecanismo de acción de los dos únicos fármacos comerciales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, el Nifurtimox y el Benznidazol.

Sorprendentemente, en el primer cribado, las tres sulfonamidas activas frente a formas extracelulares de *T. cruzi*, **S2b**, **S3b** y **S7a** poseen el sustituyente *para*-nitro y se esperarían resultados similares en la evaluación de las sulfonamidas **S17-S23**. Sin embargo, los nitroderivados **S18b**, **S19b**, **S20b**, **S22b** y **S23b**, a pesar de los buenos valores de actividad y selectividad en todas las especies de *Leishmania* spp., ninguno resultó activo frente a *T. cruzi*. Además, al igual que en los cribados anteriores, un menor número de sulfonamidas presentaron actividad frente a *T. cruzi*.

Entre los 31 derivados evaluados se identificaron como activos frente a las formas epimastigotes de *T. cruzi* los derivados **S18c**, **S19d**, **S20a**, **S23c** y **S23d**. Los más activos resultaron ser las sulfonamidas **S19d** y **S20a**, con una selectividad muy superior al Benznidazol (**S19d**, $IC_{50(S19d)} = 0.75$ y $IS > 341.3$, **S20a** $IC_{50(S20a)} = 1$ y $IS > 256$, Benznidazol $IC_{50(S20a)} = 54.7$ y $IS = 4.7$). Sin embargo, los derivados **S18c**, **S23c** y **S23d** no presentaron valores IS superiores al Benznidazol.

La actividad antiprotozoaria de estos derivados, **S19d** y **S20a**, también se observó en *Leishmania* spp., de manera significativa en *L. braziliensis*, cuya susceptibilidad al derivado **S20a**, en ausencia de citotoxicidad, determinó el mayor IS de todos los derivados evaluados en este cribado ($IS_{(S20a)} > 825.8$).

El análisis global de estos resultados permite concluir, al menos en las formas extracelulares de ambos kinetoplástidos, un aumento de la actividad (potencia + selectividad) con la sustitución de



los anillos benzofusionados heterocíclicos por sus homólogos saturados. Además, ponen de manifiesto que la presencia de este tipo de anillos en las nitrobenzenosulfonamidas está más asociada a la actividad leishmanicida y no tripanocida, a diferencia del perfil de actividad de las sulfonamidas **S2b**, **S3b** y **S7a**.

Estudios posteriores de su evaluación en las formas intracelulares permitirán confirmar la potencialidad de estos derivados como fármacos leishmanicidas y tripanocidas para su evaluación *in vivo*.

4.2.4. Relación Estructura-Actividad de las sulfonamidas S1-S26

Una vez evaluada la actividad antiparasitaria de las sulfonamidas **S1-S26** y en función de la diversidad estructural, se proponen las características estructurales esenciales que determinan la actividad antiprotozoaria mediante análisis de la Relación-Estructura Actividad (REA).

Analizando el dominio estructural **D1**, las propiedades antiparasitarias de las diferentes sulfonamidas *N*-sustituídas vienen determinadas por la naturaleza del heterociclo. Ninguno de los derivados monocíclicos (compuestos **S1-S7**) presentó una actividad superior a los cabezas de serie **S2b** y **S3b**. Sin embargo, los valores de IC₅₀ son menores al sustituirlos por anillos heteroaromáticos bicíclicos, concluyéndose por tanto la influencia de una subestructura benzofusionada aromática para una óptima actividad.

Entre las diferentes series de anillos heteroaromáticos benzofusionados, la mayor actividad *in vitro* frente a *Leishmania* spp y *Trypanosoma cruzi* sin presentar citotoxicidad, se correspondieron con un indol (**S8a**), tres derivados de indazol (**S10a**, **S11c** y **S11d**), un benzotiazol (**S13a**) y una isoquinolina (**S15e**).

Por otro lado, entre los diferentes derivados con sistemas heterocíclicos saturados (compuestos **S24-S26**), tan sólo el derivado **S25d** presentó actividad leishmanicida *in vitro*, en el cual la presencia de un grupo naftilo parece necesaria para favorecer la actividad antiprotozoaria.

Con respecto al dominio estructural **D2** y su sustitución en *para* del benzenosulfonilo, los derivados no sustituidos **S8a**, **S10a**, **S13a**, **S15e** y **S25d** presentaron una mayor actividad leishmanicida en formas amastigotes, no aumentándose por la presencia de un grupo electrón-atrayente, a diferencia de la actividad tripanocida determinada para los derivados **S11c** y **S11d**, *p*-fluoro y *p*-clorobenzenosulfonamidas, con valores de IC₅₀ menores que el fármaco de referencia (Benznidazol).

Curiosamente, la presencia de un grupo -NO₂ en el anillo de benzenosulfonamida de los compuestos bicíclicos heteroaromáticos o monocíclicos saturados no confiere una mejor actividad antiprotozoaria, como podría esperarse por los resultados previos con **S2b** y **S3b**. Esto es probablemente debido a su interacción con una diana terapéutica distinta y las diferencias de actividad podrían explicarse por una combinación de factores, como la distribución electrónica, el tamaño y la lipofilia de los compuestos.

No obstante, la sustitución de estos anillos por sus homólogos benzofusionados saturados permitió obtener valores mucho menores de IC_{50} en las formas promastigotes de *Leishmania spp.* y epimastigotes de *T. cruzi*, adquiriendo especial relevancia la actividad de los nitroderivados respecto a sus análogos de la misma serie. Si bien, la ausencia de estudios en las formas intracelulares no permite concluir la influencia de estos anillos en la actividad antiprotozoaria.

Cabe señalar que el compuesto activo *in vivo* **S15e** en el modelo de infección aguda de *T. cruzi*, es un análogo simplificado de las naftilisoquinolinas dioncofilina C, ancistrotanzanina B y su atropoisómero ancistroealaina A. Estos alcaloides naftilisoquinoleínicos quirales, aislados a partir de plantas pertenecientes a las familias *Ancistrocladaceae* y *Dioncophyllaceae*, han mostrado ser eficaces en el tratamiento de enfermedades tropicales como la malaria, la leishmaniosis o la enfermedad de Chagas.⁸⁷ Al comparar las estructuras de estos alcaloides con la sulfonamida **S15e**, se puede observar que todos poseen un sustituyente naftilo en la posición 5 del anillo heterocíclico, si bien en el compuesto **S15e** es a través de un grupo sulfonamido. Además, el anillo de isoquinolina está simplificado sin la presencia de los metilos en C-1 y C-3 disminuyendo la existencia de centros estereogénicos presentes en los alcaloides naturales (figura 4.47).

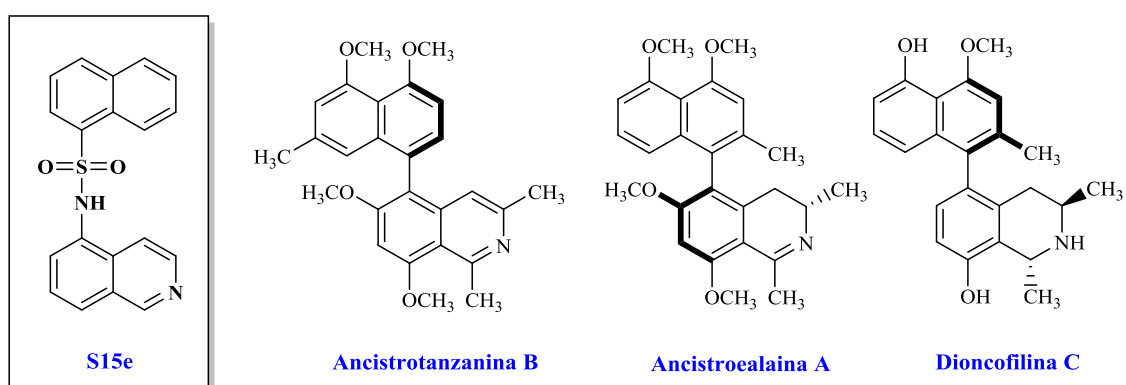


Figura 4.47 Alcaloides isoquinoleínicos ancistrotanzanina B, ancistroealaina A y dioncofilina C junto con la sulfonamida estructuralmente relacionada **S15e**.

4.2.5. Evaluación *in silico* de las propiedades farmacocinéticas de las sulfonamidas **S2b**, **S3b**, **S10a** y **S15e**

Como describimos anteriormente, la variabilidad en la respuesta al tratamiento frente a la enfermedad de Chagas y a la leishmaniosis, especialmente en esta última, se debe a una multitud de factores, dependientes tanto del parásito (especie, cepa y tropismo) como del hospedador, principalmente el sistema inmune. Sin embargo, en determinadas ocasiones, no se observándose diferencias en la sensibilidad de los aislados en modelos *in vitro*, los índices de actividad no se correlacionan en los ensayos clínicos, ya sea por una baja absorción o distribución del compuesto que impiden alcanzar una óptima biodisponibilidad en los órganos diana, o por un aumento de su metabolización o excreción que disminuyen el tiempo de exposición. Son las mismas propiedades farmacocinéticas ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) la principal causa de ineficacia y toxicidad de los fármacos leishmanicidas y tripanocidas en los ensayos clínicos.^{18a, 29, 88}

Por ello, nos propusimos evaluar *in silico* las propiedades farmacocinéticas de los derivados **S2b**, **S3b**, **S10a** y **S15e**, potenciales fármacos leishmanicidas y tripanocidas que habían mostrado actividad *in vivo*. En primer lugar determinamos las *reglas de Lipinski* o “*regla de los 5*”, método comúnmente utilizado para evaluar las propiedades *drug-likeness* de un compuesto, basado en sus propiedades físico-químicas, para su administración oral. Este filtra las moléculas en función de su peso molecular ($MW \leq 500$ g/mol), su lipofilia, medida en función del coeficiente de reparto octanol/agua ($\text{LogP} \leq 5$), el número de átomos dadores ($n\text{HBDon} \leq 5$) y aceptores ($n\text{HBAC} \leq 10$) de enlaces de hidrógeno y el número de enlaces rotables ($n\text{RotB} < 10$).⁸⁹ Como se muestra en la *tabla 4.26*, los compuestos **S2b**, **S3b**, **S10a** y **S15e** cumplen las reglas, análogamente a otras sulfonamidas antiprotozoarias descritas⁹⁰.

Adicionalmente, determinamos las propiedades ADMET a partir del servidor admetSAR, el cual incluye una base de datos con 22 modelos predictivos cualitativos, proporcionando los resultados como probabilidades a partir de 210.000 anotaciones de 96.000 compuestos. Según este modelo, los compuestos **S2b**, **S3b** y **S15e** presentan valores positivos en su capacidad de atravesar membranas, determinados por la capacidad de pasar la barrera hematoencefálica (*BBB*, *blood-brain barrier*), absorción intestinal (*HIA*, *human intestinal absorption*) y permeabilidad en células de la línea Caco-2. Similares valores se obtuvieron para el compuesto **S10a**, a excepción del valor negativo obtenido para la permeabilidad en Caco-2, aunque con una baja probabilidad.

En términos de toxicidad, todos los compuestos presentaron con elevada probabilidad valores negativos para el *test de Ames* y efecto carcinogénico.

También se determinó la probabilidad de estos compuestos de actuar como sustratos e inhibidores de las diferentes isoenzimas que conforman el complejo multienzimático citocromo P450 (CYP), particularmente de las isoformas 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4, responsables de alrededor del 90% de las reacciones metabólicas de oxidación. La importancia en su determinación subyace de las reacciones adversas por interacción de fármacos en terapias combinadas.⁹¹ En la *tabla 4.26* se resumen las probabilidades de inhibición o inducción de las diferentes isoenzimas para los compuestos.

	S2b		S3b		S10a		S15e	
	R	P (%)	R	P (%)	R	P (%)	R	P (%)
Absorción								
BBB	+	78.00	+	93.16	+	97.33	+	96.80
HIA	+	95.07	+	52.90	+	100.0	+	99.55
Caco-2	+	50.63	+	93.16	-	51.36	+	70.12
Metabolismo								
CYP450 2C9(S)	NS	73.43	NS	75.95	NS	76.15	NS	75.39
CYP450 2D6(S)	NS	83.25	NS	83.91	NS	80.95	NS	81.45
CYP450 3A4(S)	NS	65.24	NS	68.06	NS	65.93	NS	66.10
CYP450 1A2(I)	NI	79.04	NI	78.52	I	89.57	I	90.43
CYP450 2C9(I)	NI	64.31	NI	56.33	I	54.59	I	61.63
CYP450 2D6(I)	NI	90.90	NI	92.04	NI	60.41	I	55.60
CYP450 2C19(I)	NI	61.89	NI	60.25	I	78.52	I	77.96
CYP450 3A4(I)	NI	69.57	NI	67.75	NI	58.57	NI	53.44
Toxicidad								
Test de Ames	-	88.33	-	87.39	-	73.95	-	85.79
Carcinogénesis	-	84.31	-	79.51	-	82.38	-	88.98
Descriptores moleculares de Lipinski								
nRotB < 10	2		2		2		2	
nHBAC ≤ 10	8		8		5		4	
nHBDON ≤ 5	1		1		2		1	
ACD/logP (≤ 5)	1.04 ± 0.26		1.20 ± 0.38		1.97 ± 0.78		3.40 ± 0.76	
PM ≤ 500 g/mol	280.26		280.26		273.31		334.39	

Tabla 4.26. Biodisponibilidad oral y propiedades ADMET de los compuestos **S2b**, **S3b**, **S10a** y **S15e**. **R**: Respuesta (+ / -); **P**: Probabilidad (%); **BBB**: Blood-Brain Barrier; **HIA**: Human Intestinal Absorption; **Caco-2**: línea celular de adenocarcinoma de colon (*adenoCarcinoma of the Colon*); **(S)**: Sustrato; **(I)**: Inhibidor; **NS**: No sustrato; **NI**: No inhibidor; **nRotB**: número de enlaces rotables; **nHBAC**: número de átomos aceptores; **nHBDON**: número de átomos dadores; **ACD/logP**: Coeficiente de reparto octanol/agua, (<http://acdlabs.com>); **PM**: Peso molecular.

Los resultados obtenidos *in vivo*, frente a *T. cruzi* tras el tratamiento con la sulfonamida **S15e**, junto con los obtenidos en el modelo *in vivo* de *L. infantum* tras el tratamiento con la sulfonamida **S10a** y, las previamente descritas **S2b** y **S3b**, proponen que estas sulfonamidas sean consideradas nuevas cabezas de serie o prototipos en el desarrollo de fármacos tripanocidas y leishmanicidas (figura 4.48). Además de por su efectividad *in vivo*, por la sencillez y reproducibilidad en su síntesis pueden ser consideradas como compuestos potenciales, para su introducción en posteriores ensayos clínicos y de formulación, en vista de obtener fármacos comerciales y asequibles para el tratamiento de enfermedades olvidadas, como son la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.

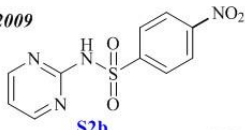
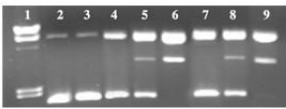
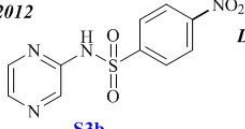
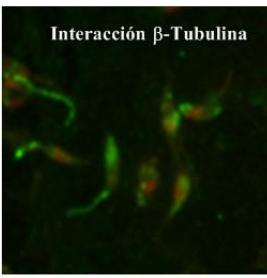
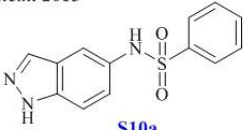
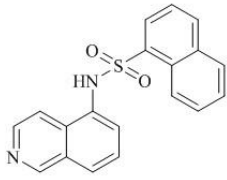
	Sulfonamidas	Actividad antiparasitaria	Mecanismo de acción*
Tesis Doctoral	<p><i>Bioorg. Med. Chem.</i> 2009</p>  <p>S2b</p>	<i>in vivo</i> <i>L. infantum</i>	 <p>Actividad Nucleasa</p>
	<p><i>Int. Parasitol.</i> 2012</p>  <p>S3b</p>	<i>in vitro</i> <i>Leishmania</i> spp. - <i>T cruzi</i>	 <p>Interacción β-Tubulina</p>
	<p><i>J. Med. Chem.</i> 2013</p>  <p>S10a</p>	<i>in vitro e in vivo</i> <i>Leishmania</i> spp. - <i>T cruzi</i>	
	 <p>S15e</p>		<p>Potencia/Selectividad</p> <p>-</p> <p>+</p>

Figura 4.48. Resultados en la evaluación antiparasitaria de derivados de sulfonamidas.

4.3. Estudios de actividad antitumoral de las sulfonamidas S8-S11 y S13-S22

Entre las diferentes aplicaciones farmacológicas descritas para la clase estructural de las sulfonamidas, una de las que se ha llevado a cabo con mayor éxito recientemente es su desarrollo como agentes antitumorales. Como se ha descrito en los antecedentes bibliográficos, el diseño de nuevos derivados mediante diferentes estrategias de farmacomodulación, y la evaluación de sus propiedades antitumorales, ha permitido obtener compuestos de eficacia terapéutica demostrada en diferentes ensayos clínicos, así como atribuirles nuevos mecanismos de acción en su actividad antitumoral. En la mayoría de los casos las sulfonamidas actúan como inhibidores de diversas proteínas estructurales o enzimas, principalmente como agentes de unión a la tubulina, inhibidores de la anhidrasa carbónica, deacetilasas o metoloproteinasas.⁹²

Las similitudes bioquímicas entre las células tumorales y parásitos kinetoplastidos: capacidad ilimitada de proliferación, evasión de la respuesta inmune, resistencia a la apoptosis y capacidad de invasión⁹³, permite atribuir a compuestos con actividad antiparasitaria un potencial efecto antitumoral, en muchas ocasiones, actuando sobre una misma diana terapéutica.

En la evaluación antiparasitaria de nuestra librería de sulfonamidas frente a *Leishmania* spp. y *T. cruzi*, identificamos nuevos derivados con actividad nucleasa *in vitro* y anti-tubulina en promastigotes de *L. infantum*, ambas actividades ampliamente conocidas como mecanismo antitumoral.

Basados en estos resultados previos, la estructura y el interés creciente del desarrollo de este tipo de compuestos en el campo de la terapia antitumoral, otro de los objetivos de la presente tesis doctoral es la obtención de nuevos derivados de sulfonamidas con actividad antitumoral.

La actividad antitumoral de nuestra librería de sulfonamidas se ha evaluado mediante una combinación de estudios biológicos, biofísicos y computacionales. De entre los derivados que constituyen la librería, seleccionamos en un primer cribado los compuestos con anillos benzofusionados heterocíclicos de las series **S8** (derivados indólicos), **S10** y **S11** (derivados de indazol) y **S13** (derivados de benzotiazol), y anillos benzofusionados saturados de las series **S20-S21**. Adicionalmente, seleccionamos la serie **S17**, con la introducción de un anillo de antraceno en **D2**, no habiéndose descrito la actividad antitumoral de sulfonamidas aromáticas con un anillo de antraceno (figura 4.49).

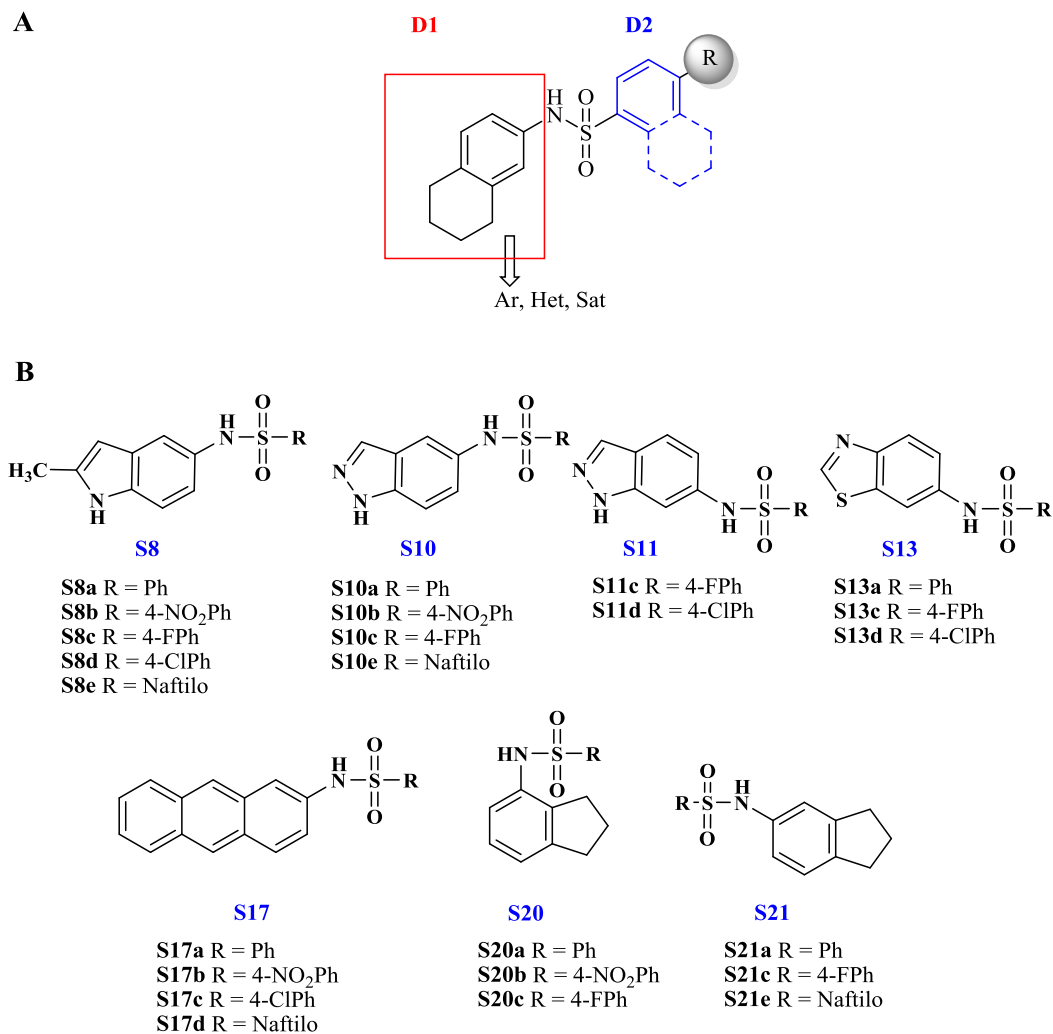


Figura 4.49. Sulfonamidas seleccionadas en el primer *screening* de evaluación antitumoral. **A.** Dominios de diversidad estructural establecidos (**D1/D2**); **Ar**: Aromático, **Het**: Heterociclo, **Sat**: Saturado. **B.** Estructura de los derivados de las series **S8**, **S10-S11**, **S13** y **S17**, **S20** y **S21**.

4.3.1. Actividad antiproliferativa de los derivados de las series S8-S11 y S13-S22

La evaluación de la capacidad antiproliferativa *in vitro* en un panel de líneas celulares representativo de diferente origen tumoral es una herramienta de selección en las etapas iniciales de desarrollo de fármacos como potenciales agentes anticancerígenos.⁹⁴ La diversidad en cuanto al origen de las células tumorales, permite validar el procedimiento como predictivo de la diferente sensibilidad al tratamiento. Esta metodología es utilizada por el NCI (*Nacional Cancer Institute*), quien ofrece un servicio de evaluación de compuestos en un panel de 60 líneas representativas de diferentes neoplasias, lo que permite establecer patrones de sensibilidad a los fármacos en función del tipo celular y de la heterogeneidad genómica existente entre líneas del mismo origen tumoral.⁹⁵

Siguiendo los protocolos estandarizados por el NCI, evaluamos la capacidad antiproliferativa de las sulfonamidas de la series **S8-S11** y **S13-S22**, en un panel representativo de líneas celulares de diferente origen tumoral, incluyéndose tanto tumores sólidos: SW620 y SW480 (adenocarcinoma colorrectal), LN229, U87MG, SKMG-3, U251 y U373 (glioblastoma multiforme) y PC3 (adenocarcinoma de próstata); así como neoplasias hematológicas: Jurkat, (leucemia linfoblástica aguda) y Jeko-1, Granta-519, JVM-2 y Z-138, establecidas a partir de pacientes afectados de linfoma de células del manto (LCM).

Las diferentes líneas fueron tratadas a una concentración estándar de 10 μM , concentración comúnmente empleada en los cribados iniciales de citotoxicidad. Tras 48 horas de tratamiento, la actividad antiproliferativa se determinó mediante el *kit* comercial *Cell Titer-Glo luminiscent assay*, ensayo quimioluminiscente fundamentado en la oxidación de la D-luciferina a oxiluciferina, con la formación simultánea de pirofosfato inorgánico (PPi) y AMP, por acción de una enzima luciferasa recombinante en presencia de ATP y magnesio. Esta enzima genera una señal de luminiscencia estable en condiciones de reacción, al tiempo que inhibe enzimas endógenas liberadas durante la lisis como ATPasas, permitiendo por tanto la detección de células metabólicamente activas a partir de la cuantificación de ATP (*figura 4.50.A*).

La viabilidad celular de las líneas SW620, SMKG-3, Jeko-1, LN229, Jurkat y PC3, representada como porcentaje respecto al control, tras el tratamiento con los diferentes derivados, se muestra en la *figura 4.50.B*. La correspondiente a las líneas SW480, U87MG, U251, U373, Granta-519, JVM-2 y Z-138 se incluyen como material suplementario en el *anexo 1 (figura A1.1)*.

De los 27 compuestos evaluados, tan sólo el derivado indólico **S8e** inhibió la viabilidad celular de manera relativamente significativa en todas las líneas evaluadas. A pesar de la similitud estructural, los análogos de la sulfonamida **S8e** de la misma serie, así como los derivados correspondientes a las demás series, resultaron totalmente inactivos, alcanzando como máximo una reducción de la viabilidad celular del 45% en la línea celular más sensible a **S8e**, Jurkat, tras el tratamiento con los derivados de la serie **S13** (*figura 4.50.B*).

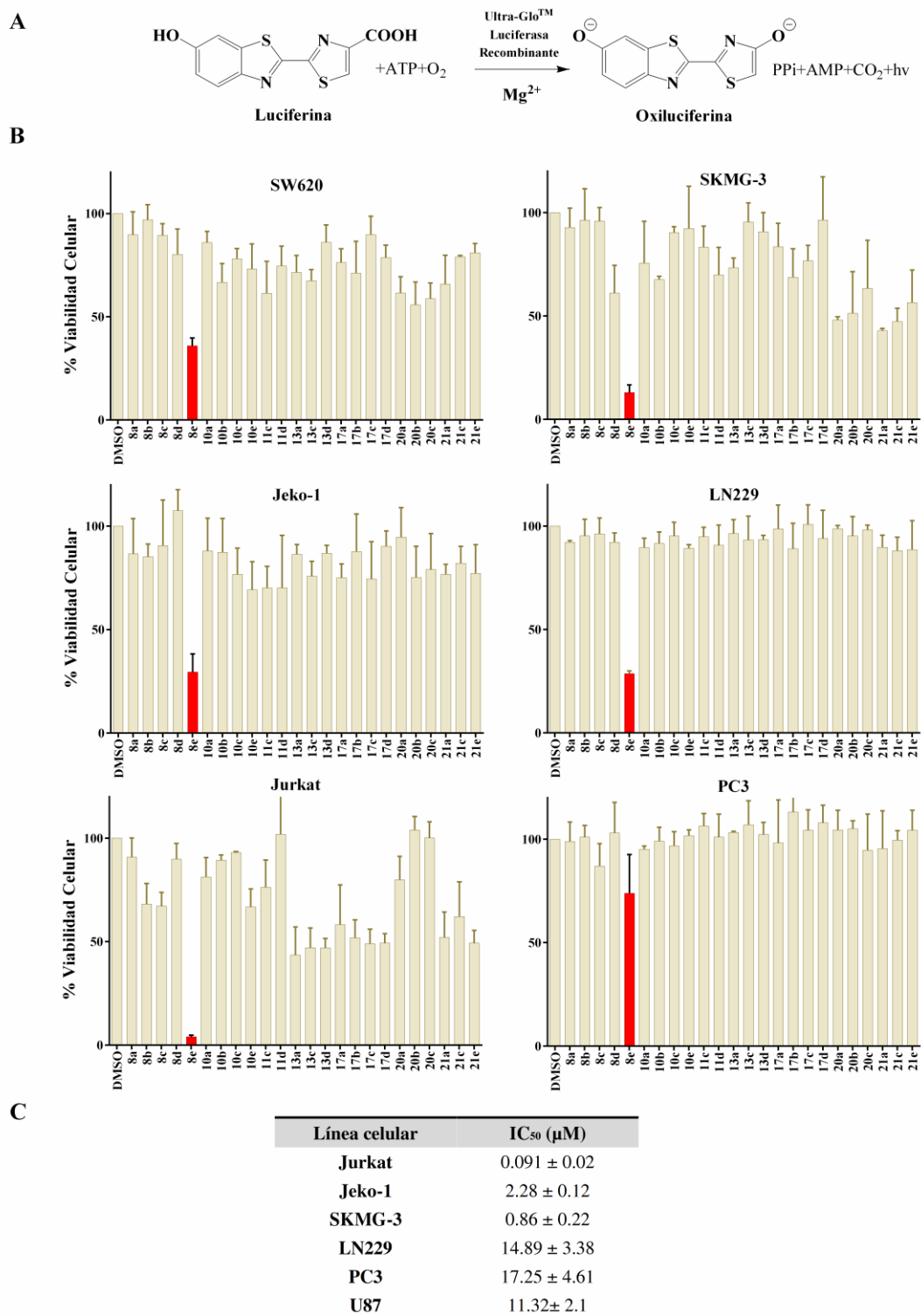


Figura 4.50. Viabilidad celular de un panel de líneas de diferente origen tumoral tratadas con las sulfonamidas de las series S8, S10-11, S13, S17 y S20-21. **A.** Reacción de bioluminiscencia catalizada por la luciferasa recombinante. **B.** Viabilidad celular de las líneas indicadas tras un tratamiento 10 μM durante 48 horas con las sulfonamidas seleccionadas. Los resultados se representan como la media ± SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por triplicado. **C.** Valores IC₅₀ de S8e, en las líneas indicadas, calculados a partir de las curvas dosis-respuesta tras 48 horas de tratamiento.

De acuerdo con la heterogeneidad intrínseca entre las diferentes líneas derivadas del mismo tejido,⁹⁶ el perfil antiproliferativo de **S8e** resultó dependiente de línea, observándose notables diferencias en la reducción de la viabilidad celular entre líneas establecidas a partir de un mismo tipo de cáncer, especialmente en aquellas derivadas de cáncer colorrectal, con una diferencia en la reducción de la viabilidad celular en las líneas SW620 y SW480 del 35 %, o en líneas derivadas de glioblastoma, con una diferencia de casi el 50 % entre las líneas SKMG-3 y U373.

Como parámetro de sensibilidad a **S8e**, determinamos el valor de IC₅₀ a partir de las curvas dosis-respuesta de 6 líneas celulares: Jurkat y Jeko-1 (neoplasias hematológicas) y SKMG-3, LN229 U87MG y PC3 (tumores sólidos). El valor IC₅₀, definido como la concentración de fármaco que produce una reducción de la viabilidad celular en un 50%, constituye un parámetro de eficacia entre diferentes fármacos y, de sensibilidad entre diferentes líneas a un mismo tratamiento.⁹⁷ Los valores obtenidos para la sulfonamida **S8e** se correlacionaron con la diferente sensibilidad observada en los estudios de viabilidad, abarcando un amplio rango de concentraciones, desde 91 nM en la línea más sensible (Jurkat) a 17 µM en PC-3, una de las más resistentes *in vitro* (figura 4.50.C).

Entre de las principales causas de la diferente sensibilidad *in vitro*, o resistencia intrínseca de las líneas celulares para un mismo fármaco, se encuentra la sobreexpresión de transportadores de la superfamilia ABC (*ATP-Binding Cassette*), principalmente P-gp (*Permeability glycoprotein*) y MRP-1 (*Multidrug Resistance-associated Protein 1L*), proteínas de extrusión de fármacos, dependientes de ATP, de naturaleza glicoproteica. Líneas derivadas del mismo tejido pueden presentar una expresión diferencial de estas proteínas, como entre las líneas de glioma, habiéndose demostrado la sobreexpresión en LN229 y no en U87MG.⁹⁸ En nuestro estudio, la sensibilidad de ambas líneas en términos de IC₅₀ fue muy similar, por lo que la susceptibilidad de las diferentes líneas que componen el panel podría no atribuirse a este mecanismo de resistencia intrínseca.

Dada la actividad antiproliferativa exclusiva de la sulfonamida **S8e**, respecto al total de derivados evaluados, sintetizamos nuevos análogos basándonos en los dominios de diversidad estructural (**D1** y **D2**) preestablecidos para nuestra librería (figura 4.51.A):

a) Modificaciones en **D1**

- Considerando que de la serie **S8**, sólo el derivado con un grupo naftaleno **S8e** y no sus análogos bencénicos, presentó actividad antiproliferativa, introducimos en nuestros estudios de actividad antitumoral los derivados de naftalenosulfonamidas de las series **S11**, **S13-S16**, **S18-S20** y **S22**, evaluados anteriormente en los estudios de actividad antiparasitaria, a excepción del derivado **S18e**. Esta modificación permitirá determinar así la influencia de otros heterociclos en **D1**, en lugar del indol de **S8e**, manteniendo el grupo naftaleno. Además, introducimos un nuevo heterociclo, el derivado 5-indolilo (**S9**), análogo a **S8** sin el metilo en posición 2.

b) Modificaciones en **D2**

- En la sulfonamida **S8e** sustituimos el grupo naftaleno por un sistema heterocíclico 8-quinolina (**S8f**).
- En la serie **S9**, manteniendo la sustitución en posición 5, al igual que **S8e**, introducimos un nuevo anillo aromático, un grupo dansilo (**S9b**).

Las estructuras de la totalidad de derivados evaluados en el estudio se muestran en la *figura 4.51.B*. Para una mayor comprensión, los derivados evaluados en el segundo cribado se indican con diferente estilo tipográfico.

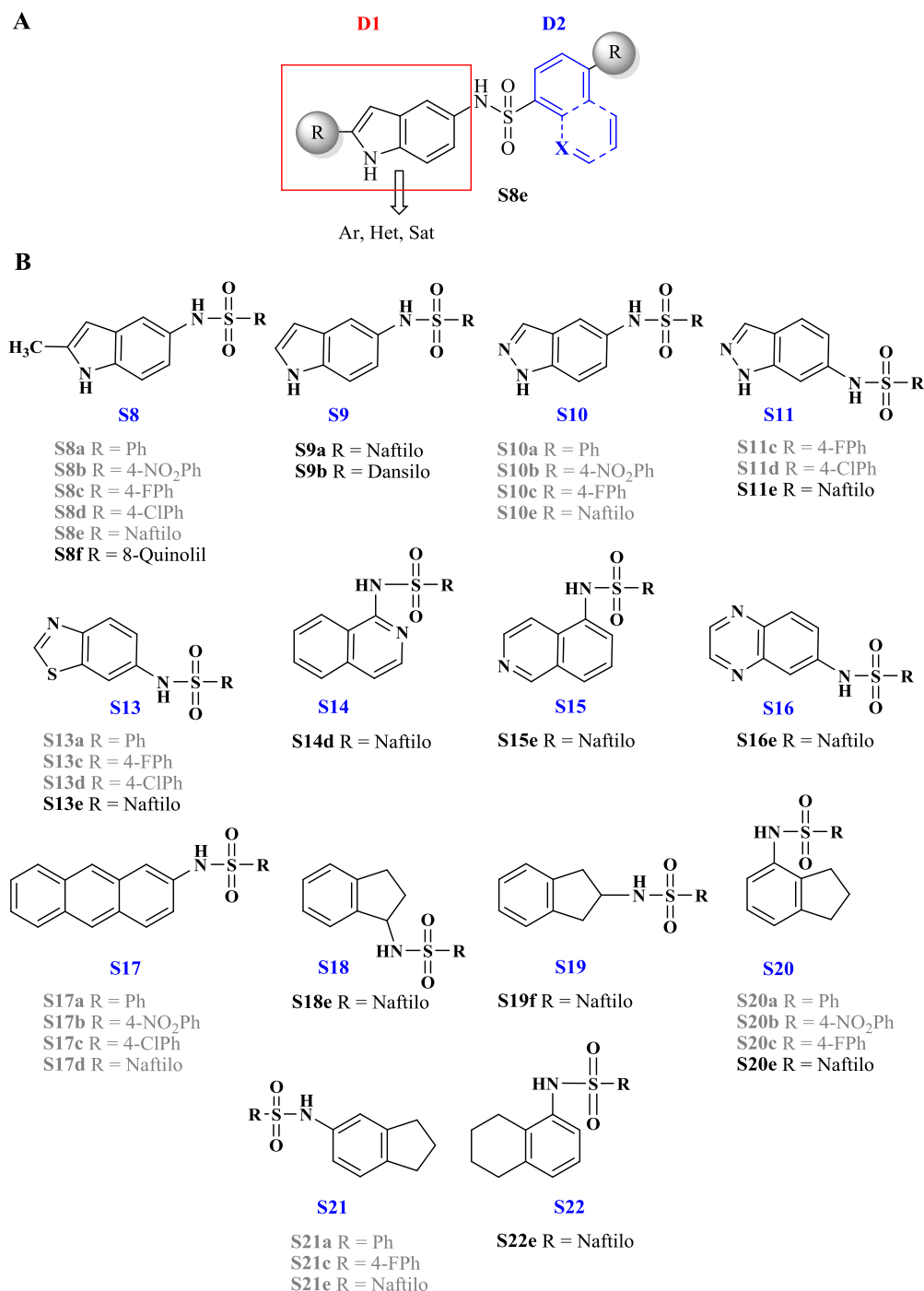


Figura 4.51. Sulfonamidas evaluadas en un segundo *screening* frente a un panel de líneas celulares de diferente origen tumoral. **A.** Dominios de diversidad estructural establecidos en **S8e**, **D1/D2**: Dominios de diversidad estructural; **Ar**: aromático, **Het**: heterociclo; **Sat**: saturado. **B.** Estructura de los derivados de las series **S8-S11** y **S13-S22**.

Este segundo *screening* se realizó en tres líneas celulares de diferente origen tumoral, Jeko-1, SKMG-3 y SW620. La viabilidad celular de estas líneas, tras un periodo de incubación de 48 horas a una concentración 10 μ M, no fue significativamente reducida por los nuevos derivados evaluados. La representación gráfica de los valores obtenidos se incluye como material suplementario en el *anexo I* (figura A1.2).

La observación de que únicamente la sulfonamida **S8e** presentara actividad antiproliferativa del total de los 36 derivados estructuralmente relacionados, sugería que la actividad de la sulfonamida **S8e** era mediada por su interacción con una diana específica. Por lo que se procedió a la caracterización de su mecanismo de acción a nivel celular a partir de un conjunto de ensayos comúnmente empleados en la evaluación antitumoral *in vitro*: determinar su efecto sobre la progresión del ciclo celular, la capacidad de inducción de apoptosis y el daño al ADN.

4.3.2. Estudio del mecanismo de acción a nivel celular de la sulfonamida **S8e**

4.3.2.1. Análisis de la distribución del ciclo celular

Los agentes quimioterapéuticos, en función de su mecanismo de acción, y los reguladores afectados, promueven una distribución característica de una población celular en las diferentes fases del ciclo celular (G0/G1, S, G2/M). Así, el análisis de la distribución de una población celular en cada una de estas fases constituye una herramienta preliminar o complementaria en el estudio de las diferentes vías de señalización y elucidación del mecanismo de acción.⁹⁹

La distribución de las fases se analizó mediante el marcaje con yoduro de propidio (IP) tras el tratamiento con el derivado **S8e** en un panel de líneas representativas. El IP interacciona con polinucleótidos por intercalación en el surco mayor, formando un aducto altamente fluorescente que se excita a 535 nm y emite a 617 nm. Dado que se une en relaciones estequiométricas, la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN.¹⁰⁰

Al pasar una suspensión celular, previamente marcada con IP, con el citómetro proporciona un histograma donde el eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia y el eje de ordenadas el número de células. Esta distribución permite diferenciar hasta 3 subpoblaciones celulares en función de su dotación cromosómica, y por tanto, extrapolables a las distintas fases del ciclo celular: se observa un pico G0/G1 correspondiente a las células de contenido diploide (2N), al doble de intensidad de fluorescencia se sitúa el pico G2/M, correspondiente a células tetraploides (4N), y entre ambos, una meseta de valores intermedios correspondiente a la fase S o de síntesis. En ocasiones también puede observarse un pico a una intensidad de fluorescencia menor al pico G0/G1, se trata de células hipodiploides (subG1), indicativo de muerte celular.

Realizamos un primer estudio en 6 líneas celulares (Jeko-1, Jurkat, NIH3T3, LN229, U87MG y PC3), tras 24 horas de tratamiento con el derivado **S8e**, a una concentración estándar de 10 μ M. El análisis cuantitativo posterior de las diferentes subpoblaciones evidenció un aumento considerable de la población celular en la fase mitótica o G2/M en todas las líneas evaluadas (figura 4.52.A).

Posteriormente, se llevó a cabo el mismo ensayo con un tratamiento de 48 horas en las líneas LN229 y PC3. Como se muestra en la *figura 4.48.B*, la parada en G2/M resultó tiempo-dependiente, observándose un incremento de alrededor del 20% en esta fase del ciclo celular en ambas líneas evaluadas, sin una detección apreciable de picos en SubG1, indicativo de muerte celular.

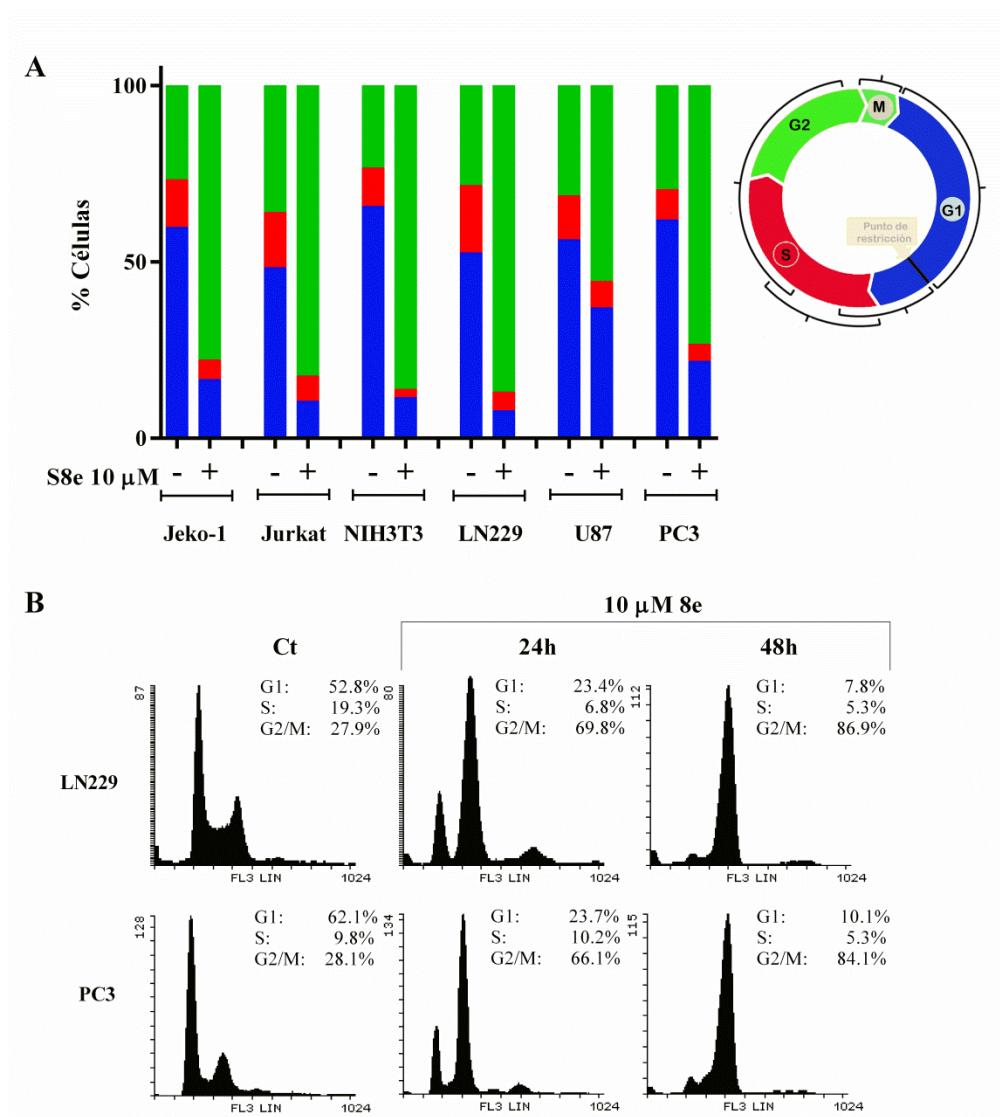


Figura 4.52. Análisis de la distribución del ciclo celular de un panel de líneas celulares tras el tratamiento con la sulfonamida S8e. **A.** Distribución porcentual de las distintas fases del ciclo celular en las líneas indicadas, previo tratamiento con la sulfonamida S8e a una concentración 10 μM durante 24 horas. **B.** Histogramas representativos de tres experimentos independientes en las líneas celulares LN229 y PC3 tras 24 y 48 horas de tratamiento con la sulfonamida S8e a una concentración 10 μM.

4.3.2.2. Senescencia

La senescencia celular se define como un estadio en el que las células, manteniendo su viabilidad y actividad metabólica, pierden su capacidad antiproliferativa, resultando en una parada irreversible del ciclo celular, ya sea en la fase G1/G0 o G2/M.

El tratamiento con **S8e** provocó una parada prolongada en G2/M sin detección de células hipodiploides, por lo que pasamos a determinar si la parada del ciclo está relacionada con la inducción de senescencia.

Para confirmar la inducción de senescencia, utilizamos el *kit Senescence Cells Histochemical Staining*. El ensayo permite detectar la actividad β -galactosidasa de la SA- β -gal lisosomal a pH 6, característica del estado senescente, utilizando como sustrato cromogénico el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal, **3**).¹⁰¹ El X-gal es hidrolizado por la enzima dando lugar a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol (**4**). Posteriormente este producto de reacción es oxidado a 5-5'-dibromo-4-4'-dicloroindigo (**5**), que al dimerizar da un precipitado de color azul fácilmente detectable al microscopio (*figura 4.53.A*).

El análisis microscópico de la tinción azul a las 24, 48 y 72 horas en la línea PC3, tras el tratamiento con **S8e** a una concentración 10 μ M, permitió evidenciar la inducción de senescencia. Mientras las células control no presentaron células β -gal positivas, éstas aumentaron considerablemente en las células tratadas con **S8e**. Como se observa en la *figura 4.53.B*, el aumento de células senescentes se correlacionó con el aumento de la subpoblación celular en la fase G2/M de las 24 a las 48 horas de tratamiento, alcanzándose hasta un 80% de células senescentes a las 72h de tratamiento.

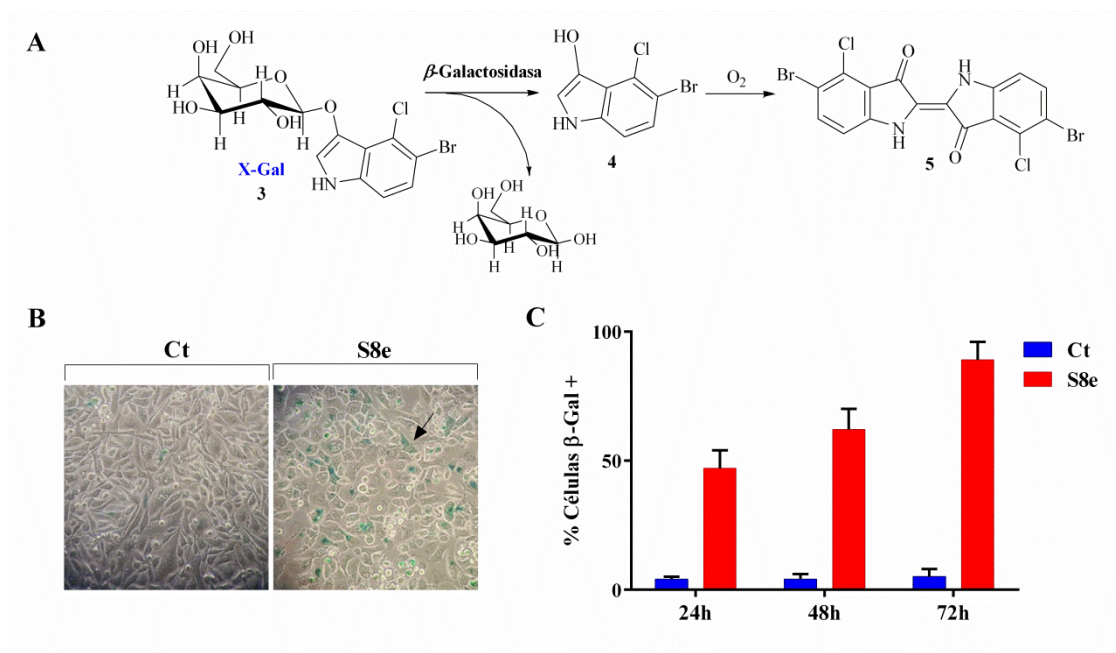


Figura 4.53. Análisis de la inducción de senescencia por la sulfonamida **S8e** en PC3. **A.** Reacción de hidrólisis del X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) por la actividad β -galactosidasa de la SA- β -gal lisosomal. **B.** Imágenes representativas de la inducción de senescencia en ausencia (Ct) o presencia de la sulfonamida **S8e** (10 μ M) durante 24 horas. **C.** Porcentaje de células β -gal positivas tras el tratamiento con la sulfonamida **S8e** a una concentración 10 μ M durante los tiempos indicados. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes.

4.3.2.3. Inducción de apoptosis

La citotoxicidad de muchos agentes quimioterapéuticos se correlaciona directamente con la activación de muerte celular programada, ya sea por un mecanismo de apoptosis, de autofagia o de necroptosis o la simultaneidad o bien la progresión consecutiva de los mismos.

La capacidad de la inducción de apoptosis por la sulfonamida **S8e** se evaluó mediante la detección de dos eventos característicos del proceso apoptótico: 1) activación de caspasas y 2) pérdida de la asimetría de la membrana plasmática por externalización de la fosfatidilserina (FS).

A. Activación de caspasas ejecutoras -3 y -7

En primer lugar determinamos la actividad de las caspasas -3 y -7, caspasas ejecutoras, donde convergen ambas vías de activación (extrínseca o intrínseca) de la apoptosis. La detección del zimógeno activado se realizó mediante el *Kit Caspase-Glo[®]3/7 Assay*, a partir de un sustrato proluminescente, con la secuencia tetrapeptídica de proteólisis DEVD de estas caspasas. Tras su hidrólisis se libera el sustrato de la luciferasa, la aminoluciferina, generando una señal luminiscente directamente proporcional a la actividad de las caspasas -3/-7 (*figura 4.54. A*).

Dada la simplicidad del ensayo, se llevó a cabo con el mismo panel de líneas celulares empleado para determinar la viabilidad celular, e introducimos una nueva línea celular, NIH3T3. El objetivo era estimar, *a priori*, si el proceso de muerte es dependiente de caspasas, por correlación entre su inducción y la citotoxicidad observada.

Los niveles de inducción de las caspasas-3 y -7, expresados como *fold increase* respecto al control, se correlacionaron inversamente a la viabilidad celular detectada para cada línea celular. Tras 48 horas de tratamiento con el derivado **S8e**, en cada una de las líneas en las mismas condiciones de ensayo, se detectó una mayor actividad caspasa a una menor viabilidad celular.

Posteriormente, se analizó la expresión de la activación proteolítica de la caspasa-3. Su detección, en LN229 y SKMG-3, a diferentes tiempos de tratamiento con el derivado **S8e**, permitió confirmar una activación progresiva, en correlación con la sensibilidad descrita para ambas líneas. En SKMG-3, una de las líneas de mayor sensibilidad a **S8e** ($IC_{50(S8e)} = 0.86 \pm 0.22$), los dos fragmentos correspondientes al zimógeno activado (p17 y p12), se detectaron a las 16 horas de tratamiento, con un claro aumento de su expresión a las 24 y 48 horas. Por el contrario, en LN229, línea celular de menor sensibilidad a **S8e** ($IC_{50(S8e)} = 14.89 \pm 3.38$), la detección de ambos fragmentos se evidenció a partir de las 24 horas de tratamiento (*figura 4.54. B*).

Los resultados obtenidos, tanto en el ensayo enzimático con el sustrato pro-luminiscente de ambas caspasas ejecutoras, -3 y -7, así como la expresión del zimógeno activado de la caspasa-3, confirman que el tratamiento con el derivado **S8e** provoca la muerte celular programada por medio de un proceso apoptótico mediado por caspasas.

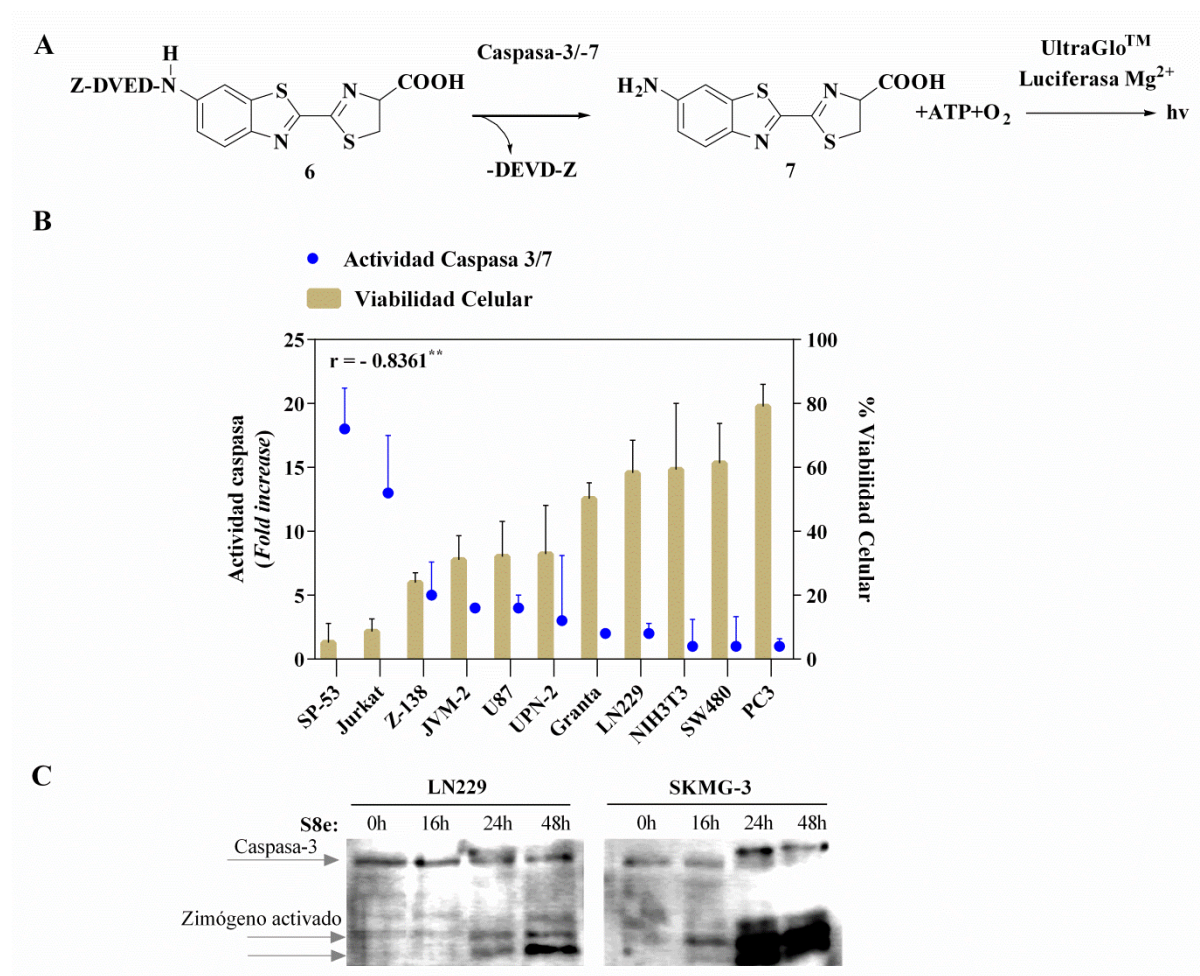


Figura 4.54. Análisis de la actividad caspasa inducida en un panel representativo de líneas celulares tras 48 horas de tratamiento con la sulfonamida **S8e** a una concentración 10 μM . **A.** Reacción de bioluminiscencia a partir del sustrato proluminescente de caspasas ejecutoras -3/-7. **B.** Análisis de correlación actividad caspasa-viabilidad celular; el coeficiente de *Pearson* (r) indica una correlación significativa para un intervalo de confianza de 0.95 (** $p < 0.05$). Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por triplicado. **C.** Detección del zimógeno activado de la caspasa-3 en las líneas celulares y tiempos de tratamiento.

B. Determinación del porcentaje de apoptosis

La inducción de apoptosis se cuantificó mediante el doble marcaje con IP y anexina V-FITC (FITC, *Fluorescein IsoTioCyanate*). El ensayo permite diferenciar las células vivas de las necróticas y apoptóticas, estas últimas diferenciándose su vez en apoptóticas tempranas y tardías. La posibilidad de detección de estos cuatro estadios es inherente a las propiedades de permeabilización del IP, así como a la externalización de la FS en los estadios tempranos del proceso apoptótico.

El IP sólo puede atravesar la membrana plasmática si existe una desestructuración de la misma. Por lo tanto, a diferencia de las células vivas y apoptóticas en estadio temprano, tan sólo las

células necróticas o en apoptosis tardía, donde se incrementa la permeabilización de la membrana, presentarán marcaje con IP.

La FS es un fosfolípido localizado en la cara interna de la membrana plasmática. Durante los estadios tempranos del proceso apoptótico sufre un proceso de translocación y se externaliza al citosol con fines de señalización. Las investigaciones en la translocación de este fosfolípido permitieron el hallazgo de la anexina V, una proteína de 35-36 kDa que se unía, en presencia de calcio, de manera específica y con alta afinidad a la FS. Basándose en el fenómeno de translocación de la FS y en la capacidad de su reconocimiento por la anexina V, se describió el método de detección de células apoptóticas, a partir de anexina V marcada con un hapteno extrínseco como isotiocianato de fluoresceína.¹⁰²

El análisis por citometría de flujo de una población celular con doble marcaje de AnexinaV-FITC, de emisión a 518 nm, y IP de emisión a 617 nm, permite distinguir hasta cuatro subpoblaciones representadas en un *dot-plot* por cuatro cuadrantes (*figura 4.55*):¹⁰³

1) **Células vivas** (*cuadrante III*): no presentan translocación de FS y tienen la membrana íntegra (Anexina V-FITC –, IP –).

2) **Células apoptóticas tempranas** (*cuadrante IV*): presentan translocación de FS, pero tienen aún su membrana íntegra. Emiten niveles altos de fluorescencia verde debido al marcaje con AnexinaV-FITC (Anexina V-FITC +, IP –).

3) **Células apoptóticas tardías** (*cuadrante II*): presentan translocación de FS y tienen la membrana dañada, asociada a un proceso de necrosis secundaria.¹⁰⁴ Emiten niveles altos de fluorescencia roja y verde debido al marcaje con AnexinaV-FITC y IP (Anexina V-FITC +, IP +).

4) **Células necróticas** (*cuadrante I*): pierden la capacidad de mantener la integridad de membrana, por lo que emitirán niveles altos de fluorescencia roja debido al marcaje con IP (Anexina V-FITC –, IP +).

El tratamiento con el derivado **S8e** de las líneas LN229 y PC3, a una concentración 10 μ M, resultó en un aumento progresivo de las células apoptóticas. En los diferentes *dot-plots* obtenidos a las 24 horas de tratamiento se observó un claro desplazamiento de la población de células vivas a los cuadrantes II y IV. Si bien este desplazamiento resultó más evidente en la línea PC3, la cuantificación de la totalidad de células apoptóticas (temprana + tardía), a las 72 horas de tratamiento, fue significativamente superior en LN229 (*figura 4.55*).

Ante un parada prolongada del ciclo celular en G2/M, las células pueden directamente iniciar un proceso de muerte celular, o salir de mitosis con una dotación poliploide (adaptación mitótica). En estas condiciones de poliploidía, además de promover un proceso de muerte celular programada, pueden permanecer en un estado metabólicamente activo sin capacidad de división (senescencia).¹⁰⁵ Por lo tanto, los resultados obtenidos se corresponden con la respuesta ante una parada prolongada del ciclo celular en G2/M, con la inducción de senescencia y activación de apoptosis mediada por caspasas.

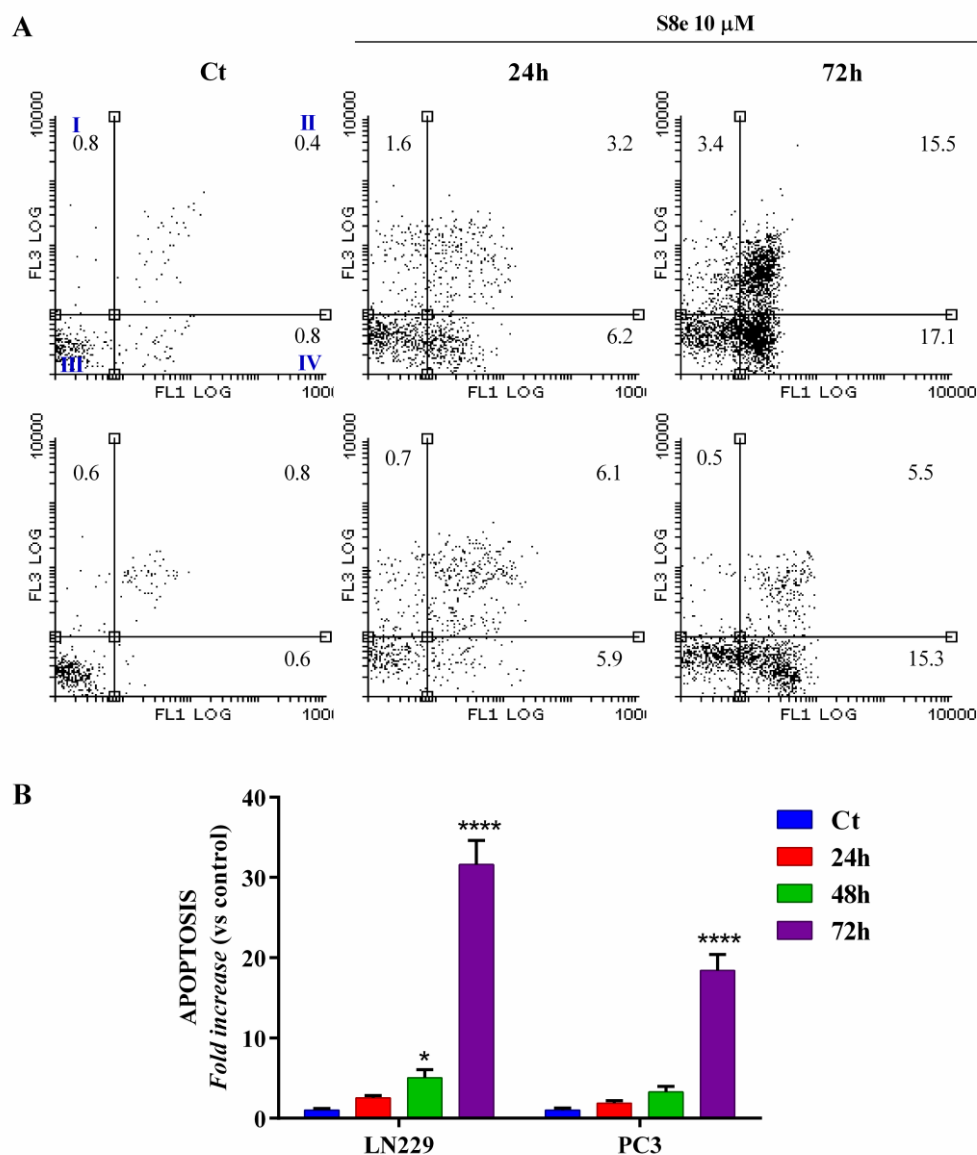


Figura 4.55. Análisis de la inducción de apoptosis por la sulfonamida **S8e** en LN229 y PC3. **A.** *Dot-plots* representativos de tres ensayos independientes tras el tratamiento con la sulfonamida **S8e** a una concentración 10 μ M durante los tiempos indicados. **B.** Representación de la inducción de apoptosis por la sulfonamida **S8e** (10 μ M) como *fold increase* respecto a las células no tratadas (Ct) en los tiempos indicados. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student indica diferencias significativas entre los tratamientos y el control (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$).

4.3.2.4. Análisis del daño al ADN

Las bases moleculares de la inducción de senescencia se atribuyen a una respuesta de daño al ADN, resultando en la acumulación de inhibidores de CDKs, p21 y p16, que bloquean la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb)¹⁰⁶ y en consecuencia promueven la parada del ciclo celular.

La detención observada en G2/M, tras el tratamiento con la sulfonamida **S8e**, indicaba que este derivado inhibía la proliferación celular al prevenir la entrada en mitosis o su finalización, junto con la inducción de senescencia y muerte celular programada por apoptosis. Estos resultados son compatibles con la activación de la vía de control G2 para prevenir la entrada en mitosis después de la detección de daño del ADN,¹⁰⁷ observada normalmente en respuesta a agentes genotóxicos. En base a esta consideración, nos propusimos determinar si el derivado **S8e** se trataba de un agente genotóxico. Para ello, monitorizamos los niveles de la fosforilación de la histona H2AX (γ -H2AX) y la capacidad clonogénica de las células.

A. Detección de γ -H2AX

La γ -H2AX, variante de la familia de histonas H2A, es rápidamente fosforilada en la Ser139 de su motivo SQ en su extremo carboxi-terminal ante una doble rotura de ADN (DSB, *Double Strand Breaks*). Es uno de los primeros eventos detectados en las células al cabo de unos minutos tras la exposición a radioterapia o agentes genotóxicos.

Ante un daño en el ADN, la histona es rápidamente fosforilada por los tres miembros de la familia PIKK (*Phosphatidylinositol 3-Kinase-related Kinases*): ATM (*Ataxia-Talangiectasia Mutated*), ATR (*ATM and Rad 3 Related*) y DNA-PKcs (*DNA-Protein kinase catalytic subunit*), que actúan como transductores de la señal a través de proteínas mediadoras formando un ensamblado secuencial de proteínas de reparación. Además, la fosforilación no se localiza exclusivamente en el daño sino que se expande a su alrededor a una región extensa de cromatina (~2 Mb de cromatina; 2000 moléculas de γ -H2AX), por lo que una vez alcanzados sus niveles máximos, en unos 30 minutos, es fácilmente detectable por la formación de *foci*¹⁰⁸

La utilización de un determinado anticuerpo, monoclonal o policlonal, frente al péptido fosforilado CKATQAS(PO₄)QEY permite determinar los niveles totales de la histona fosforilada (γ -H2AX) directamente en el núcleo o por FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)¹⁰⁹.

En nuestro estudio realizamos la detección mediante citometría de flujo, monitorizando la intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti- γ -H2AX-Alexa 555, tras un tratamiento de 4 horas con **S8e** (10 μ M), en las líneas LN229, Z-138 y SP53.

En los histogramas resultantes de las tres líneas evaluadas se observó un evidente aumento de la intensidad de emisión respecto a los obtenidos para las células control. La cuantificación posterior de la fosforilación, en términos de *fold increase*, resultó de hasta 6 órdenes de magnitud, registrándose valores muy similares para las tres líneas evaluadas (*figura 4.56.A y B*).

Los elevados niveles de fosforilación detectados, tras un breve tratamiento con la sulfonamida **S8e**, junto con los resultados anteriormente descritos, sustentaban el planteamiento de que el derivado **S8e** se tratara de un agente genotóxico.

B. Determinación de la capacidad clonogénica

El ensayo de clonogenicidad o clonogénico es un método experimental *in vitro* que permite determinar en qué proporción varía la capacidad de formación de colonias de una población celular, tras su exposición a agentes antitumorales, en condiciones de cultivo de muy baja densidad celular.

Desde su descripción en 1956 por Puck y Marcus, ha sido ampliamente utilizado en el campo de la radioterapia y quimioterapia, donde la capacidad clonogénica, expresada como fracción de supervivencia, se correlaciona con diferentes dosis de irradiación o fármaco permitiendo determinar la dosis letal y la sensibilidad del tipo celular.¹¹⁰

Con la finalidad de confirmar la genotoxicidad de la sulfonamida **S8e**, realizamos ensayos clonogénicos en las líneas LN229 y PC3. Al igual que en el ensayo de detección de γ -H2AX, establecimos un pre-tratamiento de 4 horas a una concentración 10 μ M, utilizando como control positivo un agente genotóxico, el etopósido, a una concentración de 30 μ M. Curiosamente, el tratamiento con **S8e** no inhibió la capacidad clonogénica en ambas líneas, a diferencia del etopósido, resultando la formación de colonias cuantitativamente similar a las células no tratadas (*figura 4.56.C*).

El mantenimiento de la capacidad clonogénica, a pesar de detectarse γ -H2AX, evidenció que **S8e** no limitaba la integridad reproductiva celular, característica de agentes genotóxicos. En vista de esta contradicción, monitorizamos directamente la activación de daño al ADN mediante el análisis de los niveles de fosforilación de la quinasa Chk1 mediante *Western blot*. La detección se realizó a partir de los extractos proteicos, de la línea celular PC3, obtenidos a las 4, 16 y 24 horas de tratamiento a una concentración 10 μ M con **S8e**. Al igual que en los ensayos de clonogenicidad, realizamos un tratamiento paralelo con etopósido (30 μ M), como control positivo. .

Como se muestra en la *figura 4.56.D*, no se detectó un aumento progresivo de *p*-Chk1, observado para las células tratadas con etopósido. La ausencia de fosforilación de Chk1 confirmaba, por tanto, que el derivado **S8e** no promovía una activación del *checkpoint* en la transición G2/M.

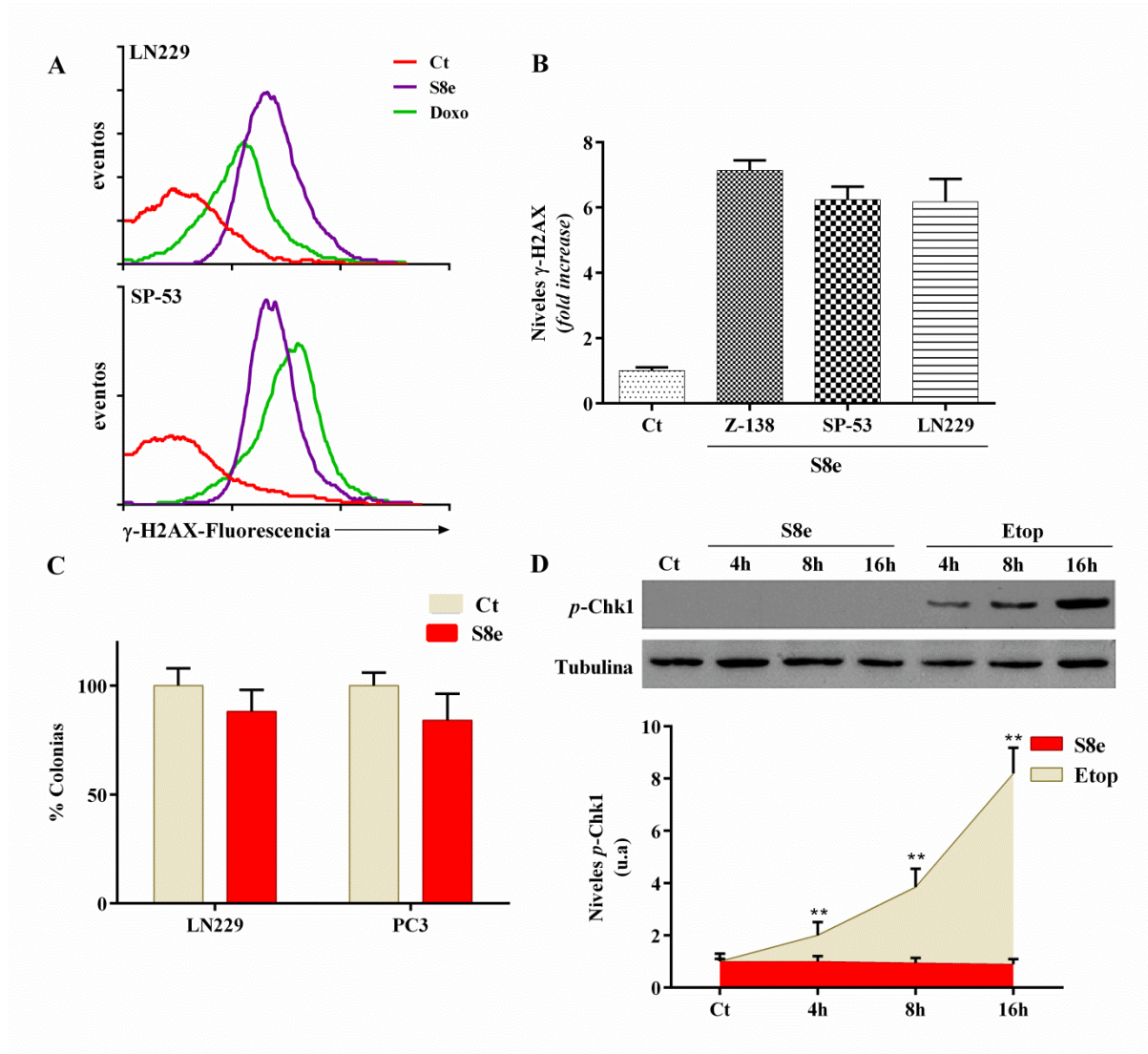


Figura 4.56. Análisis de la inducción del daño al ADN por la sulfonamida **S8e**. **A.** Histogramas representativos de tres ensayos independientes de la detección de γ -HA2X en las líneas indicadas, previo tratamiento de 4 horas con la sulfonamida **S8e** a una concentración 10 μ M y doxorubicina (**DOXO**) a una concentración 1 μ M. **B.** Representación gráfica de los niveles de γ -HA2X como *fold increase* respecto a las células no tratadas (Ct) en las líneas indicadas, previo tratamiento de 4 horas con la sulfonamida **S8e** a una concentración 10 μ M. **C.** Porcentaje de colonias formadas en condiciones de baja densidad celular tras el tratamiento de la sulfonamida **S8e**, en las líneas indicadas, a una concentración 10 μ M y etopósido (**Etop**) a una concentración 30 μ M durante 4 horas. **D.** Detección y cuantificación de *p*-Chk1, previo tratamiento con la sulfonamida **S8e**, a una concentración 10 μ M y etopósido (**Etop**) a una dosis 30 μ M en PC3 durante los tiempos indicados; *immunoblot* representativo de tres ensayos independientes y cuantificación de los niveles de *p*-Chk1. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por duplicado. El análisis estadístico de la prueba *t* de *Student* indica diferencias significativas entre los tratamientos y el control (** $p < 0.01$).

C. Estudios de interacción con ctDNA

Paralelamente a los estudios anteriormente descritos, considerando que el derivado **S8e** se trataba de un agente genotóxico, analizamos su capacidad de interacción *in vitro* con ADN liofilizado de timo de ternera (ctDNA, *calf thymus DNA*) y, en su caso, determinar la constante de afinidad. Para ello llevamos a cabo una serie de ensayos basados en las propiedades espectroscópicas del compuesto, en nuestro caso la sulfonamida **S8e**, o del polinucleótido utilizado: estudios de desnaturalización térmica, valoraciones fluorométricas, desplazamiento de bromuro de etidio (BrEt) y estudios de dicroísmo circular (DC).

La desnaturalización del ADN es un proceso definido por la transición de su forma doble-hebra a su forma disociada en mono-hebra por la rotura de los puentes de hidrógeno establecidos entre los pares de bases. La temperatura a la cual las dos especies permanecen en equilibrio se denomina temperatura de fusión (T_m , *Melting point*), registrada por UV-Vis por un claro efecto hipercrómico en el máximo de absorción ($\lambda = 260$ nm), debido a una reducción de las interacciones electrónicas en el apilamiento de las bases. La representación de la intensidad de absorción a 260 nm en un intervalo gradual de temperaturas describe una curva de transición térmica sigmoidea, correspondiéndose la temperatura de fusión con el punto de mayor pendiente en el salto de la curva (el máximo de la primera derivada).¹¹¹

La interacción de la sulfonamida **S8e** a diferentes relaciones molares ($r = [\text{S8e}]/[\text{polinucleótido}]$) se consideró prácticamente nula, debido a la pobre desestabilización de la doble hebra a las mayores relaciones molares determinadas ($r = 0.1$, $\Delta T_m = -0.19$; $r = 0.5$, $\Delta T_m = -0.92$), considerando un intervalo de error del método de ± 0.5 .

Posteriormente, estudiamos la interacción de la sulfonamida **S8e** por espectroscopía de fluorescencia. La excitación a una longitud de onda (λ) donde absorbe un compuesto y no el polinucleótido, tras la adición de pequeñas alícuotas de una disolución de ADN para determinadas relaciones molares, permite registrar las variaciones de fluorescencia asociadas a su interacción con el ADN. El procesado posterior de los datos obtenidos en la valoración permite determinar la estequiometría, así como la constante de afinidad (K_s).¹¹²

En nuestro estudio monitorizamos los cambios espectrales de la banda de emisión correspondiente al grupo naftaleno ($\lambda_{exc} = 300$ nm; $\lambda_{em} = 330$ nm) de la sulfonamida **S8e**. Como se observa en la *figura 4.57.A*, la adición de cantidades crecientes de ctDNA a una disolución de 1×10^{-4} M de **S8e** no provocó cambios en el espectro de emisión a una $r_{m\acute{a}x} = 5$.

Adicionalmente, realizamos estudios de desplazamiento con un agente intercalante fluorescente de ADN, el bromuro de etidio (BrEt). El BrEt no muestra fluorescencia en disolución pero aumenta exponencialmente al interacción con ADN mediante intercalación entre los pares de bases. Puesto que presenta una constante de afinidad moderada con el ADN ($\sim 10^5$ M⁻¹),¹¹³ el BrEt puede desplazarse por un agente con una mayor afinidad y, por tanto, producir una disminución de la fluorescencia. El análisis de los espectros permite determinar la estabilidad del complejo formado a partir del parámetro IC_{50} , definido como la concentración necesaria de compuesto para reducir un 50 % la emisión inicial del BrEt.¹¹⁴

Los ensayos se realizaron monitorizando el máximo de emisión de fluorescencia del BrEt ($\lambda_{exc} = 520$ nm, $\lambda_{em} = 540-680$ nm) con la adición de pequeñas alícuotas de una disolución de la

sulfonamida **S8e** para determinadas relaciones molares. Aunque se observó una disminución progresiva de la intensidad de fluorescencia del BrEt, el IC_{50} registrado para **S8e** fue menor de 0.05, confirmando de nuevo una despreciable interacción (*figura 4.57.B*).

Por último, estudiamos la interacción de la sulfonamida **S8e** con el ADN mediante dicroísmo circular (DC). El DC es un técnica espectroscópica que permite el estudio de las variaciones conformacionales de cromóforos asimétricos o cromóforos simétricos en un ambiente hidrofóbico, como es la molécula de ADN. Está basada en la diferencia de absorbancia de la luz polarizada hacia la izquierda y hacia la derecha. El espectro de DC del ctDNA presenta una banda positiva a 270 nm, correspondiente a las interacciones π -stacking y una banda negativa a 239 nm debido a la helicidad del B-DNA.¹¹⁵ Si la interacción de una molécula produce cambios en la conformación del ADN, se registran cambios en las bandas de absorción, cuyo sentido e intensidad puede permitir determinar la orientación del cromóforo respecto a la doble hélice.¹¹⁶

En nuestro estudio, la sulfonamida **S8e** no provocó ningún cambio apreciable en el espectro de DC del ctDNA (*figura 4.57.C*), por lo que puede concluirse que, en correlación a los resultados obtenidos con los diferentes estudios espectroscópicos, la sulfonamida **S8e** presenta una inapreciable afinidad por el ctDNA.

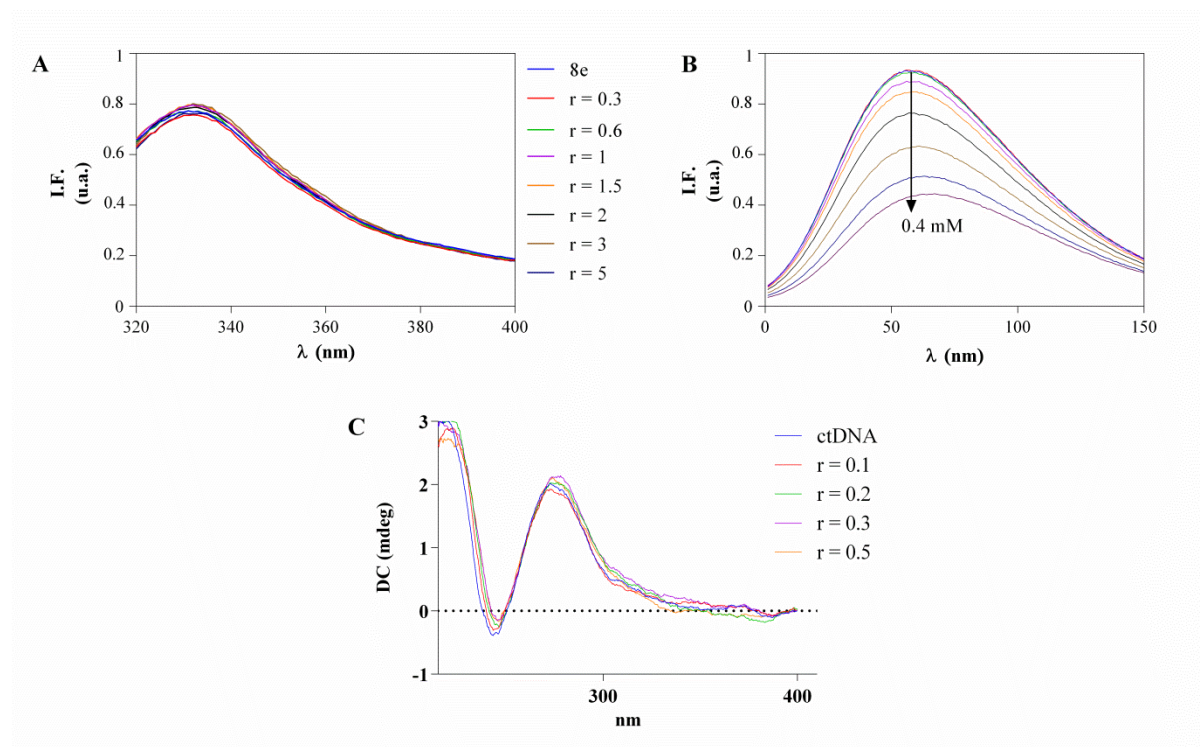


Figura 4.57. Estudios de interacción de la sulfonamida **S8e** con ctDNA. **A.** Espectros de fluorescencia registrados de la sulfonamida **S8e** ($c = 1.0 \times 10^{-4}$ M, $\lambda_{exc} = 300$ nm) a pH 7.0 en cacodilato de sodio $I = 0.05$ M, tras la adición de alícuotas de una disolución de ctDNA para las relaciones molares indicadas. **B.** Espectro de fluorescencia registrados para el BrEt tras la adición de alícuotas de una disolución de la sulfonamida **S8e** ($c = 9.0 \times 10^{-6}$ M), $r[EtBr]/[ctDNA] = 0.3$ a pH 7.0. **C.** Espectros de DC de ctDNA ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ M) a las relaciones molares indicadas con la sulfonamida **S8e**.

El mantenimiento de la capacidad clonogénica de las células y la ausencia de activación del *checkpoint* en G2 tras el tratamiento con **S8e**, junto con la baja constante de afinidad del compuesto por el ctDNA, confirmaron que los efectos a nivel celular observados no se debían a un mecanismo de genotoxicidad a pesar de los niveles detectados de γ -H2AX.

La explicación más plausible para la detección de la γ -H2AX, en ausencia de otras evidencias de DSB (*Double Strand Breaks*), puede ser debida a su función no canónica en un proceso denominado *pseudo*-daño al ADN (*pseudo*-DDR, *pseudo*-DNA Damage Response), descrito por primera vez por Pospelova *y col.*¹¹⁷ Los autores demostraron que, tras la inducción de senescencia, por activación de p21 o p16, se activaban marcadores específicos de daño al ADN, específicamente la formación de *foci* de γ -H2AX y una señalización nuclear uniforme de p-ATM. Sin embargo, en el ensamblaje secuencial de proteínas mediadoras, transductoras y efectoras que conforman el núcleo de reparación de la doble hélice DSB, observaron notables diferencias con respecto a una típica activación de DDR por agentes genotóxicos. Los autores observaron una cinética temporal de DDR ralentizada, con ausencia de la co-localización en los *foci* de γ -H2AX de la proteína mediadora 53BPI, necesaria para la activación de proteínas transductoras como Chk1 y Chk2.¹¹⁷ En estas condiciones de activación, la DDR supone una consecuencia, y no la causa, de la inducción de senescencia acelerada, y el *pseudo*-DDR constituye un mecanismo de perpetuación del fenotipo senescente para proteger a las células en su reentrada al ciclo celular con las aberraciones cromosómicas derivadas. Estudios posteriores han confirmado que la fosforilación de H2AX no se atribuye exclusivamente a un marcador con una función restrictiva ante un daño en el ADN, sino a otros procesos celulares con funciones estructurales y de señalización, entre ellos la senescencia, en diferentes tipos celulares.¹¹⁸

4.3.3. Estudio de la alteración microtubular por la sulfonamida **S8e**

Tras descartar la parada prolongada en la fase G2/M como consecuencia de una activación del *checkpoint* en G2, consideramos la interrupción de la progresión mitótica como el principal mecanismo por el cual el derivado **S8e** ejerce su acción antiproliferativa. Por otra parte, los efectos celulares observados con el tratamiento con **S8e** se corresponden con la respuesta característica de compuestos citotóxicos capaces de alterar la dinámica microtubular, como son los agentes de unión a la tubulina (TBA, *Tubulin Binding Agents*). Esta clase de compuestos es ampliamente conocida, como el Paclitaxel o derivados de la vinca. Entre ellos, se incluyen además derivados de sulfonamidas estructuralmente relacionados con el derivado **S8e**.¹¹⁹

Teniendo en cuenta la capacidad de determinadas sulfonamidas de nuestra librería de alterar la organización microtubular en su actividad antiparasitaria, junto con los efectos a nivel celular observados tras el tratamiento con el derivado **S8e** (parada en G2/M, senescencia en ausencia de DDR, apoptosis), determinamos si **S8e** podría tratarse de un TBA. Para lo cual, analizamos la disposición de las fibras fusiformes que conforman la red de microtúbulos por microscopía confocal, previo marcaje con el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina.

El tratamiento de las líneas celulares NIH3T3, T98G, LN229 y MCF-7 con el derivado **S8e** durante 24 horas provocó una desorganización del ensamblado microtubular, restringida preferentemente a la región perinuclear, manteniéndose en las condiciones de cultivo en las células no

tratadas la disposición común de las fibras fusiformes (*figura 4.58.A*). Además, a tiempos prolongados de tratamiento (> 48 horas), se observaron células micronucleadas, alteración morfológica característica de catástrofe mitótica, observada comúnmente tras el tratamiento con agentes TBA.¹²⁰

Posteriormente, con la finalidad de confirmar si la inhibición del ensamblaje microtubular impide la progresión de las células sincronizadas a la fase mitótica del ciclo celular en presencia del derivado **S8e**, analizamos la disposición de los microtúbulos en células previamente sincronizadas de la línea celular NIH3T3, por privación de suero, en la fase celular G1.

Tras 48 horas, las células fueron suplementadas con FCS para su reentrada en el ciclo celular, tratadas con el derivado **S8e** 10 (μM) o sin tratar (células control) y fijadas a las 24, 26 y 30 horas. Como se observa en la *figura 4.58.B*, en las células tratadas, a diferencia de las células control, no se observaron los eventos característicos que definen las fases del proceso de mitosis: la formación del huso mitótico y disposición ecuatorial de los cromosomas en el anillo preprofásico, o la división sincronizada en las etapas de anafase y telofase que preceden al proceso de citocinesis.¹²¹

4.3.4. Ensayo de polimerización de la tubulina *in vitro*

La interferencia del derivado **S8e** en la polimerización de la tubulina se confirmó analizando la cinética de polimerización *in vitro* de tubulina monomérica purificada, en ausencia y presencia del compuesto **S8e**, mediante el kit *tubulin polymerization assay*.

El ensayo es una adaptación del método original descrito por Shelanski *y col.*,¹²² y Lee *y col.*¹²³, quienes demostraron que la dispersión de la luz es directamente proporcional a la polimerización de los microtúbulos. Ésta es monitorizada por los cambios de absorbancia a 340 nm en un periodo de 60 minutos a una temperatura de 37 °C. En ausencia de agentes de unión a la tubulina, la cinética de polimerización, definida mediante estas dos variables, describe una curva característica, donde se diferencian hasta tres regiones o tramos. Inicialmente, correspondiéndose con la absorbancia de más baja intensidad, se diferencian una *fase de nucleación*, seguida de la *fase de elongación*, con un incremento lineal de la absorbancia, hasta alcanzar un *estado estacionario*, donde la masa del polímero permanece constante.

En el mismo ensayo incluimos dos agentes antineoplásicos que interfieren en el dinamismo microtubular, el Paclitaxel, agente estabilizante que aumenta la polimerización de la tubulina, y el Nocodazol, agente desestabilizante que favorece su despolimerización. Como se observa en la *figura 4.58.C*, las curvas de polimerización en presencia de estos dos controles, el Paclitaxel y el Nocodazol, de acuerdo a las cinéticas de polimerización descritas para estos compuestos,¹²⁴ resultaron visiblemente antagónicas. El Paclitaxel, a una concentración de 10 μM , eliminó la fase de nucleación, potenciando la velocidad máxima de la fase de elongación; mientras que el nocodazol, a la misma concentración, disminuyó la velocidad máxima de polimerización, así como la masa final del polímero.

La cinética de polimerización con el derivado **S8e** resultó análoga con aquella descrita para el Nocodazol, observándose una prolongación de la fase de nucleación dependiente de concentración (*figura 4.58.C*). Por lo tanto, la desorganización del patrón basal de las fibras microtubulares, tras el

tratamiento con el derivado **S8e** descrita anteriormente, puede atribuirse a la interferencia del compuesto en la polimerización de los mismos, cuya respuesta celular es coincidente con la descrita para otros TBA conocidos, como el Paclitaxel¹²⁵, Discodermolida¹²⁶ o derivados de la vinca, como Vincristina y Vinblastina.¹²⁷ La inhibición de la polimerización impediría la progresión a la fase de mitosis con el aumento de la subpoblación celular de la fase G2/M y la inducción de senescencia y apoptosis.

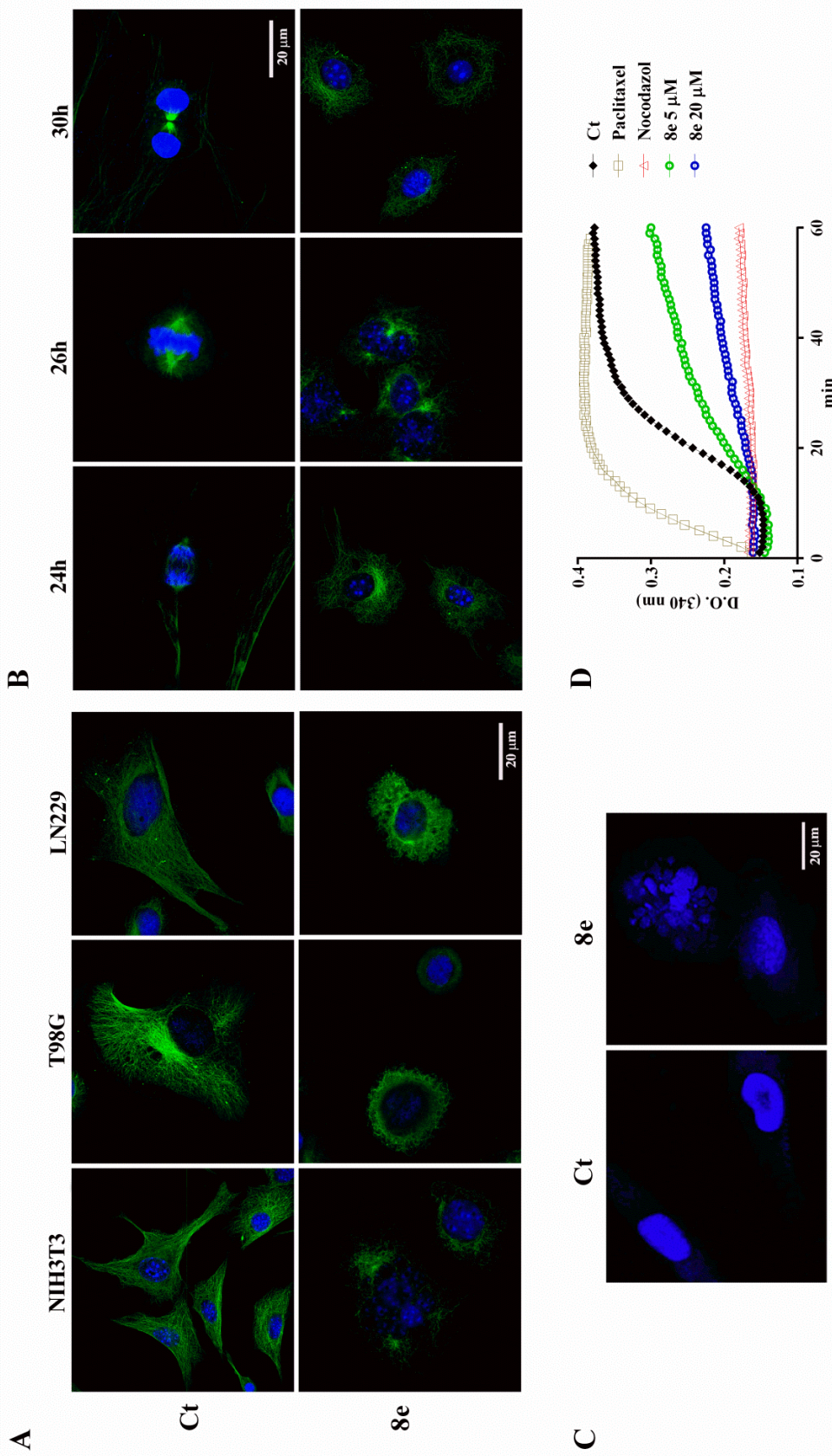


Figura 4.58. Disposición microtubular y polimerización *in vitro* de la tubulina en un panel representativo de líneas celulares en presencia de la sulfonamida **S8e**. **A**, **B** y **C**. Imágenes representativas de las líneas indicadas tratadas con la sulfonamida **S8e**, a una concentración 10 μ M, o no tratadas (Ct), previo marcaje con el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina y/o DAPI. **A**. Análisis de la disposición microtubular tras 24 horas de tratamiento con la sulfonamida **S8e**. **B**. Análisis de la progresión del ciclo celular a G2/M, en células sincronizadas (NIH3T3) por privación de suero durante 48 horas, tras la suplementación con 10% FCS y **S8e** (10 μ M) a los tiempos indicados. **C**. Análisis de los eventos de micronucleación en LN229, previo marcaje con DAPI, tras el tratamiento con la sulfonamida **S8e** (10 μ M) durante 48 horas **D**. Representación gráfica de la cinética de polimerización *in vitro* de tubulina monomérica purificada a 37 $^{\circ}$ C, en ausencia de tratamiento (Ct) y en presencia de la sulfonamida **S8e** (concentraciones indicadas), Paclitaxel (10 μ M) y Nocodazol (10 μ M).

4.3.5. Determinación de la reversibilidad de acción de la sulfonamida **S8e**

El desarrollo de la colchicina como agente antitumoral en la práctica clínica, a pesar de ser un potente inhibidor de la polimerización de la tubulina, se ha visto obstaculizado por sus graves efectos secundarios, resultado de su unión de manera irreversible a la tubulina.¹²⁸

La asociación irreversible de la colchicina y su toxicidad *in vivo* ha llevado a la consideración de la reversibilidad de acción como un importante parámetro predictivo de la eficacia y toxicidad *in vivo*,¹²⁹ como demuestra el éxito de los TBA reversibles en los diferentes ensayos clínicos, de especial relevancia la primera sulfonamida antimetabólica, ABT-751.¹³⁰

Considerando la trascendencia clínica del desarrollo de TBAs de acción reversible, estudiamos la capacidad de revertir el efecto del derivado **S8e** en la proliferación, ciclo celular, senescencia y disrupción de ensamblaje microtubular. Para tal finalidad, realizamos los mismos ensayos anteriormente descritos, sometiendo las diferentes líneas celulares seleccionadas a un pre-tratamiento con el derivado **S8e** a una concentración 10 μM durante 24 o 48 horas, según se indica a continuación para cada ensayo. Al finalizar el periodo de incubación, sustituimos el medio de cultivo (disolución del derivado **S8e** (10 μM)) por medio completo y realizamos los ensayos correspondientes.

En primer lugar, determinamos la viabilidad celular en las líneas LN229 y PC3, tras previo tratamiento de 24 horas con el derivado **S8e**. Como se observa en *figura 4.59.A*, con la sustitución del medio de tratamiento por medio fresco ($t = 0$), se incrementó la población celular, describiendo una curva de crecimiento exponencial desde el segundo hasta el noveno día post-tratamiento.

Posteriormente, determinamos la capacidad de revertir la parada en G2/M en LN229, manteniendo las mismas condiciones de ensayo y el mismo periodo de pre-tratamiento. Como era de esperar, el aumento de la proliferación celular se acompañó con un aumento de la población celular en la fase G1 tras su salida de mitosis. Los valores obtenidos para cada una de las fases del ciclo a los 6 días post-tratamiento fueron similares a las células no tratadas, si bien se detectó una pequeña subpoblación de células hipodiploides (*figura 4.59.B*).

Dado que fue posible revertir la parada en G2/M y permitir la reentrada en el ciclo celular, el fenotipo senescente que favorece la parada en G2/M también debería revertirse. Aunque la senescencia se define como un estado irreversible de la proliferación celular, en nuestro estudio, con la sustitución del medio de tratamiento se observó una disminución de células senescentes, correspondiéndose cuantitativamente a una reducción del 50% a las 48 horas post-tratamiento (*figura 4.59.C*). Estos resultados confirman la reversibilidad en la detección de marcadores de senescencia ya descritos para otros compuestos.¹³¹

Por último, al igual que en los ensayos anteriores, analizamos la disposición de la red de microtúbulos a las 48 horas post-tratamiento. Como se observa en la *figura 4.59.D*, en las tres líneas estudiadas (NIH3T3, LN229 y T98G) se observó un citoesqueleto microtubular completamente organizado, semejante al de las células no tratadas.

Los resultados obtenidos confirman que la sulfonamida **S8e** inhibe la polimerización de la tubulina, al igual que otros derivados de sulfonamidas, de manera completamente reversible.^{119b}

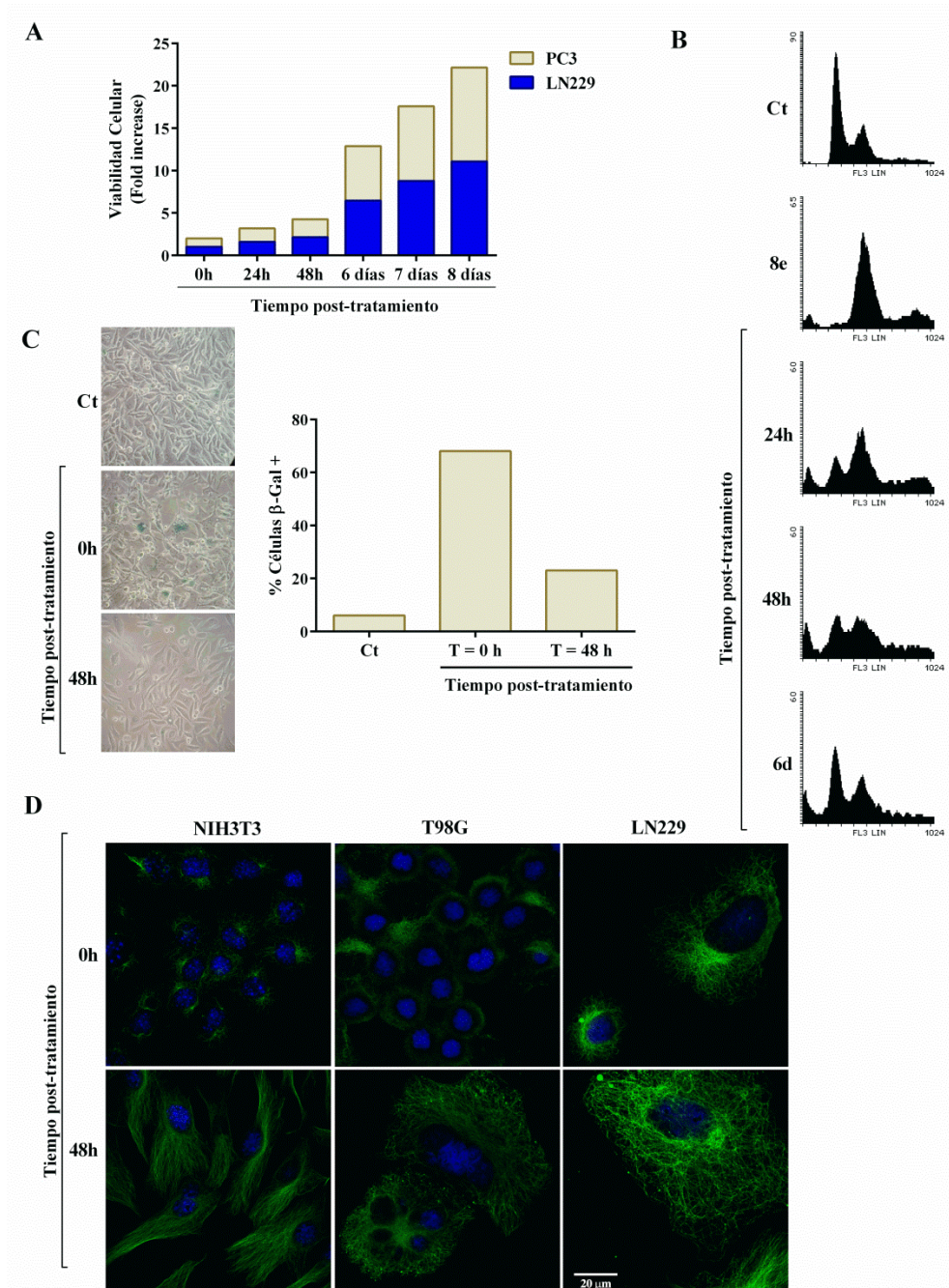


Figura 4.59. Estudio de la reversibilidad de acción de la sulfonamida **S8e**. Las diferentes líneas celulares que se indican se sometieron a un tratamiento previo con la sulfonamida **S8e**, a una concentración 10 μ M durante 24 horas, y su posterior sustitución por medio completo determinó el inicio del ensayo (T = 0), asignándose como periodo post-tratamiento los tiempos indicados. **A.** Viabilidad celular expresada como *fold increase* respecto a las células en T = 0 de las líneas LN229 y PC3 en los tiempos indicados **B.** Análisis de la distribución del ciclo celular; histogramas representativos de la línea celular LN229 en los tiempos indicados. **C.** Inducción de senescencia en la línea celular PC3; imágenes representativas realizadas con un microscopio de campo claro a una magnificación 20x. **D.** Análisis de la disposición microtubular. Imágenes representativas de las inmunofluorescencias de las líneas indicadas, previo marcaje con el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina y DAPI.

4.3.6. Inhibición de la motilidad celular por la sulfonamida S8e

La regulación dinámica del citoesqueleto celular, incluida la red de microtúbulos, es fundamental para muchos procesos celulares. Los microtúbulos, a través de sus diferentes funciones en la mecánica celular, tráfico intracelular y señalización, controlan el establecimiento y mantenimiento de la coordinación espacial y temporal de los eventos migratorios: protrusión, adhesión, contracción y retracción de la célula.¹³²

El fenotipo transformado de las células cancerosas puede estimular su propia motilidad, necesaria para alcanzar la membrana basal y células endoteliales de los vasos sanguíneos, en el proceso de intravasación localizada y posterior diseminación (metástasis).¹³³ Este fenotipo, de elevada capacidad de migración, puede atenuarse con la despolimerización de los microtúbulos inducida por fármacos, como se ha demostrado en una amplia variedad de tipos celulares.¹³⁴

Al desestabilizar la polimerización de los microtúbulos, y teniendo en cuenta la implicación de éstos en la motilidad y migración celular, determinamos si el derivado S8e presenta la capacidad de inhibir la motilidad celular, en LN229 y MCF-7, mediante el *ensayo de cicatrización de herida* o *Wound Healing*. Éste es un método ampliamente utilizado por su sencillez y accesibilidad, que permite determinar la motilidad celular o velocidad de migración *in vitro*. Su metodología se limita a la creación de un área libre de células en una monocapa confluyente, posterior toma de imágenes periódicas a diferentes tiempos, y determinación del porcentaje de células que migran hacia la apertura de la herida para establecer nuevos contactos intercelulares con el cierre de la misma.¹³⁵

Como el objetivo de nuestro ensayo era determinar la capacidad de la sulfonamida S8e de inhibir la motilidad celular, realizamos un barrido rápido de adquisición de imágenes a dos tiempos por experimento: $T_0 = 0$ h, tiempo correspondiente a la realización de la herida y $T_1 = 16$ h, tiempo establecido en las líneas seleccionadas (LN229 y MCF-7) para obtener un 80 % de cierre de herida en los pocillos control.

Como se muestra en la *figura 4.60*, a diferencia de las células control donde se observa claramente un cierre de la herida, tras 16 horas de tratamiento con el derivado S8e a 5 y 10 μ M, la motilidad celular, respecto a las no tratadas, se reduce de manera significativa. En la línea celular LN229, tras el tratamiento con ambas concentraciones, la reducción de la motilidad fue muy similar (M% = 65), por el contrario, en MCF-7 se observó una inhibición progresiva con el aumento de concentración, alcanzándose una reducción del 80% a 10 μ M.

Los resultados confirman por tanto, la capacidad de reducir la motilidad celular del derivado S8e, de acuerdo a su capacidad de inhibición de la polimerización de los microtúbulos, lo cual podría conferir a este derivado un mayor potencial anticancerígeno, especialmente en aquellos fenotipos transformados de elevada tasa de migración.

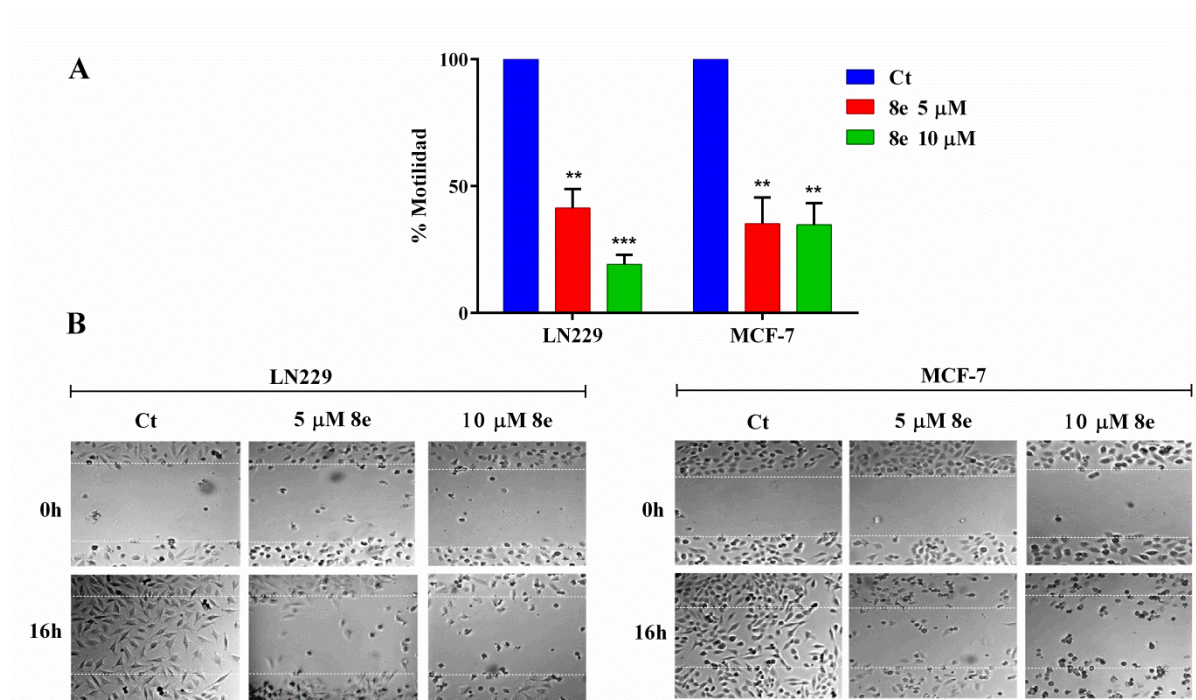


Figura 4.60. Estudio de motilidad celular en las líneas LN229 y MCF-7 tratadas con la sulfonamida **S8e** mediante el ensayo *Wound healing*. **A.** Representación del porcentaje de células que han migrado a las 16 horas de la realización de la herida, en ausencia (Ct) o presencia de la sulfonamida **S8e** (5 y 10 μ M). **B.** Imágenes representativas de la herida en los tiempos de ensayos (T_0 , T_1) obtenidas por microscopía de contraste de fases a una magnificación 10x. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por duplicado. El análisis estadístico de la prueba *t* de *Student* indica diferencias significativas entre los tratamientos y el control (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.3.7. Análisis SAR y estudios de *docking*

En nuestro estudio se identificó el compuesto **S8e**, *N*-(2-metil-indol-1*H*-5-il)-1-naftalenosulfonamida, como la única sulfonamida activa de nuestra librería frente a un panel de líneas celulares de diferente origen tumoral, con un mecanismo definido a nivel celular por la inhibición de la polimerización de la tubulina. Sin embargo, los análogos estructurales, **S8f**, **S9a** y **S9b**, manteniendo el anillo de 5-indolilo y anillos benzofusionados aromáticos o heterocíclicos (naftaleno, dansilo y 8-quinolina) unidos al grupo sulfonilo, no resultaron ser activos.

Con el objetivo de determinar si el derivado **S8e**, compuesto que inhibe la polimerización de la tubulina, se corresponde con un nuevo CBI (*Colchicine Binding Inhibitor*) y esclarecer una primera aproximación de la REA entre sus análogos, realizamos estudios de *docking* a partir de las estructuras cristalinas de diferentes complejos TBA-tubulina en el sitio de unión de la colchicina en colaboración con el Dr. Peláez de la Universidad de Salamanca.

Las estructuras cristalinas de los diferentes complejos TBA-tubulina constituyen un modelo a partir del cual, por dinámica molecular o estudios de *docking*, es posible diseñar nuevos TBA con

mayor y/o menor afinidad, potencia y selectividad. Entre estos, el sitio de unión a la colchicina constituye el modelo preferencial para el diseño de esta clase de compuestos.

Los agentes CBIs presentan ciertas ventajas frente aquellos de unión al sitio del taxol o la vinca: además de inhibir la proliferación de las células tumorales, pueden actuar como agentes antivascuales, bien inhibiendo la formación de nuevos vasos de la vasculatura tumoral (efecto antiangiogénico), o afectar principalmente a las células endoteliales de la vasculatura preexistente (VDA, *Vascular Disrupting Agents*); suelen ser eficaces en líneas celulares con un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (MDR); y su eficacia no está supeditada al patrón de expresión de la isoforma III β -tubulina, indicador de resistencia a Paclitaxel y Vinorelbina.¹³⁶

El sitio de unión a la colchicina se caracteriza por presentar una elevada flexibilidad, pudiendo albergar compuestos de una amplia diversidad estructural.¹³⁷ Entre los diferentes compuestos desarrollados como CBIs, son los derivados indólicos con diferentes patrones de sustitución, los que han adquirido especial relevancia.¹³⁸

Como se ha descrito en los antecedentes bibliográficos, el desarrollo secuencial de nuevos derivados de sulfonamidas antimitóticas se ha llevado a cabo por diferentes estrategias de farmacomodulación a partir de dos *templates* de optimización, la primera sulfonamida antimitótica ABT-751 o la combretastatina A-4 (CA-4). Los diferentes derivados obtenidos comparten un motivo estructural común, definido por dos centros hidrofóbicos con átomos aceptores de puentes de hidrógeno o sustituidos por grupos hidrofóbicos o polares, y un grupo como elemento de unión que les confiere cierta flexibilidad, el grupo sulfonamido. También presentan un mismo motivo de interacción y efecto celular: inhiben la polimerización de la tubulina por su unión a la subunidad β -tubulina en el sitio de unión de la colchicina (CBS, *Colchicine Binding Site*), promoviendo una parada del ciclo celular en la fase G2/M a tiempos prolongados, seguida de muerte celular por apoptosis. Curiosamente, entre los diferentes derivados obtenidos, ya sea a partir de la ABT-751 o CA-4, los derivados de bencenosulfonamidas con un núcleo indólico (*N*-indolil, *N*-indolina, *N*-carbazol o γ -carbolina), han resultado los más eficaces (*figura 4.61*).

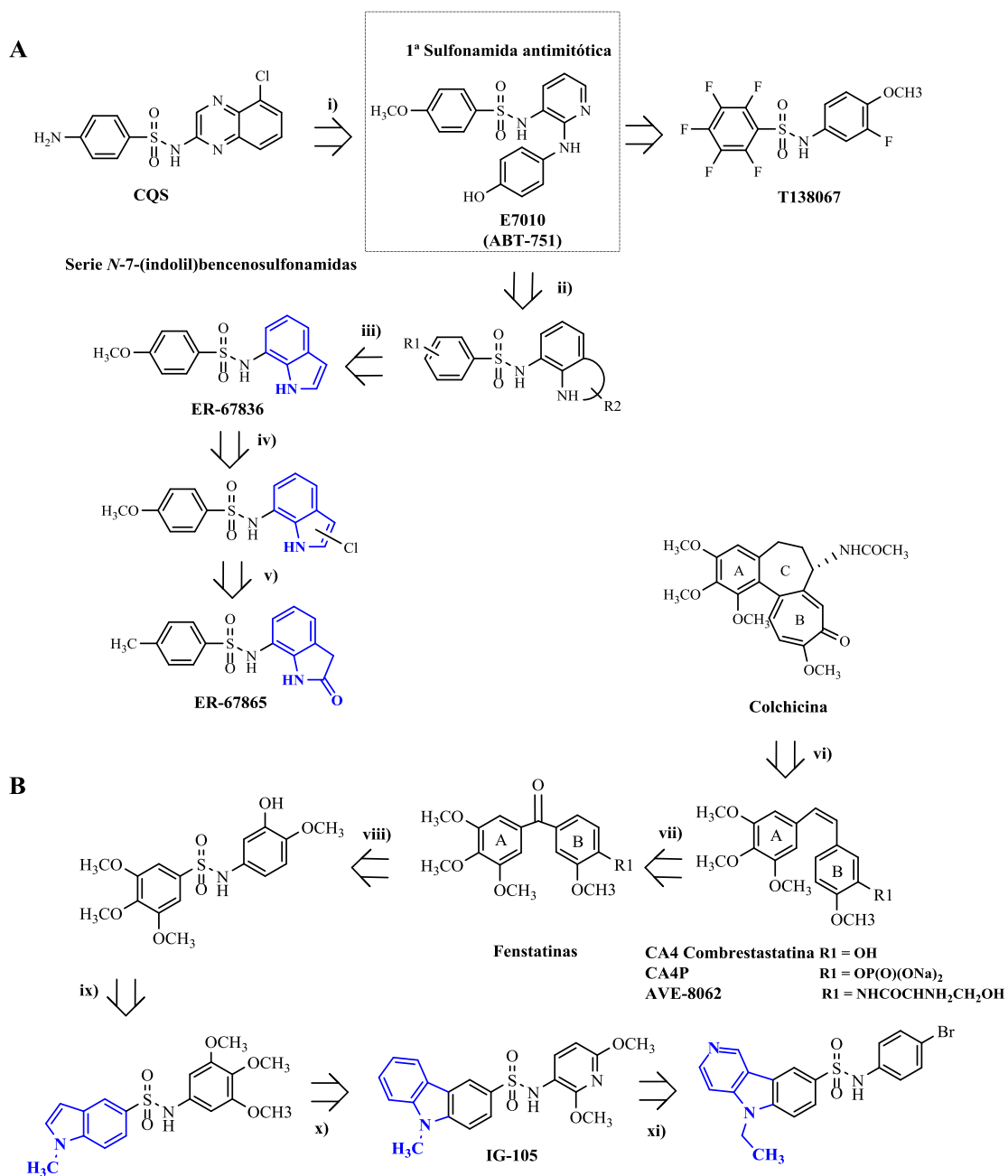


Figura 4.61. Farmacomodulación de derivados de sulfonamidas antimetabólicas. **A.** Derivados obtenidos a partir de la sulfonamida ABT-751. **i)** Yoshino y col.,¹³⁹ **ii- iii)** Owa y col.,¹⁴⁰ **iv)** Mohan y col.,^{119b} **v)** Yokoi y col.¹⁴¹. **B.** Derivados obtenidos a partir de CA-4. **vi)** Tron y col.¹⁴², Ohsumi y col.,¹⁴³. **vii)** Álvarez y col.¹⁴⁴; **viii)** Medina, J.L.,¹⁴⁵ **ix)** Li y col.,^{119a} **x)** Hu y col.¹⁴⁶, Wang y col.,¹⁴⁷ **xi)** Chen y col.¹⁴⁸

En nuestros estudios de *docking*, entre las diferentes estructuras cristalinas, seleccionamos los resultados para el complejo 3HKC, complejo de la benzenosulfonamida ABT-751, por la similitud estructural de ésta con los derivados de sulfonamidas evaluados en nuestro trabajo.

Como se puede observar en la *figura 4.62*, en la sulfonamida ABT-751 se establecen 6 puntos farmacofóricos: tres aceptores de puentes de hidrógenos (A1, A2, A3), un dador de puentes de hidrógeno (D1), un centro hidrofóbico (H1), y un grupo planar (R1).

En la estructura cristalina seleccionada, el sitio de unión de la colchicina (PDB: 3HKC), se observa la sulfonamida ABT-751 en una región más profunda del sitio de unión en la subunidad- β , no interactuando con la subunidad- α . El grupo metoxi y el anillo de piridina se superponen con los anillos C y A de la colchicina respectivamente, y el grupo sulfonamida con el anillo B.

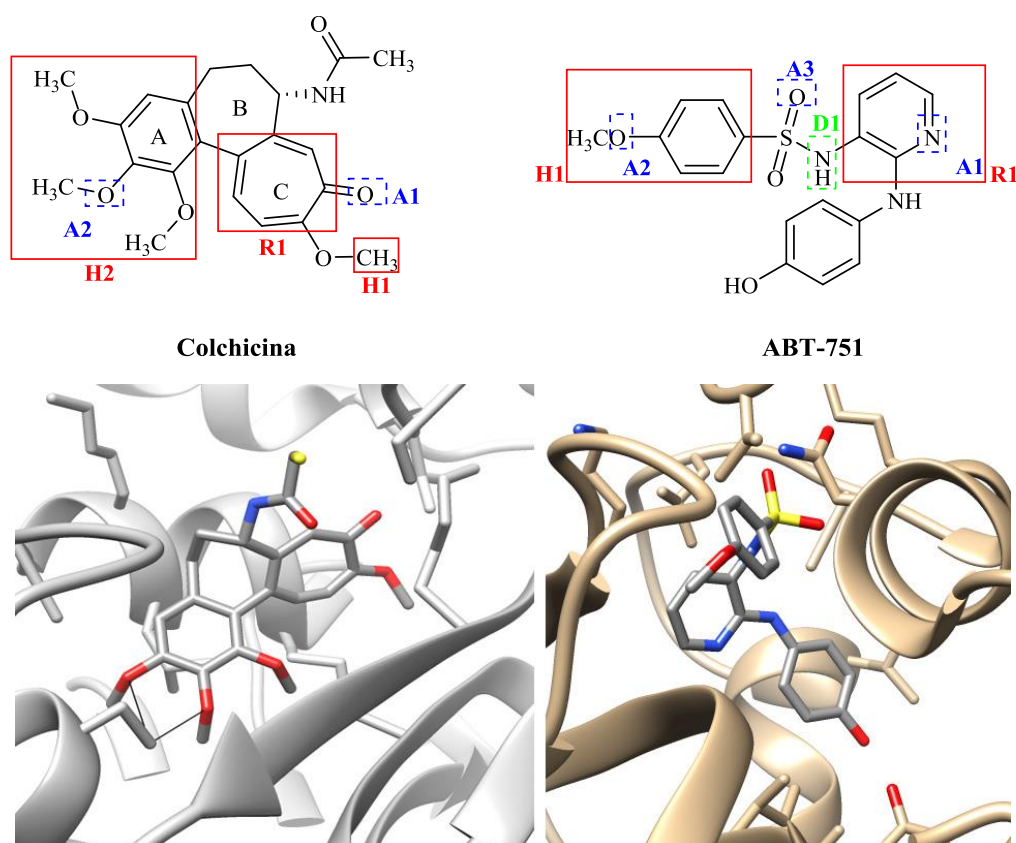


Figura 4.62. Elementos farmacofóricos esenciales de la Colchicina y la sulfonamida ABT-751 en su unión a los dímeros de tubulina. **A:** Aceptores de puentes de hidrógeno; **D:** Dadores de puentes de hidrógeno; **H:** Centro hidrofóbico; **R:** Grupo planar. Colchicina: PDB1SAO, ABT-751: PDB3HKC.

En los estudios de *docking* que realizamos con el complejo 3HKC, se observó que los diferentes derivados de sulfonamidas, **S8-S11**, **S13-S16** y **S18-S22**, se unían al sitio de ABT-751 con los anillos ocupando las cavidades del sustituyente *p*-metoxifenilo (centro hidrofóbico) y la 2,3-diaminopiridina (grupo planar) de la sulfonamida ABT-751.

La cavidad donde se localiza el grupo el *p*-aminofenol de la sulfonamida ABT-751 sólo estaba ocupado por sulfonamidas con sistemas anulares grandes, como los derivados de antraceno de la serie **S17**.

Al realizar el acoplamiento de los derivados de las series **S8-S11**, **S13-S16** y **S18-S22**, ocupando sus anillos las cavidades del *p*-metoxifenilo y la 2,3-diaminopiridina de la sulfonamida ABT-751, se observó que podían adoptar dos disposiciones posibles en función de la presencia en su estructura de anillos α -benzofusionados, anillos unidos al grupo sulfonamida por alguna de sus posiciones α (posiciones 1, 4, 5 y 8 en anillos benzofusionados hexagonales; posiciones 4 y 7 para anillos benzofusionados pentagonales).

En derivados con dos anillos α -benzofusionados, como las sulfonamidas **S14d** y **S15d**, los anillos podían ocupar indistintamente, tanto la cavidad del *p*-metoxifenilo, como la cavidad correspondiente a la 2,3-diaminopiridina observándose, por tanto, dos disposiciones posibles. Por el contrario, en derivados con un solo anillo α -benzofusionado, este ocupa preferentemente la posición de la 2,3-diaminopiridina, como se observa en el acoplamiento para el derivado **S8e**, en el cual el anillo indólico ocupa la cavidad del *p*-metoxifenilo (*figura 4.63*).

En el caso de derivados con un anillo benzofusionado, pero no sustituido en posición α -, éste ocupa preferentemente la cavidad de la 2,3-diaminopiridina, como se observa en el acoplamiento para el derivado **S8d**, en el cual, a diferencia del derivado **S8e**, el anillo indólico ocupa preferentemente la cavidad de la 2,3-diaminopiridina, y el anillo bencénico *para*-sustituido ocupa la cavidad del *p*-metoxifenilo. Por tanto, la presencia del grupo 1-naftilo en el derivado **S8e** produce una inversión en el modo de unión respecto a los derivados bencénicos de su misma serie, lo que podría explicar las diferencias en su actividad (*figura 4.63*).

La misma inversión se observó en los derivados **S9a-b**, pero sin un aumento de la potencia, debido probablemente a la falta de un sustituyente en posición 2 del anillo indólico que reemplazase el grupo metoxi de ABT-751, sitio 1 hidrofóbico del modelo farmacofórico de Nguyen *y col.*¹⁴⁹

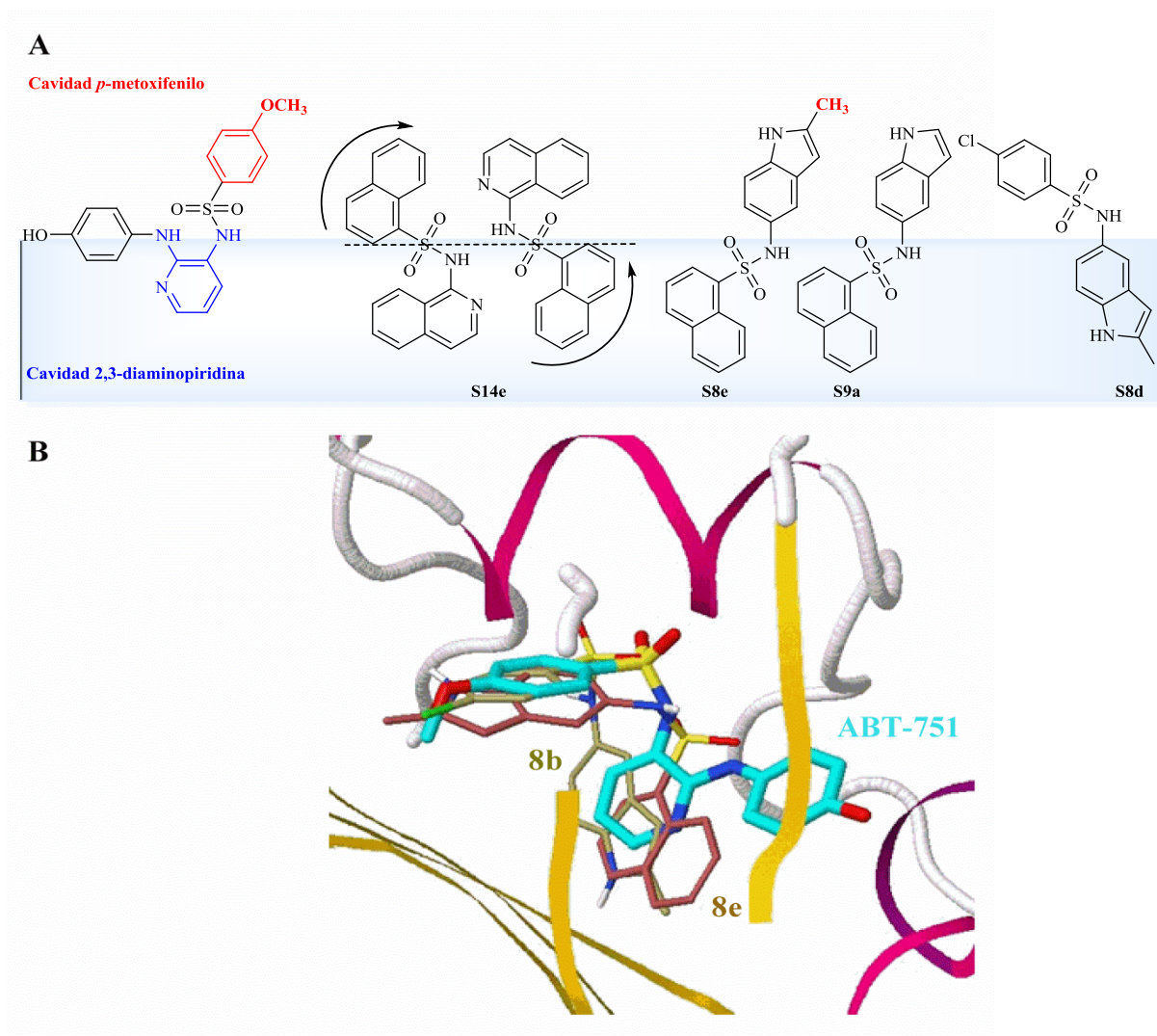


Figura 4.63. Estudios de *docking* de la sulfonamida **S8e** en el sitio de unión de la colchicina. **A.** Disposiciones que adoptan los derivados de sulfonamidas en función del número de anillos α -benzofusionados en su estructura. **B.** Superposición de las disposiciones de acoplamiento preferencial de **S8e** (marrón), **S8d** (verde) y la sulfonamida ABT-751 (cian) en el sitio de unión a la colchicina.

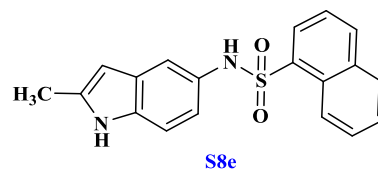
Los estudios de *docking* también demostraron que la pérdida de actividad con la introducción adicional de átomos de nitrógeno, tanto en el anillo indólico de **S8e** (derivados indazólicos **S10e** y **S11e**), como en el grupo naftaleno (derivado 8-quinolina **S8f**), podría atribuirse a la formación de puentes de hidrógeno no favorables en la interacción con el sitio de unión de la colchicina.

Los resultados obtenidos en el acoplamiento de los derivados evaluados y el análisis SAR permiten confirmar que la exclusiva actividad antiproliferativa de la sulfonamida **S8e**, a diferencia de sus análogos estructurales, se debe a su interacción con una diana terapéutica específica, la tubulina, concretamente en el sitio de unión de la colchicina.

La respuesta celular de este derivado también es coincidente con aquella descrita para TBAs. La sulfonamida **S8e**, por su interacción en el sitio de unión de la colchicina, interfiere en la

polimerización de los microtúbulos, evitando la progresión de las células a mitosis y, en consecuencia produciendo un aumento de la población celular en la fase G2/M, debido a lo cual, en las células se induce un programa de senescencia hasta su muerte por apoptosis. Ante estos resultados podemos concluir que del total de derivados evaluados, hemos identificado una nueva sulfonamida antimitótica, el derivado **S8e**, una naftalenosulfonamida con un anillo 5-indolilo, anillo presente en una amplia variedad de agentes de unión a la tubulina.

Esta nueva sulfonamida antimitótica, además, presenta un carácter reversible, característica asociada a una menor toxicidad *in vivo*, e inhibe, por su mismo mecanismo de acción, la motilidad celular, sugiriendo una actividad antiangiogénica potencial objeto de estudio.



Estudios posteriores de dinámica molecular permitirán discernir los elementos farmacofóricos con mayor precisión y su unión con los diferentes aminoácidos del sitio de unión a la colchicina.

Dadas las características de la sulfonamida **S8e**, fármaco antitumoral de carácter reversible que inhibe la motilidad celular por su interacción con una diana específica, puede constituir un nuevo prototipo en el diseño de nuevos fármacos antimitóticos, de acción dual, con una mayor seguridad terapéutica.

4.4. Síntesis de los derivados de poliaminas L1-L5

De acuerdo a los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral sintetizamos 12 derivados poliamínicos, 3 previamente descritos (L1a, L1c y L2a) y 9 de nueva síntesis (L1b, L1d, L1e, L2b, L2e, L3a, L4a, L4c y L5a) (figura 4.64).

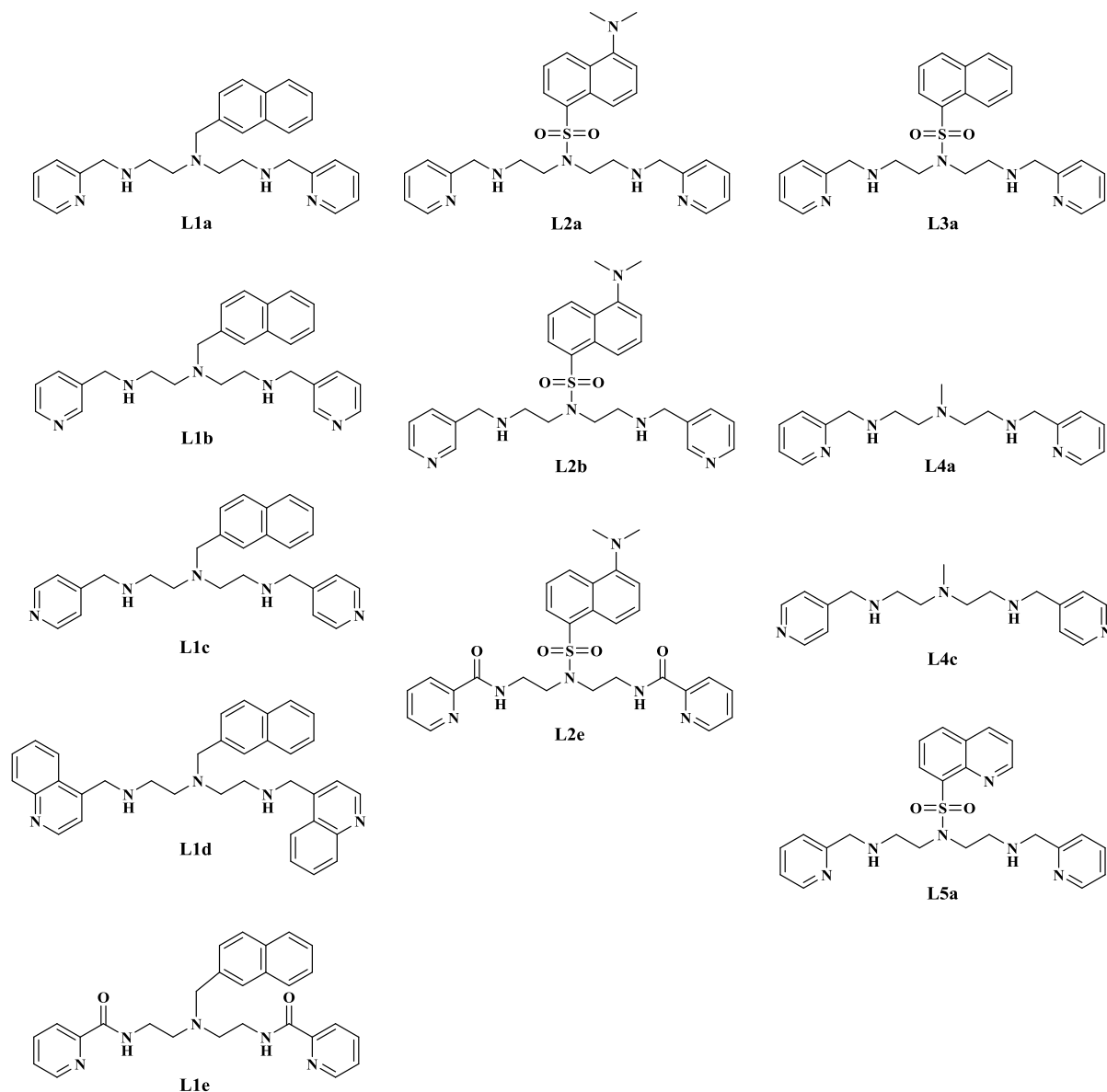


Figura 4.64. Estructura de los derivados poliamínicos L1-L5

A partir de la dietilentriamina o 1,4,7-triazaheptano, *template* de nuestra serie, se establecieron dos dominios de diversidad estructural (**D1** y **D2**) según la funcionalización del grupo amino central (**D1**) y los grupos amino terminales (**D2**) (*figura 4.65*).

En **D1** se introdujeron diferentes grupos fluoróforos (naftilo, dansilo y 8-quinolina), unidos al nitrógeno central a través de un metileno (serie **L1**) o un grupo sulfonamido (serie **L2**, **L3** y **L5**), con la excepción de los derivados de la serie **L4**, sintetizados a partir del producto comercial 4-metil-1,4,7-triazaheptano, estableciéndose como sustituyente un metilo. En **D2** se introdujeron anillos piridínicos con el átomo de nitrógeno en distintas posiciones o un anillo quinolínico, obteniéndose derivados de picolina (**a-d**) o carboxamida (**e**) (*figura 4.65*).

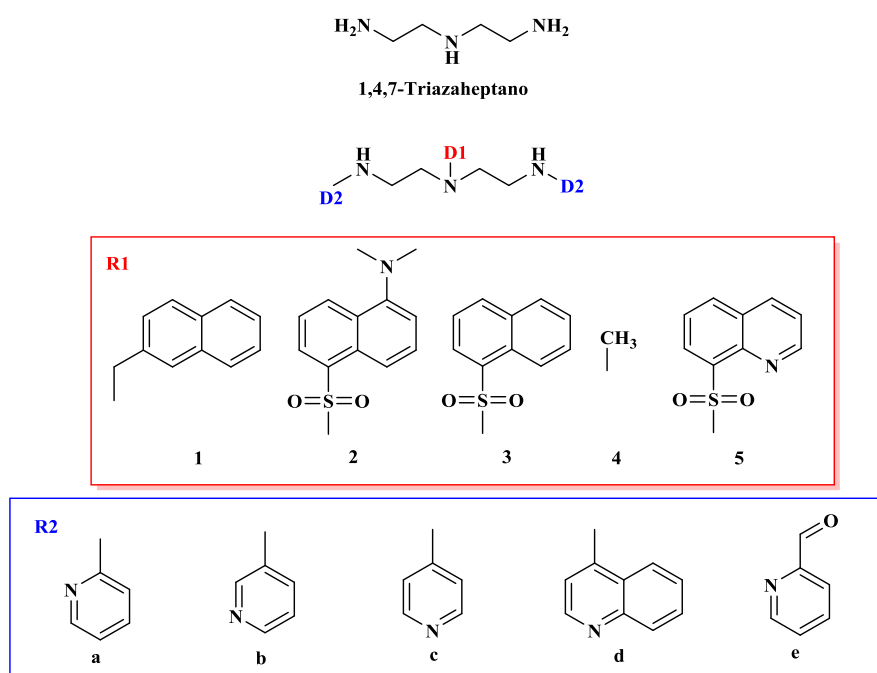
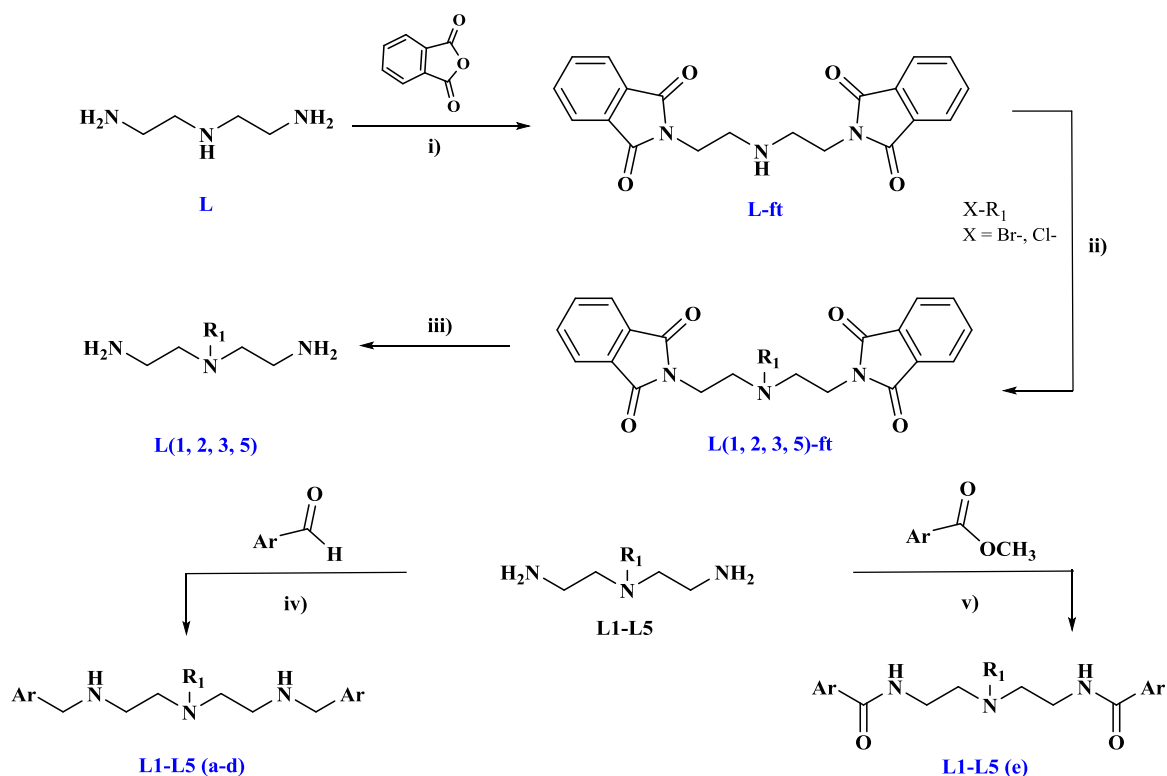


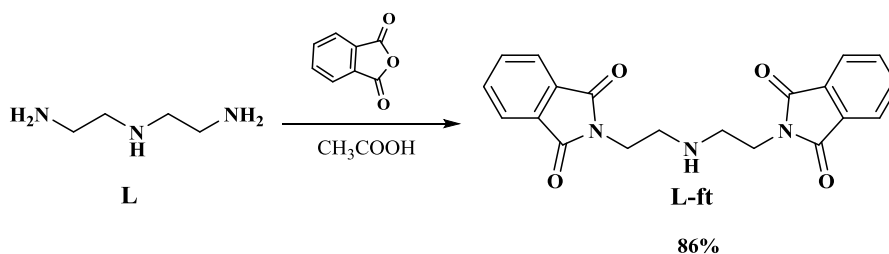
Figura 4.65. Dominios de diversidad estructural (**D1/D2**) en el diseño de los derivados poliamínicos **L1-L5**.

La síntesis de las poliaminas **L1-L5** se realizó a partir de la ruta sintética establecida por nuestro grupo de investigación.¹⁵⁰ Ésta consiste en cuatro etapas: 1) protección de los grupos amino terminales de la amina precursora (**L**) con anhídrido ftálico para dar el 2,5-diftalimido-3-azapentano (**L-ft**), 2) alquilación de las diftalimidias (**L-ft**) con haluros de alquilo o arilsulfonilo, 3) desprotección con hidracina de las diftalimidias alquiladas (**L1-ft**, **L2-ft**, **L3-ft** y **L5-ft**) y 4) funcionalización de las diaminas (**L1**, **L2**, **L3**, **L4** y **L5**) con distintos carbaldehídos mediante una aminación reductiva para dar las aminas correspondientes, o por reacción con ésteres heterocíclicos en la obtención de amidias (*esquema 4.7*).



Esquema 4.7. Ruta sintética establecida en la obtención de los derivados poliamínicos **L1-L5**. Reactivos y condiciones: **i)** $\text{CH}_3\text{COOH}/\Delta$; **ii)** $\text{CH}_3\text{CN}/\text{K}_2\text{CO}_3/\Delta$; **iii)** $\text{N}_2\text{H}_4/\Delta$; **iv)** $\text{EtOH}/\text{NaBH}_4$; **v)** MeOH/Δ .

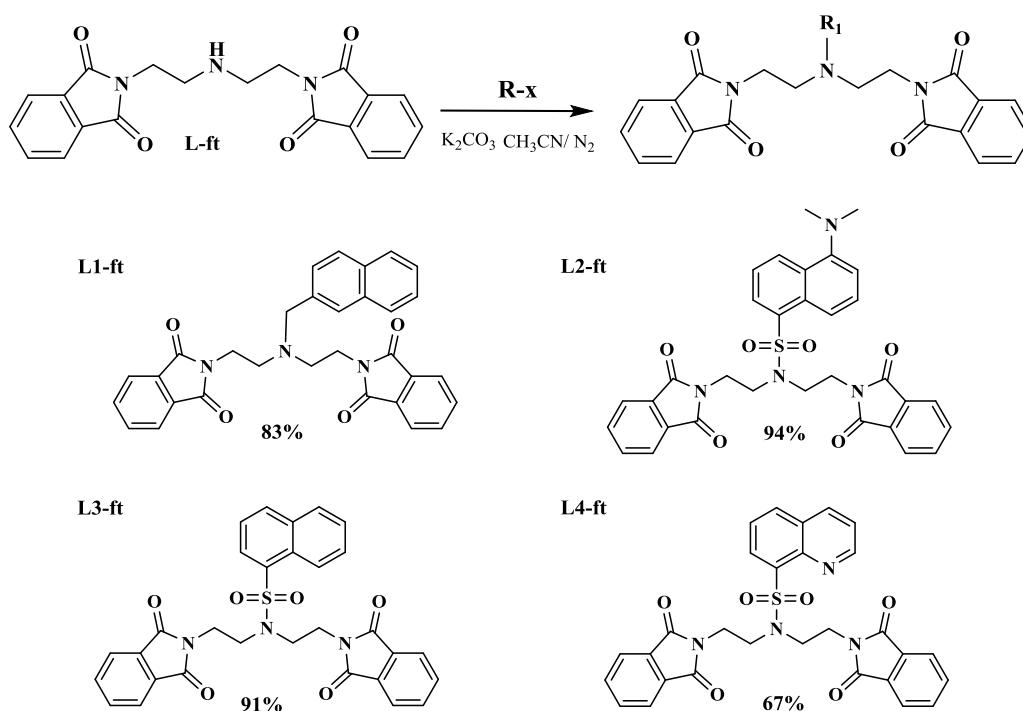
El anhídrido ftálico es uno de los grupos protectores comúnmente utilizados en la síntesis de ligandos poliamínicos, como paso previo a la funcionalización de grupos amino secundarios.¹⁵¹ Entre los diferentes procedimientos experimentales descritos, realizamos la protección de nuestra amina precursora (**L**) a partir de las condiciones de reacción establecidas por Yuen Ng y *col.*¹⁵² Para ello, a una disolución de anhídrido ftálico (2 eq.) se le añadió lentamente la amina precursora o dietilentriamina (**L**). Tras 1.5 horas de reacción y posterior eliminación del disolvente se obtuvo un aceite, cuya recrystalización de etanol permitió obtener un sólido blanco (**L-ft**) de elevada pureza y punto de fusión de 181-182 °C, similar a los previamente descritos (*esquema 4.8*).



Esquema 4.8. Reacción de protección de la amina precursora

Tras la protección de la amina primaria se procedió a la alquilación o sulfonación del nitrógeno central por reacción de la diftalimida (**L-ft**) con los haluros de alquilo/arilsulfonilo correspondientes en presencia de una base. El mecanismo por el cual transcurre la reacción consiste en una sustitución nucleofílica (S_N2). El carbono en posición α al haluro actúa como electrófilo y el nitrógeno actúa como nucleófilo desplazando al ión bromuro o cloruro.

Para la obtención de los diferentes derivados se siguió el procedimiento experimental descrito por Anelli *et al.*,¹⁵³ a excepción del derivado **L1-ft**, sintetizado según el procedimiento modificado¹⁵⁴ en el cual se establecen como condiciones de reacción 72 horas a reflujo y la adición de yoduro potásico (0.1 eq).



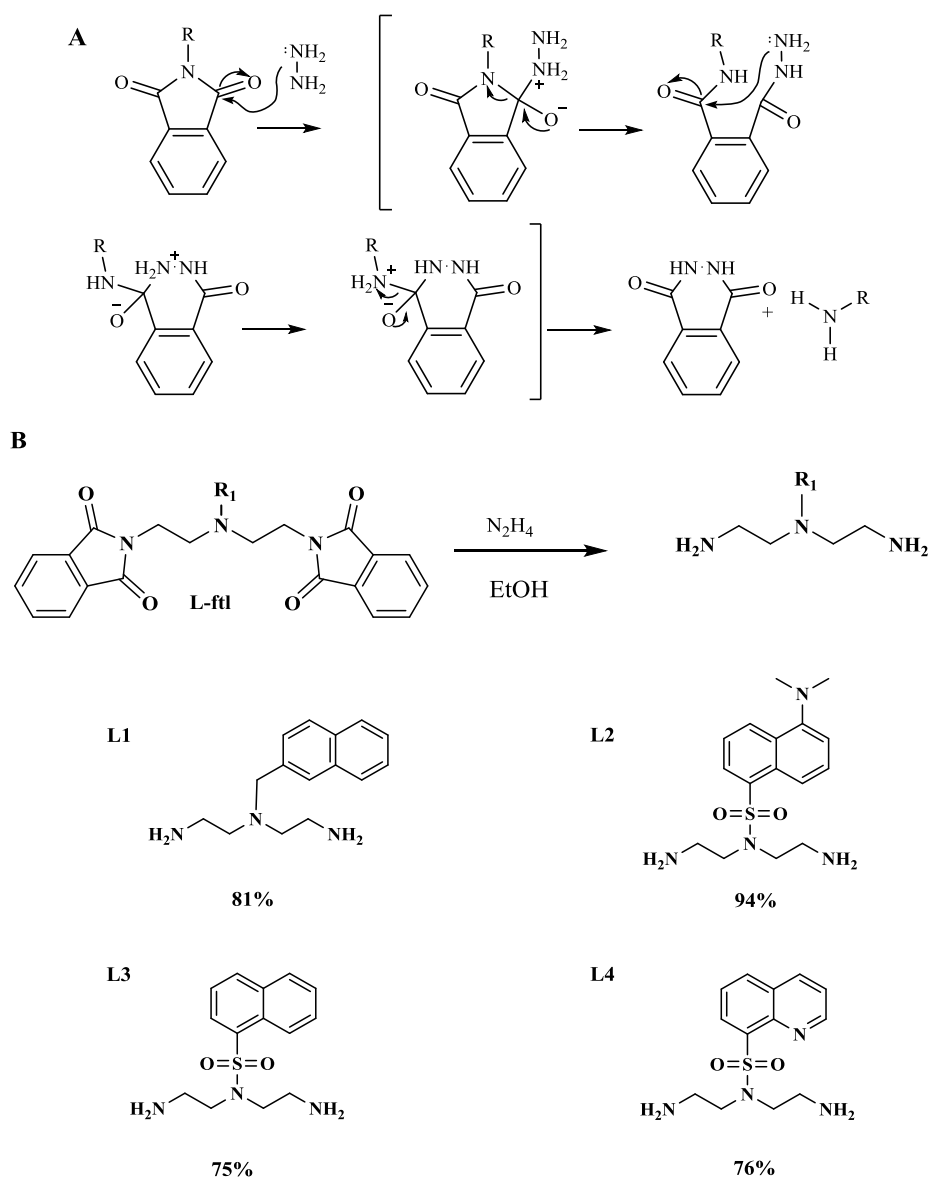
Esquema 4.9. Reacción de *N*-alquilación/sulfonación de las diftalimidias **L-ft**.

La reacción posterior de desprotección de los grupos amino terminales se llevó a cabo a partir del método de Ing-Manske.¹⁵⁵ Este procedimiento experimental de desprotección es una modificación de la hidrólisis de *N*-alquilftalimidias del protocolo original de la síntesis de Gabriel¹⁵⁶ llevado a cabo por una reacción de hidrazinólisis.

La reacción procede por un mecanismo de adición nucleofílica a uno de los carbonilos de la ftalimida. Tras la apertura del anillo se produce una sustitución nucleofílica acílica, hasta que finalmente se produce la rotura del intermediario tetraédrico para dar lugar a la amina primaria y ftalhidrazida (*esquema 4.10.A*).

Este procedimiento permite la desprotección con elevados rendimientos. Además la ftahidrazida formada precipita como un sólido blanco de fácil eliminación.

Siguiendo esta metodología hicimos reaccionar los derivados previamente alquilados con un exceso de hidracina monohidratada a reflujo durante 24 horas. Tras eliminar la ftahidrazida formada y el disolvente a presión reducida obtuvimos los derivados desprotegidos en forma de aceites de elevada pureza y con buenos rendimientos.



Esquema 4.10. Reacción de desprotección de las diftalimidias alquiladas

Finalmente, para la obtención de los derivados **a-d** realizamos la funcionalización de las aminas mediante una reacción de aminación reductiva, para lo cual hicimos reaccionar la amina

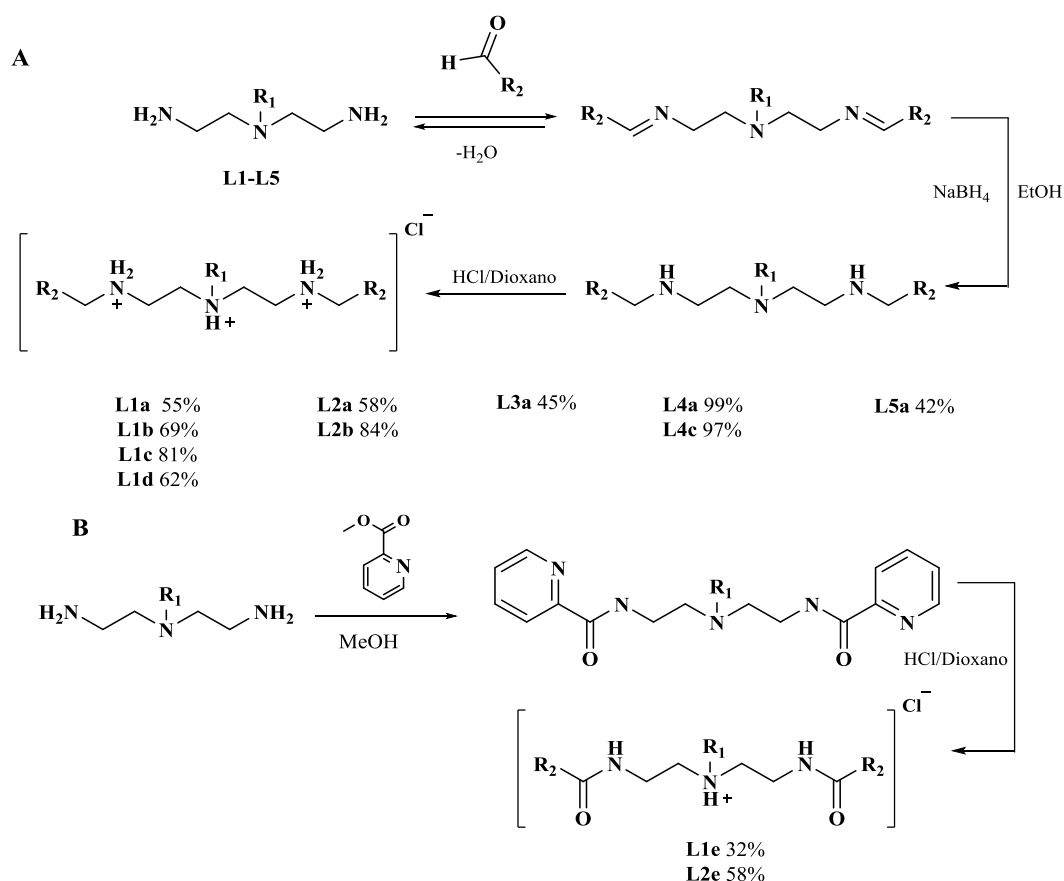
desprotegida con el carbaldehído correspondiente. La condensación de la amina con el aldehído da lugar a una base de schiff o imina que, posteriormente es reducida *in situ* con la adición de borohidruro sódico (*esquema 4.11.A*).

Las aminas sintetizadas se obtuvieron como aceites puros, a excepción de los derivados bis-2-picolilo, L1a, L2a, L3a, L5a y el derivado quinolinico L1d, los cuales se purificaron posteriormente por cromatografía en columna eluyendo con mezclas de polaridad creciente de cloroformo-metanol.

Para la obtención de los derivados L4a y L4c se partió del reactivo comercial 4-metil-1,4,7-triazaheptano, alcanzándose rendimientos cuantitativos en la síntesis de ambos derivados.

La síntesis de las amidas, L1e y L2e, se llevó a cabo por reacción de la amina correspondiente con picolinato de metilo (*esquema 4.11.B*). Los rendimientos de reacción fueron relativamente bajos, siendo necesaria su purificación por cromatografía en columna, eluyendo con mezclas de polaridad creciente de n-hexano, acetato de etilo y metanol.

Todos los derivados sintetizados se obtuvieron como aceites, por lo que se procedió a la precipitación de sus hidrocloruros, ¹⁵⁷ y así ,preservar su conservación y facilitar su manipulación.



Esquema 4.11. Reacciones de funcionalización en la obtención de los derivado L1-L5

La caracterización de los compuestos obtenidos se llevó a cabo por RMN 1D, de ^1H y ^{13}C , RMN 2D de correlación homonuclear ^1H - ^1H , COSY y heteronuclear ^1H - ^{13}C , HSQC, análisis elemental y espectrometría de masas de alta resolución (EM-AR), concluyéndose con la determinación de su punto de fusión (pf).

En el *anexo 2* se incluyen los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C . Para determinados compuestos se incluyen los espectros de RMN 2D con las asignaciones establecidas en su caracterización.

4.5. Estudios de actividad antitumoral *in vitro* de las poliaminas L1-L5

El estudio de los derivados poliamínicos como potenciales agentes antitumorales se remonta a varias décadas, y a pesar de la baja efectividad mostrada en diferentes ensayos clínicos, actualmente sigue siendo un *template* universal a partir del cual diseñar nuevos fármacos.

La terapia antitumoral basada en el *template* de poliamina requiere de un abordaje multidisciplinar que permita discernir las vías de señalización y potenciales dianas, así como aumentar la especificidad de sustrato, dada su versatilidad de unión, a partir de estudios de Relación Estructura-Actividad (REA).

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto multidisciplinar CONSOLIDER “*Supramolecular Chemistry applied to the Design, Synthesis and Evaluation of bioactive compounds of Anti-inflammatory, Anti-tumour or Anti-parasitic Action*”.¹⁵⁸ Concretamente, en un subproyecto de colaboración entre el grupo de Química Supramolecular de la Universitat de València y el grupo de Biología Molecular del Cáncer de la Universitat de les Illes Balears.

Estudios preliminares de esta colaboración en la evaluación antitumoral de compuestos de nueva síntesis pertenecientes a diferentes familias estructurales, mostraron que el derivado poliamínico **L1a** presentaba un perfil antiproliferativo significativo en comparación con sus análogos estructurales **L1d** y **L1e**, que resultaron moderadamente efectivos para las líneas celulares evaluadas: Jeko-1 (linfoma de células del manto), Jurkat (leucemia linfoblástica aguda), SKMG-3 (glioblastoma) y SW620 (adenocarcinoma colorectal) (*figura 4.66*).

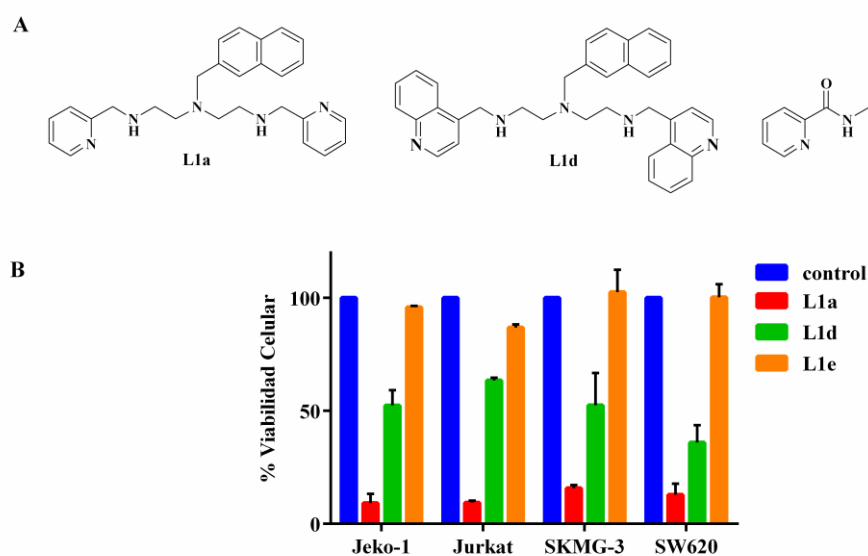


Figura 4.66. Viabilidad celular tras el tratamiento con los derivados poliamínicos **L1a**, **L1d** y **L1e**. **A.** Estructura de los derivados **L1a**, **L1d**, y **L1e**. **B.** Viabilidad celular de las líneas indicadas tras un tratamiento de 10 μ M durante 48 horas con **L1a**, **L1d** y **L1e**. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por triplicado.

En función de las diferencias estructurales y capacidad antiproliferativa de los diferentes análogos **L1a**, **L1d** y **L1e**, nos propusimos ampliar las variaciones moleculares incluidas en el *template* del 1,4,7-triazaheptano hasta obtener una pequeña librería de análogos que permitiera elucidar las características estructurales necesarias para su actividad, así como proponer un posible mecanismo de acción (*figura 4.67*).

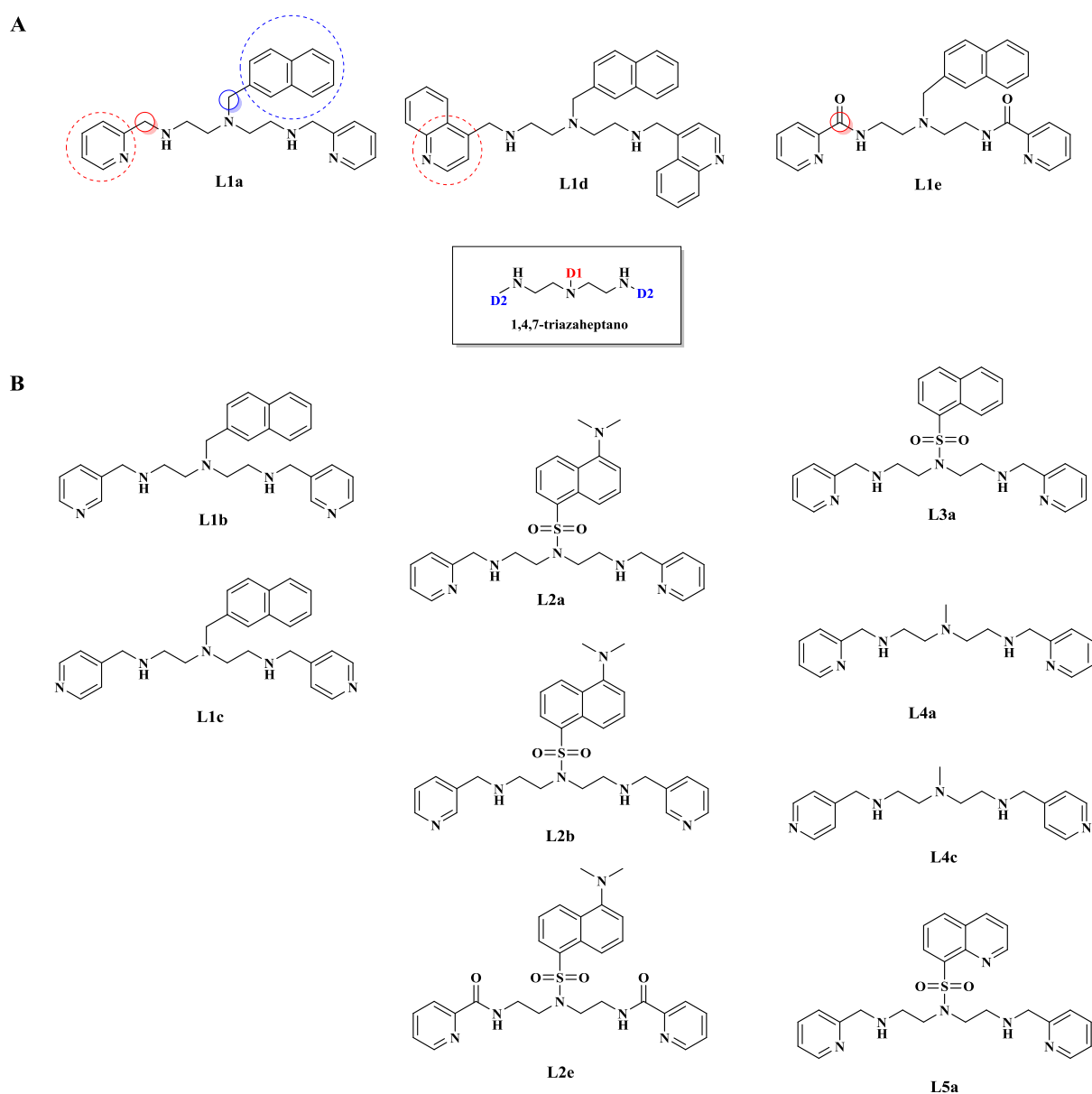


Figura 4.67. Selección y modificación estructural de los derivados poliamínicos **L1a**, **L1d** y **L1e**. **A.** Dominios de diversidad estructural establecidos (**D1/D2**). **B.** Estructura de los derivados sintetizados para su posterior evaluación.

4.5.1. Actividad antiproliferativa de los derivados poliamínicos L1-L5

Evaluamos la capacidad antiproliferativa de los nuevos derivados **L1b**, **L1c**, **L2a**, **L2b**, **L2e**, **L3a**, **L4a**, **L4c** y **L5a**, junto con **L1a**, en un panel de cuatro líneas tumorales, dos líneas adherentes de glioma, LN229 y U87, y dos líneas en suspensión, Jeko-1 y Jurkat. La inclusión del derivado **L1a** en este cribado se realizó con fines comparativos, así como para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Las diferentes líneas fueron tratadas a una concentración estándar de 10 μM durante un período de 48 horas. De los diez compuestos evaluados, dos resultaron en una inhibición de la viabilidad celular significativa en las cuatro líneas testadas (LN229, U87, Jeko-1 y Jurkat), **L1a**, seleccionado en el primer *screening* y, **L4a** (figura 4.68).

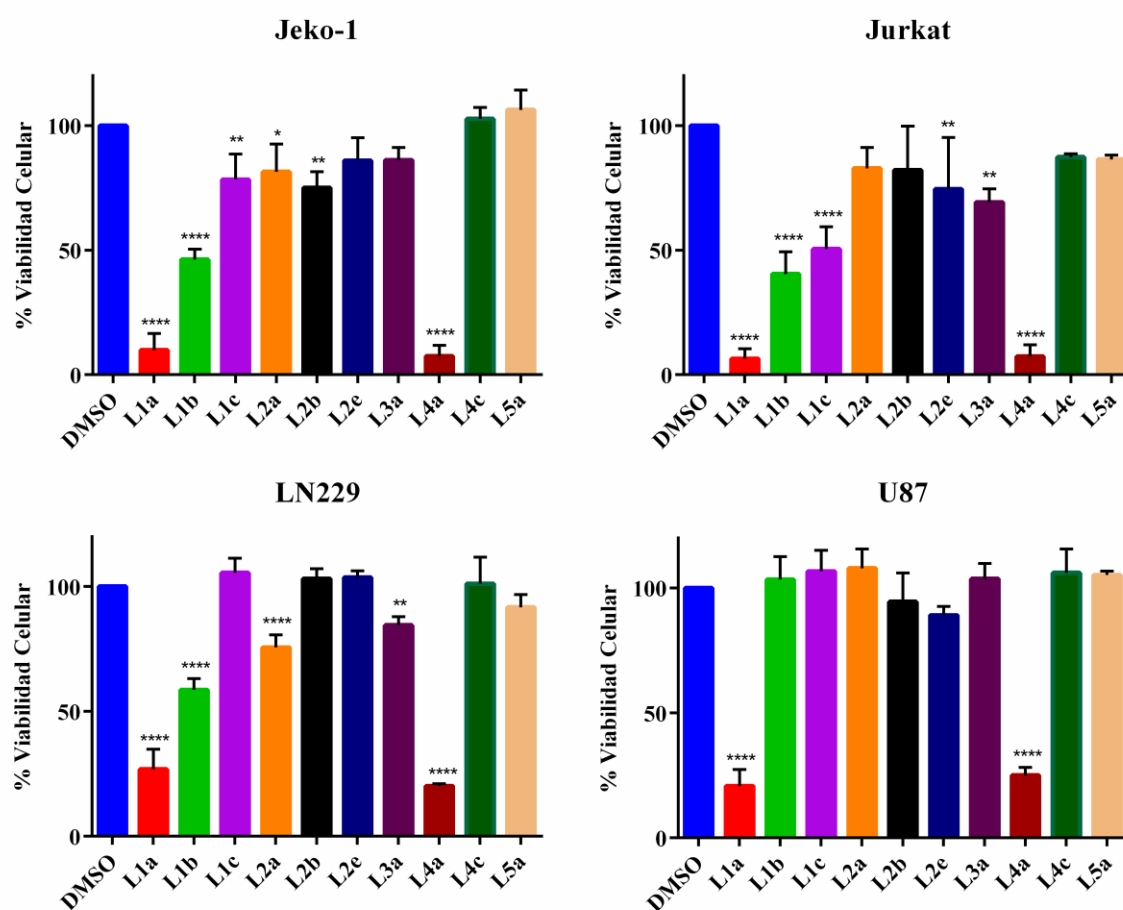


Figura 4.68. *Screening* de la serie de derivados poliamínicos **L1-L5** en líneas celulares de diferente origen tumoral. Las líneas indicadas fueron tratadas a una concentración 10 μM durante 48 horas. Se muestra la media \pm SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por triplicado. El análisis estadístico (ANOVA de un factor) con un post-test de Turkey revela diferencias significativas entre el tratamiento y el control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Para los compuestos seleccionados, **L1a** y **L4a**, ampliamos los estudios de viabilidad en cuatro líneas celulares adicionales, dos derivadas de pacientes afectados de linfoma de células del manto, Z-138 y Granta-519 y dos de tumores sólidos, MCF-7, derivada de adenocarcinoma de mama y PC3, de cáncer de próstata (figura 4.69).

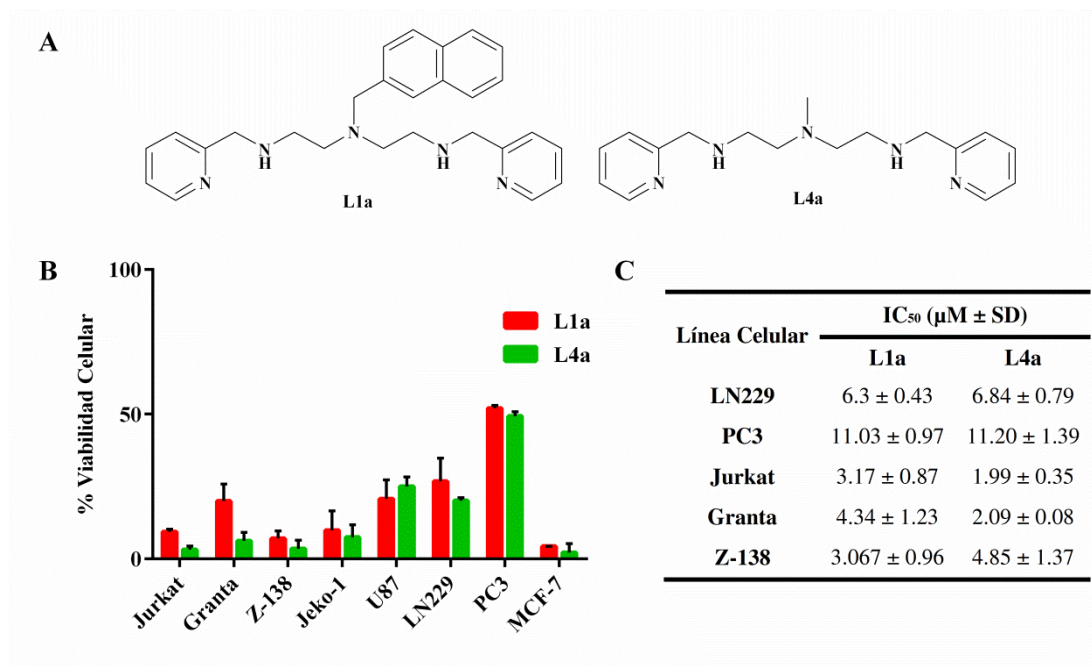


Figura 4.69. Viabilidad celular de un panel representativo de líneas celulares de diferente origen tumoral tras el tratamiento con **L1a** y **L4a**. **A.** Estructura de los compuestos activos **L1a** y **L4a**. **B.** Las líneas indicadas fueron tratadas a una concentración de 10 μM durante 48 horas. Se muestra la media ± SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por triplicado. **C.** Valores de IC₅₀ de **L1a** y **L4a** para las líneas seleccionadas correspondiente a la media ± SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por triplicado.

La viabilidad celular de estas nuevas líneas, tras 48 horas de incubación con los compuestos seleccionados (**L1a** y **L4a**) a una concentración de 10 μM, fue reducida significativamente, muy similar para ambos tratamientos. Del panel completo de las ocho líneas celulares, son aquellas derivadas de neoplasias hematológicas (Jeko-1, Jurkat, Granta-519 y Z-138), con una reducción de la viabilidad celular de entre el 90-95%, a excepción del tratamiento con **L1a** en la línea celular Granta-519 con un 80%.

Entre las cuatro líneas de tumores sólidos se observan diferencias en la sensibilidad, siendo la línea MCF-7 la más sensible con una reducción del 95%, las líneas de glioma LN229 y U87 de sensibilidad moderada, con una reducción entre el 70-80%, y PC3 la más resistente, con una reducción de aproximadamente el 50%.

A pesar de las diferencias observadas *in vitro*, las diferencias en la sensibilidad terapéutica de las leucemias/linfomas y los tumores sólidos tan sólo pueden ser explicadas por las diferencias

biológicas que definen el fenotipo resistente de los tumores sólidos *in vivo*, donde las interacciones intercelulares y con el estroma, en definitiva el microambiente tumoral, dificulta una respuesta efectiva a los diferentes tratamientos.¹⁵⁹

Por último, a partir de las curvas dosis-respuesta determinamos el valor IC₅₀ de **L1a** y **L4a** en cinco líneas. Los diferentes valores obtenidos se correlacionan con el perfil de sensibilidad a las 48 horas y la similitud estructural entre ambos compuestos, siendo de entre 2-4 µM para las líneas hematológicas, 6-7 µM para las líneas de glioma y 11 µM para PC3 (*figura 4.69.C*).

A continuación, al igual que en la sulfonamida **S8e**, analizamos la respuesta a nivel celular de **L1a** y **L4a**, su efecto sobre la progresión del ciclo celular, capacidad de inducción de apoptosis y daño al ADN.

Tratándose de un estudio preliminar establecimos una concentración estándar de 10 µM en los diferentes ensayos y seleccionamos como líneas de estudio LN229 y PC3, por ser representantes de los tumores sólidos más agresivos y refractarios a los tratamientos convencionales, el glioblastoma multiforme y el cáncer prostático metastásico, respectivamente.¹⁶⁰

La selección de estas líneas también estuvo supeditada a la experiencia por parte del grupo de investigación en el estudio de sinergias de fármacos de primera línea frente a estos tipos de tumores, en combinación con otros agentes quimioterapéuticos convencionales, especialmente en líneas celulares de glioma. Si bien, en algunos ensayos se incluyen líneas hematológicas, y estudiar así la respuesta en las líneas celulares más sensibles.

4.5.2. Análisis de la distribución del ciclo celular

Realizamos una primera evaluación de los derivados **L1a** y **L4a** a las 24 horas en 4 líneas diferentes (LN229, U87, PC3 y Jurkat). El tratamiento con ambos compuestos a una concentración 10 µM, provocó una clara acumulación de la población celular en G0/G1 junto a una pérdida concomitante en la fase G2/M para todas las líneas. Con la excepción de la detección de una subpoblación hipodiploide tras el tratamiento con **L4a** (SubG1), indicativo de muerte apoptótica, en la línea más sensible Jurkat (*Figura 4.70*).

Posteriormente, determinamos el efecto sobre el ciclo celular a tiempos más prolongados de tratamiento en las líneas LN229 y PC3. En LN229 se observó un pequeño incremento en la subpoblación G0/G1 de las 24 a las 48 horas. Mientras que en la línea PC3, se detectó una población SubG1 en detrimento con el porcentaje de células en G0/G1 en los dos tratamientos, siendo mayor en el correspondiente a **L4a** (*figura 4.71*).

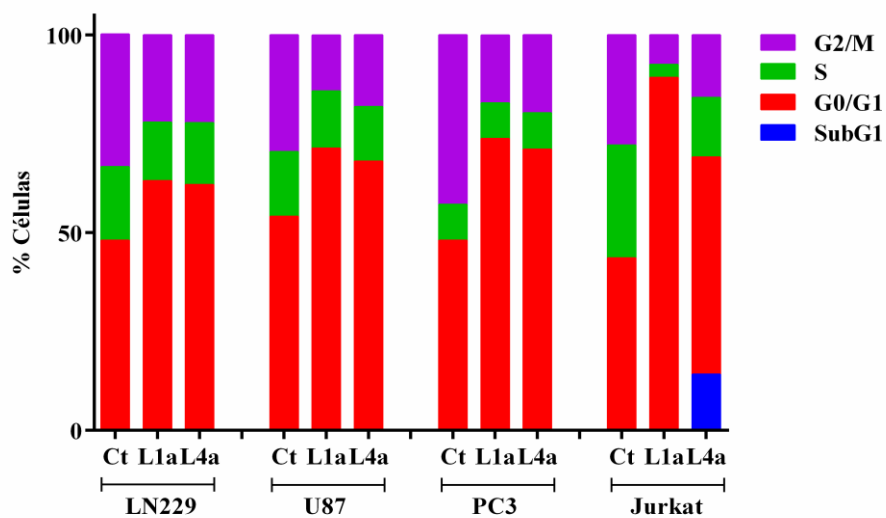


Figura 4.70. Análisis de la distribución del ciclo celular en un panel de líneas celulares tras el tratamiento con los derivados poliamínicos **L1a** y **L4a**. Distribución porcentual de las distintas fases del ciclo celular en las líneas indicadas, previo tratamiento con **L1a** y **L4a** a una concentración 10 μ M durante 24 horas.

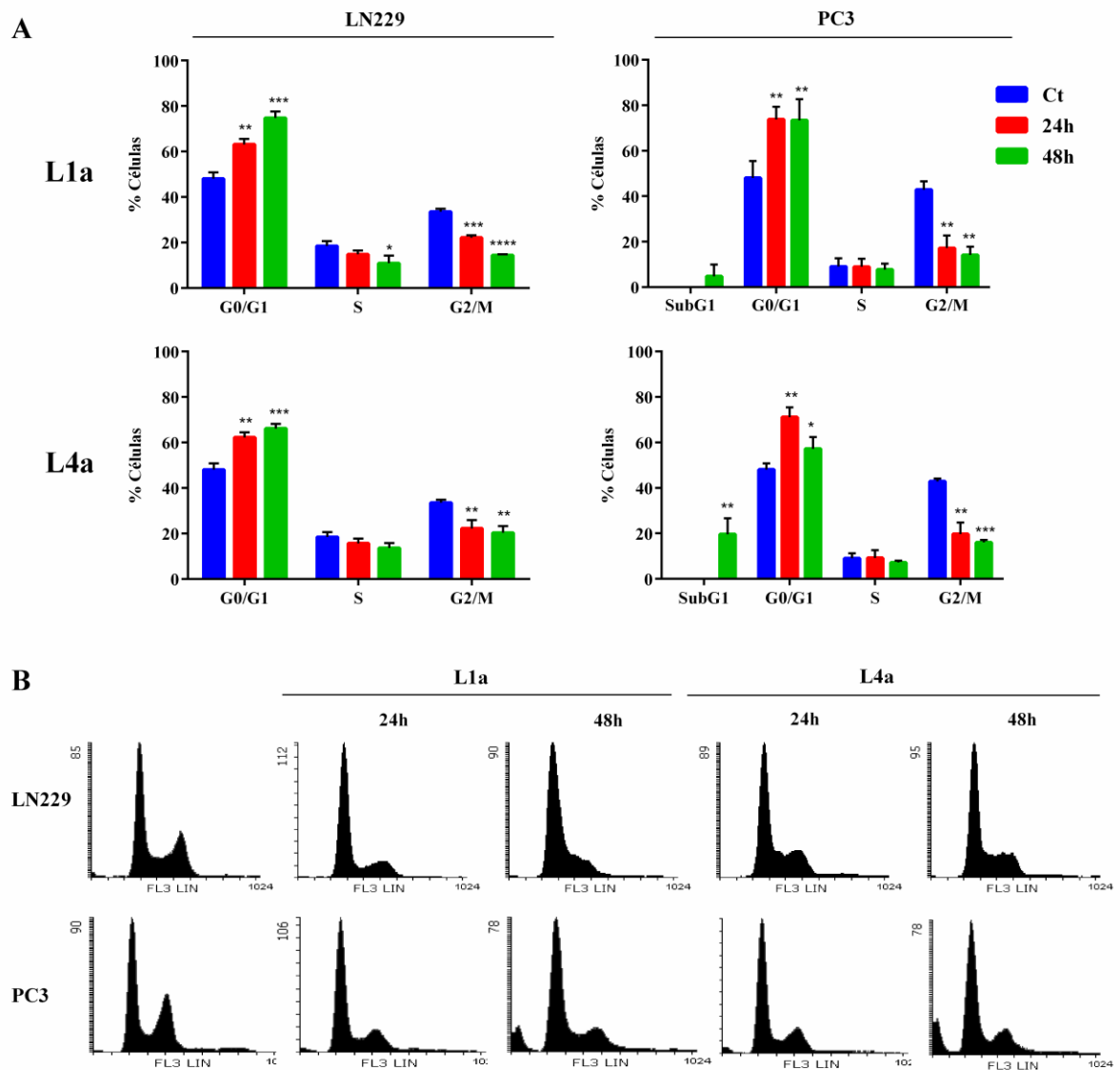


Figura 4.71. Análisis de la distribución del ciclo celular de LN229 y PC3 tras el tratamiento con los derivados **L1a** y **L4a**. **A.** Distribución porcentual de las distintas fases del ciclo celular en las líneas indicadas, previo tratamiento con **L1a** y **L4a** a una dosis 10 μ M durante 24 y 48 horas. Se muestra la media \pm SD de tres ensayos independientes. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student revela diferencias significativas entre los tratamientos y el control (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001). **B.** Histogramas representativos para las líneas seleccionadas tras 24 y 48 horas de tratamiento con **L1a** y **L4a**.

4.5.3. Análisis morfológico

Observamos los cambios morfológicos en las líneas seleccionadas LN229 y PC3, tras el tratamiento con **L1a** y **L4a** a la misma dosis e intervalos de tiempo por microscopía de contraste de fases.

En la *figura 4.72* se muestran las imágenes de la línea LN229 tras el tratamiento con **L1a**, y en la *figura 4.73* se muestran las imágenes de la línea PC3 tras el tratamiento con **L4a**.

Los cambios morfológicos observados para los dos tratamientos a diferentes tiempos fueron similares. A las 24 horas de tratamiento las células tratadas, en comparación con las células control, presentan un cambio morfológico apreciable. En su mayoría presentan un fenotipo característico de senescencia, especialmente en LN229 tras el tratamiento con el derivado **L1a** (*figura 4.72*), con un aumento del tamaño celular y granulosidad citoplasmática.

A las 48 horas se observa una subpoblación apoptótica, fácilmente apreciable en la línea PC3 tras el tratamiento con el derivado **L4a** (*figura 4.73*), con células de menor tamaño, redondeadas y en ocasiones con la formación de proyecciones citoplasmáticas.

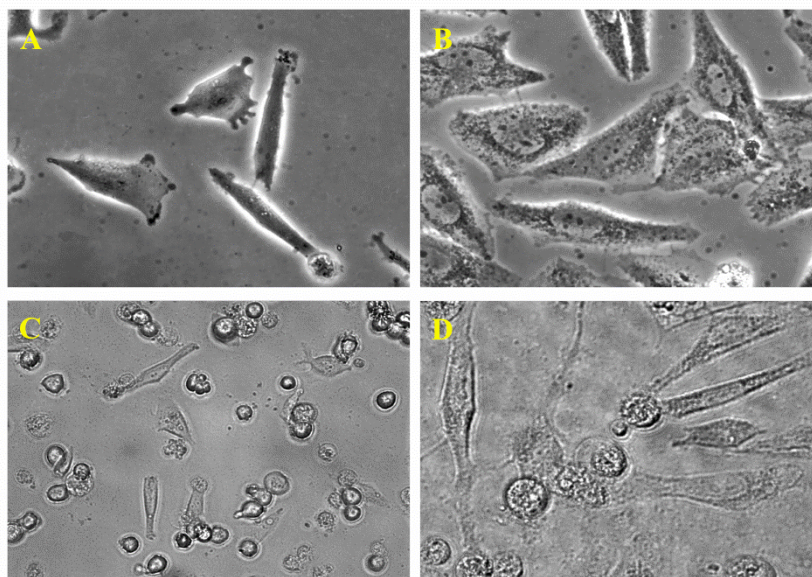


Figura 4.72. Cambios morfológicos en LN229 a diferentes tiempos de tratamiento con **L1a** a una concentración 10 μ M. **A.** Células no tratadas, imagen representativa realizada con un microscopio invertido ZEISS a una magnificación 100x. **B.** Células a las 24 horas de tratamiento, imagen representativa realizada con un microscopio invertido ZEISS a una magnificación 100x. **C.** Células a las 48 horas de tratamiento, imagen representativa realizada con un microscopio de contraste de fases a una magnificación 20x. **D.** Células a las 48 horas de tratamiento, imagen representativa realizada con un con un microscopio de contraste de fases a una magnificación de 40x.

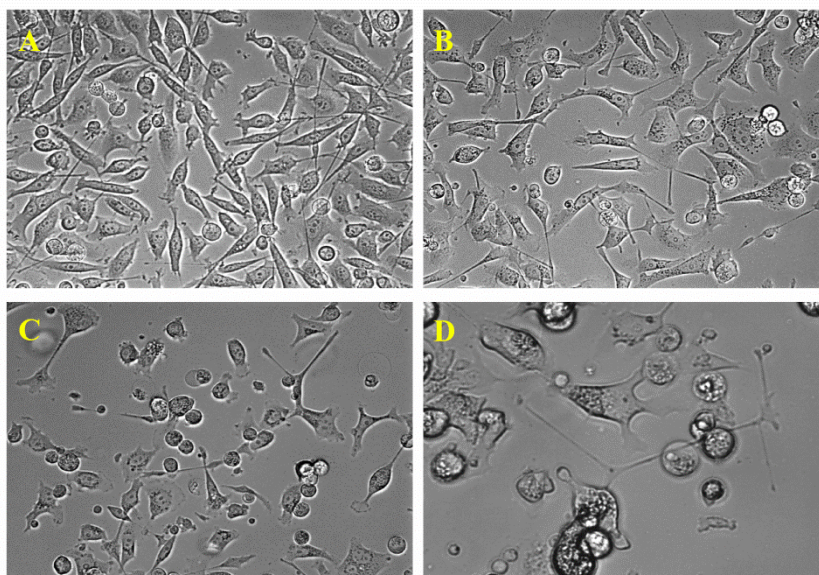


Figura 4.73. Cambios morfológicos en PC3 a diferentes tiempos de tratamiento con **L4a** a una concentración 10 μ M. Imágenes representativas realizadas con un microscopio de contraste de fases. **A.** Células no tratadas, imagen representativa a una magnificación 20x. **B.** Células a las 24 horas de tratamiento, imagen representativa a una magnificación 20x. **C.** Células a las 48 horas de tratamiento, imagen representativa a una magnificación 20x. **D.** Células a las 48 horas de tratamiento, imagen representativa a una magnificación de 40x.

4.5.4. Senescencia

Atendiéndonos a estos criterios, la acumulación de células en la fase G1/G0 en las dos líneas tratadas, junto con la morfología que presentaban, sugirieron que los tratamientos podrían inducir senescencia prematura o acelerada.

Determinamos la inducción de senescencia en las dos líneas de estudio LN229 y PC3, mediante el *kit Senescence Cells Histochemical Staining*. La evaluación de la misma se realizó a las 24 horas para los dos tratamientos, **L1a** y **L4a**, por ser el período en el que se observó una población con características morfológicas asociadas al fenotipo senescente.

El análisis microscópico de la tinción azul mostró claramente la capacidad de inducir senescencia por ambos compuestos en las dos líneas, aunque con notables diferencias.

En las *figuras 4.74 y 4.75* se muestran las imágenes correspondientes a las líneas celulares LN229 y PC3 tras el tratamiento con **L1a** y **L4a**, respectivamente.

En las células control puede observarse como ruido de fondo una coloración azul más tenue, si bien consideramos como células senescentes aquellas que presentaban claramente un aumento de su tamaño, donde la tinción del sustrato cromogénico se localiza en la región perinuclear, ocupando en su mayoría la totalidad del citoplasma y el cual presenta además una granulosidad apreciable.

Aunque la sensibilidad de las líneas LN229 y PC3 para los dos compuestos, en términos de IC_{50} , resultó prácticamente la misma, el porcentaje de células senescentes es significativamente mayor en las dos líneas tras el tratamiento con el compuesto L1a, alcanzándose hasta casi un 80% de células senescentes en LN229 y un 50% en PC3 (figuras 4.76).

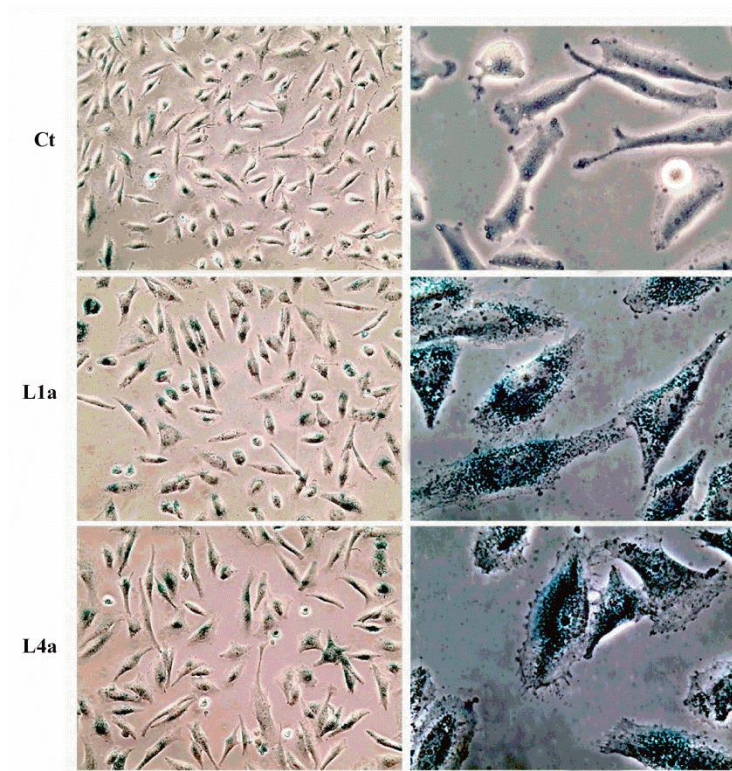


Figura 4.74. Análisis de la inducción de senescencia por L1a en LN229. Imágenes representativas realizadas con un microscopio ZEISS a una magnificación 20x (derecha) y 100x (izquierda).

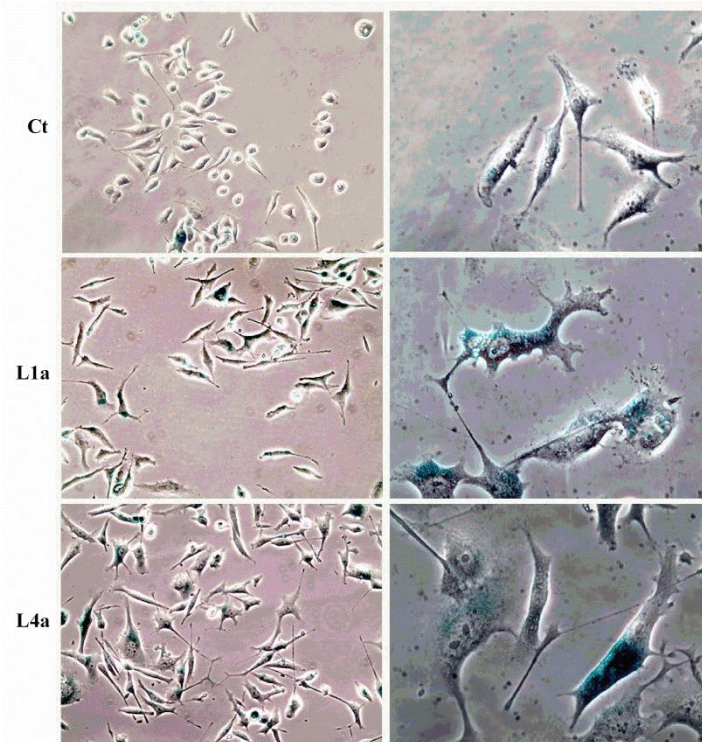


Figura 4.75. Análisis de la inducción de senescencia por **L4a** en PC3. Imágenes representativas realizadas con un microscopio ZEISS a una magnificación 20x (derecha) y 100x (izquierda).

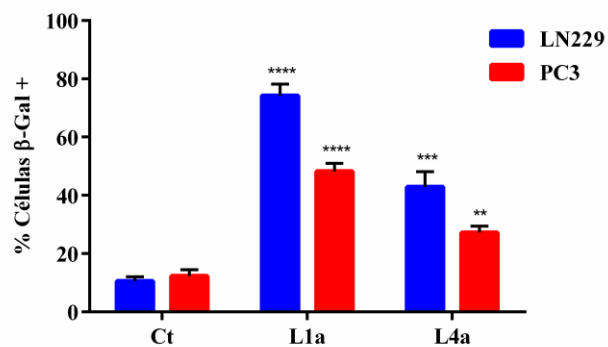


Figura 4.76. Porcentaje de células β -gal positivas tras el tratamiento con los derivados **L1a** y **L4a** en LN229 y PC3. Las líneas indicadas fueron tratadas a una concentración 10 μ M durante 24 horas. Se representa la media \pm SD de cuatro ensayos independientes evaluada cada condición por duplicado. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student revela diferencias significativas entre los tratamientos y el control (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

La capacidad de inducir senescencia ha sido descrita tanto en tratamientos con radioterapia como agentes quimioterapéuticos con diferentes mecanismos de acción, *in vitro* e *in vivo*, donde la inducción de senescencia es dosis-dependiente.¹⁶¹ Así, se ha descrito para fármacos genotóxicos como la doxorrubicina, la bleomicina o la mitomicina, que debido al exhaustivo conocimiento del mecanismo por el cual dañan el ADN pueden considerarse como un buen modelo de inducción de senescencia por estrés.¹⁶²

También se ha descrito la inducción de senescencia para aquellos que generan estrés oxidativo como el ionóforo piritiona¹⁶³, fármacos antimitóticos, como docetaxel o la vincristina¹⁶⁴ y anteriormente en nuestro estudio la sulfonamida **S8e**, así como en terapias dirigidas tras el tratamiento con gefitinib, inhibidor de la tirosina quinasa asociada al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*)¹⁶⁵ o el bortezomib, inhibidor del proteosoma.¹⁶⁶

Este fenotipo denominado senescencia inducida por terapia (TIS, *Therapy-Induced Senescence*) es considerado como una estrategia terapéutica, basada en una administración crónica de pequeñas dosis efectivas para inducir senescencia en células tumorales y puedan ser eliminadas a través del sistema inmune atraídas por el fenotipo secretor (SASPs).¹⁶⁷ No obstante, es necesario determinar las situaciones donde favorece la erradicación del tumor y su reproducibilidad *in vivo*.¹⁶⁸

Otro de los aspectos a considerar en la TIS es la vía de activación de senescencia. Aunque todavía no se conocen con exactitud, hasta el momento las más estudiadas son las vías ATM/p53/p21 y p16/pRb, y en los últimos años la vía de activación a través de p38-MAPK.¹⁶⁹ Ésta última de especial relevancia por aparecer el gen *TP53* mutado en más del 50% de los cánceres.¹⁷⁰

Las líneas celulares utilizadas en nuestro estudio, LN229 y PC3, son líneas con p53 no funcional¹⁷¹ y en las que se confirma la inducción relativa de senescencia por **L1a** y **L4a**, significativamente en LN229. De la misma manera, diferentes estudios confirman la inducción de senescencia por diferentes agentes quimioterapéuticos independientemente del estado funcional de p53, p21 y p16.¹⁷²

4.5.5. Apoptosis

Dado que el estudio morfológico reveló una subpoblación de células con una morfología propia de muerte por apoptosis, evaluamos la capacidad de su inducción por los derivados **L1a** y **L4a**. Para ello llevamos a cabo tres ensayos basados en eventos característicos del proceso apoptótico: 1). activación de caspasas, 2). despolarización de la membrana mitocondrial y, 3) pérdida de la asimetría de la membrana plasmática por externalización de la fosfatidilserina (FS).

4.5.5.1. Activación de caspasas ejecutoras -3 y -7

Determinamos la actividad de las caspasas -3 y -7 mediante el *Kit Caspase-Glo[®]3/7 Assay*. Al igual que en los estudios de actividad caspasa de la sulfonamida **S8e**, realizamos el ensayo en el mismo

panel de líneas celulares empleado para determinar la viabilidad celular, a la misma concentración (10 μM) y duración de tratamiento (48 horas), con la finalidad de determinar si el proceso de muerte es dependiente de caspasas y si existe una correlación entre su inducción y la citotoxicidad.

Al comparar los valores obtenidos de viabilidad celular y la actividad caspasa, expresada como *fold induction* respecto de las células control, observamos que existe una cierta correlación para los dos tratamientos, la actividad caspasa es inversamente proporcional a la viabilidad celular, a excepción de las líneas Granta-519 y Z-138 en respuesta al tratamiento con **L4a** (figura 4.77).

Por tanto, los resultados sugieren que la capacidad de la actividad antiproliferativa se debe a la inducción de senescencia a las 24 horas de tratamiento seguida posiblemente por un mecanismo apoptótico mediado por la activación de caspasas.

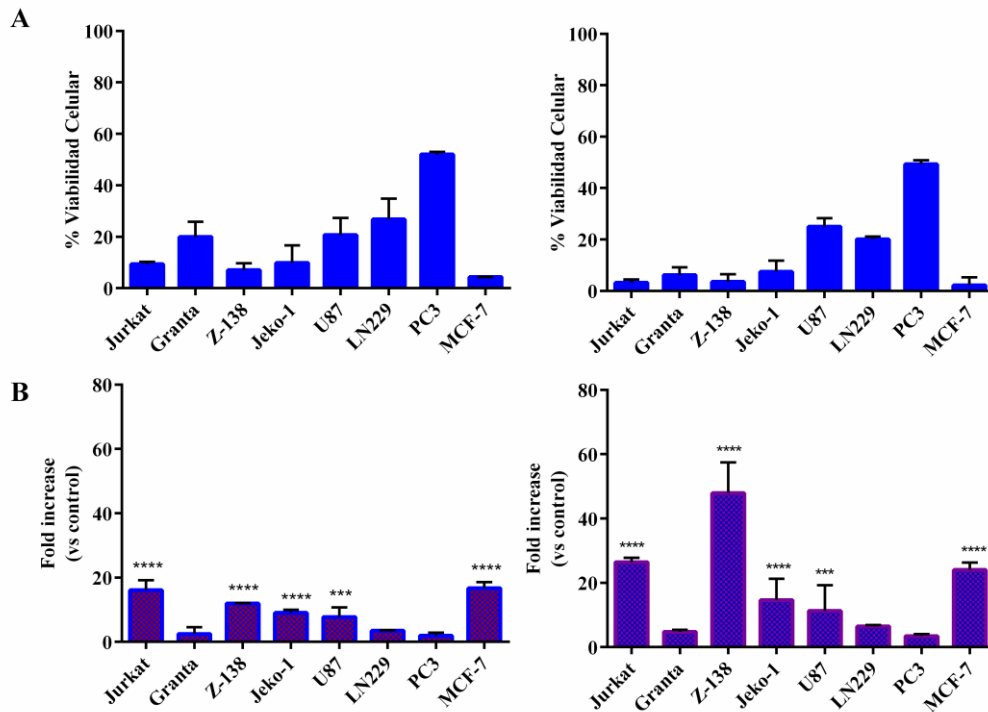


Figura 4.77. Análisis de la actividad caspasa inducida en un panel representativo de líneas celulares con **L1a** y **L4a**. Las líneas indicadas fueron tratadas a una concentración 10 μM durante 48 horas. Los resultados se expresan como *fold induction*, respecto a las células no tratadas. Se representa la media \pm SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por triplicado. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de student revela diferencias significativas entre los tratamientos y el control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

4.5.5.2. Monitorización del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m)

Posteriormente, monitorizamos la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, evento indicativo de disfunción del metabolismo energético y daño celular asociado con apoptosis y necrosis.¹⁷³

La formación de poros de transición de permeabilidad en la membrana externa (MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) es uno de los eventos determinantes en la activación de la apoptosis, tras su inducción principalmente por vía intrínseca. Durante el proceso, el flujo de proteínas mitocondriales que son liberadas al citosol se acompaña de una disminución del potencial electroquímico en la matriz mitocondrial. Por ello, la detección de esta despolarización se fundamenta en la localización de fluoróforos catiónicos lipofílicos que se distribuyen entre la matriz mitocondrial o el citoplasma en función del gradiente electroquímico establecido.¹⁷⁴

Para monitorizar la MOMP utilizamos el kit *MitoProbe™ JC-1 Assay (Molecular Probes™)*. Éste incluye el fluoróforo catiónico JC-1 (Ioduro de 5',6,6',3,3'-tetra-etilbenzimidazolil-carbocianina), cuya acumulación es dependiente del potencial de membrana mitocondrial en forma de agregados en la matriz mitocondrial que emiten a una longitud de onda de 590 nm, mientras que en su forma monomérica en el citosol emite a 529 nm (*figura 4.78*). Por la tanto, la detección de la MOMP viene indicada por el desplazamiento de la emisión de fluorescencia del naranja-rojo (590 nm) al verde (529 nm), o una disminución del ratio rojo/verde.¹⁷⁵

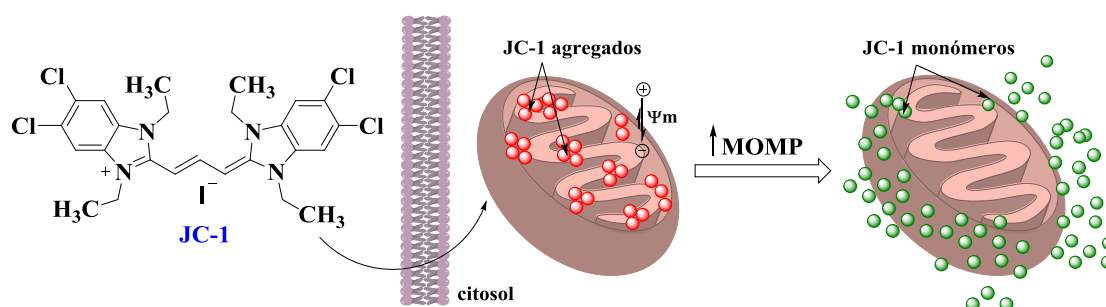


Figura 4.78. Distribución y detección de JC-1 en función de la MOMP. **JC-1:** Ioduro de 5',6,6',3,3'-tetra-etilbenzimidazolil-carbocianina.

Realizamos el ensayo en la línea LN229 a diferentes tiempos, a las 16, 24, 32 y 48 horas, tras un tratamiento a 10 μ M con **L1a** y **L4a**.

Como se observa en la *figura 4.79*, la despolarización, expresada como la disminución del ratio rojo/verde, se produce de manera progresiva alcanzándose una reducción de manera significativa a las 48 horas de tratamiento, en concordancia con el fenotipo apoptótico observado en el análisis morfológico y la activación de las caspasas ejecutoras-3 y -7.

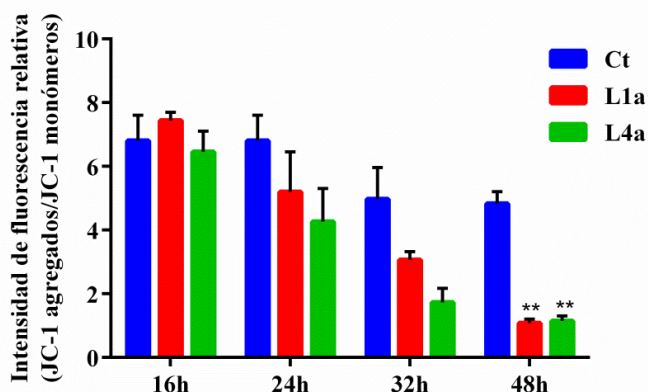


Figura 4.79. Monitorización de la despolarización de la membrana mitocondrial tras el tratamiento con **L1a** y **L4a** en LN229. Se representa la intensidad relativa de fluorescencia de JC-1 tras el tratamiento con los derivados poliamínicos a una concentración 10 μ M durante los tiempos indicados. Los resultados se representan como la media \pm SD del ratio rojo/verde de dos ensayos independientes evaluada cada condición por duplicado. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student revela diferencias significativas entre los tratamientos y el control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

4.5.5.3. Determinación del porcentaje de apoptosis

Por último, analizamos la inducción de apoptosis monitorizando la externalización de la FS mediante el doble marcaje con IP y Anexina V. En primer lugar realizamos el ensayo a las 24 y 48 horas de tratamiento con **L1a** y **L4a**, de acuerdo a los tiempos establecidos en los ensayos realizados anteriormente.

Como se muestra en la *figura 4.80.A*, la inducción de apoptosis (An^+/PI^- y An^+/PI^+), expresada como *fold increase* respecto a las células control, es de aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor tras el tratamiento con el derivado **L4a** en ambas líneas.

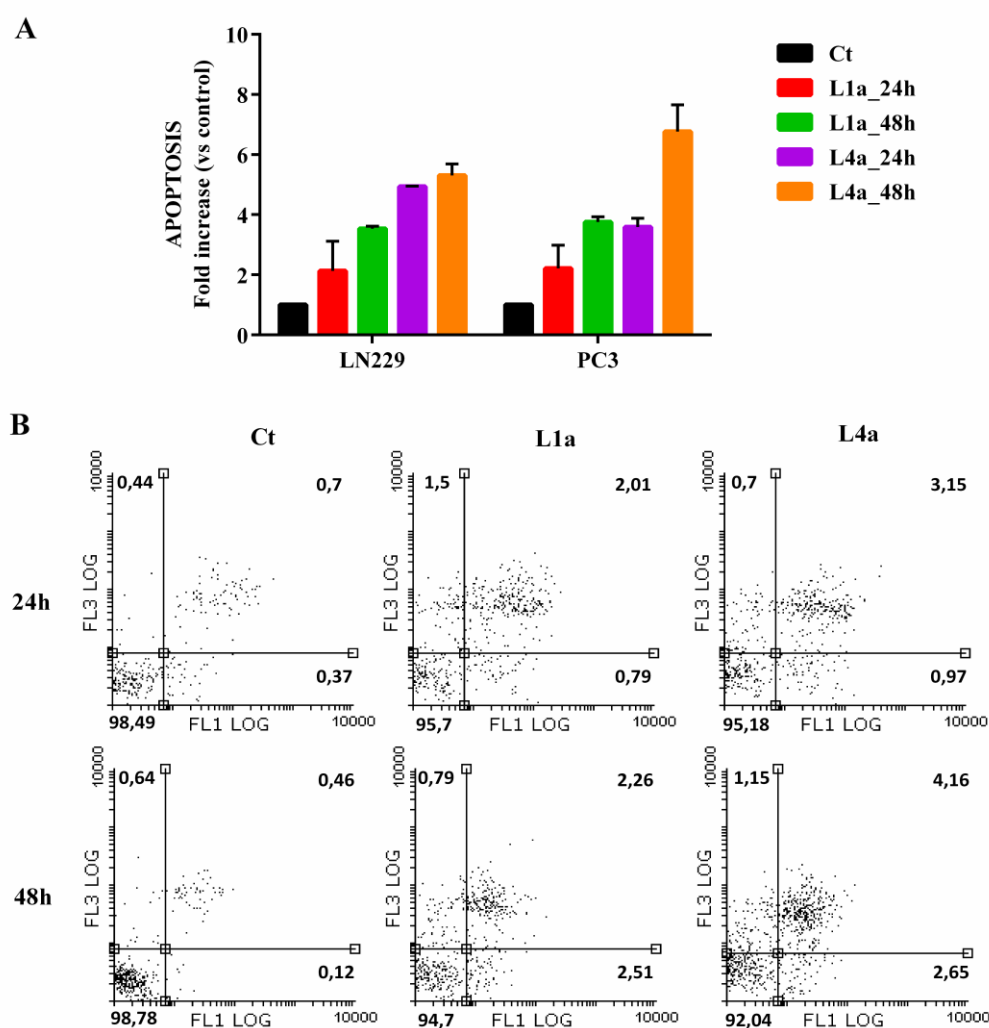


Figura 4.80. Análisis de la inducción de apoptosis por los derivados **L1a** y **L4a** en LN229 y PC3. **A.** Representación de la inducción de apoptosis por **L1a** y **L4a** (10 μ M) como *fold increase* respecto a las células no tratadas (Ct) en los tiempos indicados. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes. **B.** *Dot-plots* representativos de tres ensayos independientes tras el tratamiento con **L1a** y **L4a** a una concentración 10 μ M durante los tiempos indicados.

No obstante, a pesar de la inducción de las caspasas ejecutoras -3/7 y la significativa despolarización de la membrana mitocondrial a los tiempos evaluados, el incremento gradual del porcentaje de células apoptóticas para los diferentes tiempos respecto al control no fue muy significativo. Por lo que determinamos su inducción de a las 72 horas en la línea PC3 para los dos compuestos.

Como se muestra en la *figura 4.81*, a las 72 horas de tratamiento se observa un claro desplazamiento de la población celular hacia los cuadrantes de apoptosis temprana y tardía, siendo el *fold increase* de hasta 30 órdenes de magnitud.

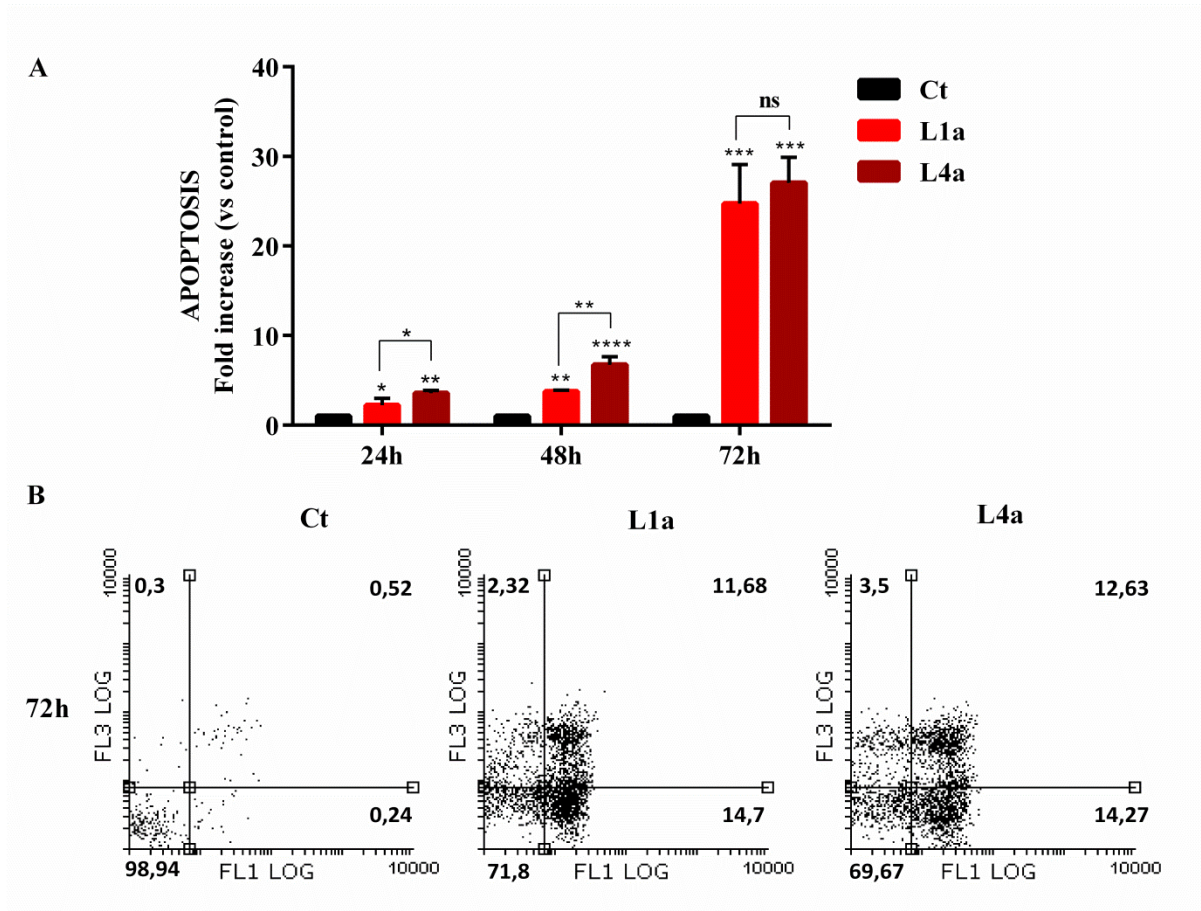


Figura 4.81. Análisis de la inducción de apoptosis por los derivados **L1a** y **L4a** en PC3 a las 72 horas de tratamiento. **A.** Representación de la inducción de apoptosis por **L1a** y **L4a** (10 μ M) como *fold increase* respecto a las células no tratadas (Ct) en los tiempos indicados. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de *Student* indica diferencias significativas entre los dos tratamientos a los tiempos indicados (ns: no significativo, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001). **B.** *Dot-plots* representativos de tres ensayos independientes tras el tratamiento con **L1a** y **L4a** de la línea celular PC3 a una concentración 10 μ M durante los tiempos indicados.

Los elevados niveles de apoptosis detectados en respuesta al tratamiento con **L4a** a las 24 y 48 horas de tratamiento con respecto a **L1a**, podrían justificar la menor inducción de senescencia en las mismas líneas. La senescencia y la apoptosis comparten vías de señalización, si bien las vías divergen y determinados genes se expresan en el proceso de senescencia.¹⁷⁶

Se ha demostrado que, en determinadas circunstancias, la apoptosis es una respuesta abrumadora al estrés, mientras que la senescencia es consecuencia de un daño menos severo.¹⁷⁷ La inducción de un proceso u otro como respuesta a un determinado fármaco está condicionada por diversos factores, principalmente de la línea o tipo celular, y del daño producido por el agente citotóxico y su concentración.¹⁷⁸ Por tanto, en referencia con la TIS comentada anteriormente, la concentración efectiva será aquella que se establezca por debajo de la dosis para inducir apoptosis.

Por otra parte, diversos estudios demuestran que una mínima lesión, en este caso en el ADN, induce tanto senescencia, autofagia y apoptosis de manera específica durante el tiempo de tratamiento, donde la senescencia es la respuesta principal al tratamiento, y la autofagia un mecanismo de supervivencia que estimula a la célula a entrar en senescencia e inhibir la apoptosis.¹⁷⁹

4.5.6. Análisis de daño al ADN

4.5.6.1. Detección de γ -H2AX

Los poliaminas fisiológicas, así como sus derivados, interaccionan con los ácidos nucleicos a través de distintos tipos de enlaces. Mediante sus grupos dadores, libres o protonados a pH fisiológico, establecen interacciones de tipo electrostático o puentes de hidrógeno con los grupos fosfato o bases nitrogenadas. Igualmente, la incorporación en el esqueleto poliamínico de anillos aromáticos conjugados o heterociclos, puede favorecer su interacción a partir de interacciones de tipo π *stacking*, que se ven favorecidas por el ambiente hidrofóbico del interior de la doble hélice.¹⁸⁰

Este mismo tipo de fuerzas de enlace son utilizadas por fármacos genotóxicos convencionales, que perturban la replicación por diferentes mecanismos, ya sea por intercalación (doxorrubicina), inhibición de la topoisomerasa II (etopósido), o por la producción de radicales libres tras su unión al ADN (bleomicina). Como resultado de esta interacción se promueve la ruptura de la doble hebra (DSB, *Double Strand Breaks*).¹⁸¹

Evaluamos la capacidad de **L1a** y **L4a** para inducir DSB monitorizando la fosforilación de la histona H2AX, denominada γ -H2AX en su forma fosforilada¹⁰⁸. Realizamos el ensayo a las 4 horas de tratamiento en la línea LN229 empleando como control positivo doxorrubicina, y a diferencia de otros ensayos incluimos la línea Z-138, más sensible a los tratamientos.

Los histogramas resultantes en las dos líneas muestran claramente la fosforilación tras el tratamiento con la doxorrubicina a través del desplazamiento y aumento de la intensidad de la banda de emisión, a diferencia de **L1a** y **L4a**, donde sólo se observa un ruido de fondo semejante al control (*Figura 4.82*).

La histona H2AX es una variante de la familia de las histonas H2A, rápidamente fosforilada en la Ser139 por los 3 miembros de la familia PIKK : ATM (*Ataxia-Talangiectasia Mutated*) ATR (*ATM and Rad 3 Related*) y DNA-PKcs (*DNA Protein kinase Catalytic subunit*) ante DSB. La rápida fosforilación es necesaria para el ensamblaje secuencial de un complejo de proteínas alrededor de los cortes, el cual estabiliza la estructura para su potencial reparación.¹⁸²

La fosforilación de la H2AX también interviene, junto con otras proteínas e histonas metiladas y deacetiladas, en la formación de *foci* de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF)¹⁸³, así como en el proceso de apoptosis, donde es fosforilada por varias quinasas en respuesta a señales apoptóticas, necesaria para la fragmentación del ADN.¹⁸⁴

La ausencia de esta fosforilación tras el corto tratamiento con estos compuestos sugiere que no son agentes que ejerzan su mecanismo de acción directamente a través del daño al ADN. Por otro

lado, aunque se ha demostrado que los derivados, **L1a** y **L4a**, inducen senescencia, al menos en LN229, la fosforilación de esta histona como marcador senescente podría requerir tiempos más largos de tratamiento, en concordancia al desarrollo del fenotipo senescente.

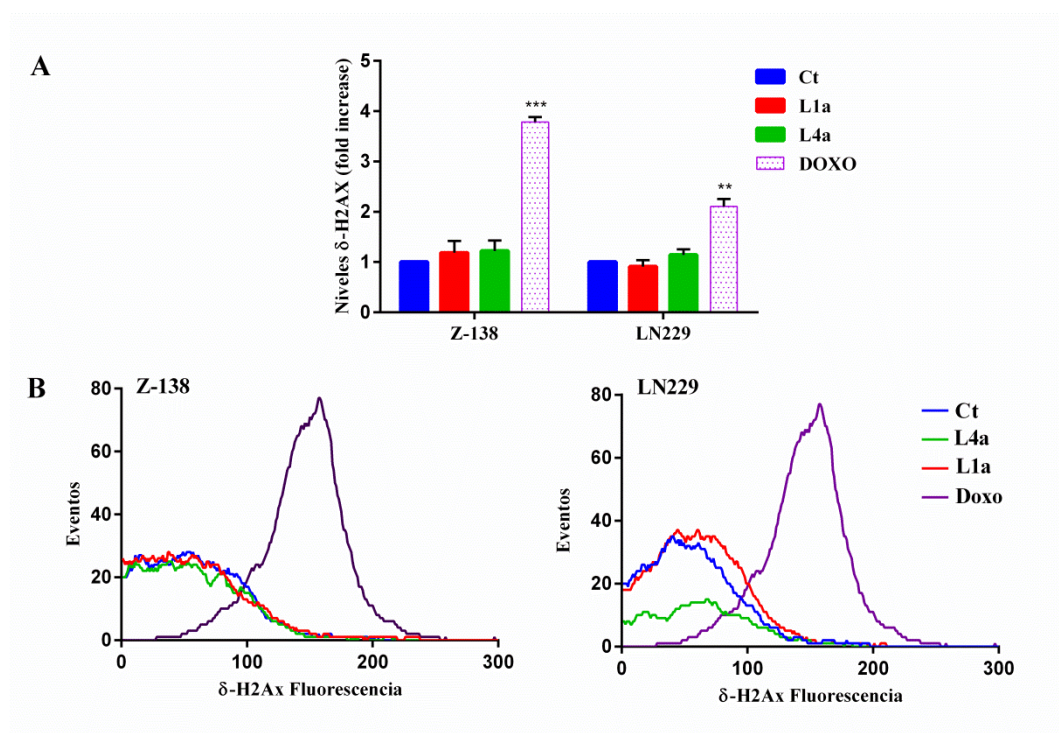


Figura 4.82. Análisis de la inducción de γ -H2AX por los derivados **L1a** y **L4a** **A.** Niveles de γ -H2AX tras el tratamiento con **L1a** y **L4a** a una concentración 10 μ M y doxorubicina a una dosis 1 μ M durante 4 horas en las líneas indicadas. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes. El análisis estadístico mediante la prueba *t* de Student revela diferencias significativas entre la doxorubicina y el control (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001). **B.** Histogramas representativos. Se muestra la intensidad de fluorescencia para el canal FL1. **Doxo:** Doxorubicina.

4.5.6.2. Determinación de la capacidad clonogénica

Por último, para determinar la fracción de células que son capaces de mantener su integridad reproductiva tras el tratamiento con los compuestos, realizamos ensayos clonogénicos en las líneas LN229 y PC3. Al igual que en ensayos anteriores, las células fueron tratadas con **L1a** y **L4a** a una concentración 10 μ M durante 4 horas, empleándose como control positivo el etopósido a una concentración 30 μ M.

Como se observa en la *figura 4.83*, la clonogenicidad de las células tratadas con **L1a** y **L4a** resultó muy similar a las células control, a diferencia de aquellas tratadas con etopósido, por lo que se confirma que estos compuestos no promueven la respuesta de un agente inductor de daño al ADN.

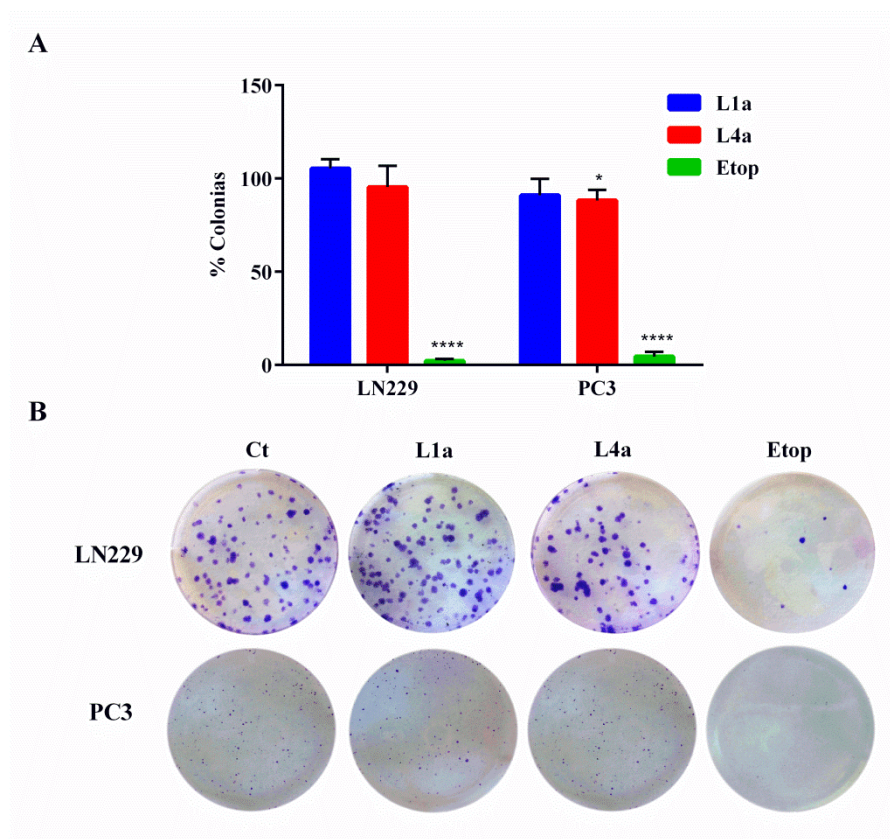


Figura 4.83. Clonogenicidad de los derivados **L1a** y **L4a**. **A.** Porcentaje de colonias formadas en condiciones de muy baja densidad celular. **B.** Imágenes representativas tras la tinción de las colonias con violeta cristal (0.4%). **Etop.** Etopósido

Los derivados poliamínicos **L1a** y **L4a**, identificados en los cribados de selección entre los 12 compuestos evaluados, presentan un perfil antiproliferativo *in vitro* de amplio espectro, con valores de IC_{50} muy similares entre ambos compuestos. El tratamiento con estos derivados, a una concentración estándar de 10 μ M, promueve la parada del ciclo celular en la fase G1/G0 junto con la inducción de senescencia y apoptosis. La magnitud de inducción secuencial de senescencia y apoptosis es dependiente de línea y compuesto, observándose una mayor inducción de senescencia en la línea celular LN229 y una mayor inducción de apoptosis en la línea celular PC3. La inducción de apoptosis está mediada por caspasas con la activación de la vía intrínseca por la despolarización progresiva de la membrana mitocondrial. No obstante, estos resultados estarán supeditados a estudios complementarios, como la expresión de otros marcadores de senescencia, así como la expresión de caspasas iniciadoras o de proteínas pro y anti-apoptóticas.

El efecto celular observado no estaría mediado por un mecanismo de daño directo al ADN. La ausencia de la fosforilación de la fosfohistona H2AX y la clonogenicidad de las células tras un breve periodo tratamiento de 4 horas con **L1a** y **L4a**, permite descartar que se trate de agentes genotóxicos.

4.5.7. Relación Estructura-Actividad

A pesar de las diferencias a nivel celular observadas en las diferentes líneas evaluadas con **L1a** y **L4a**, estos derivados comparten características estructurales que permiten establecer fácilmente una primera aproximación de la Relación Estructura-Actividad (REA) (*figura 4.84*):

- La introducción de anillos piridínicos sustituidos en las posiciones 3 y 4, así como un anillo quinolínico en posición 4 resulta en una pérdida total de actividad.
- La piridina en posición 2 debe formar parte de un grupo picolilo, no inhibiendo la capacidad antiproliferativa con la formación de un grupo carboxamida.
- La formación de un grupo sulfonamida en el nitrógeno central resulta en una pérdida total de actividad.

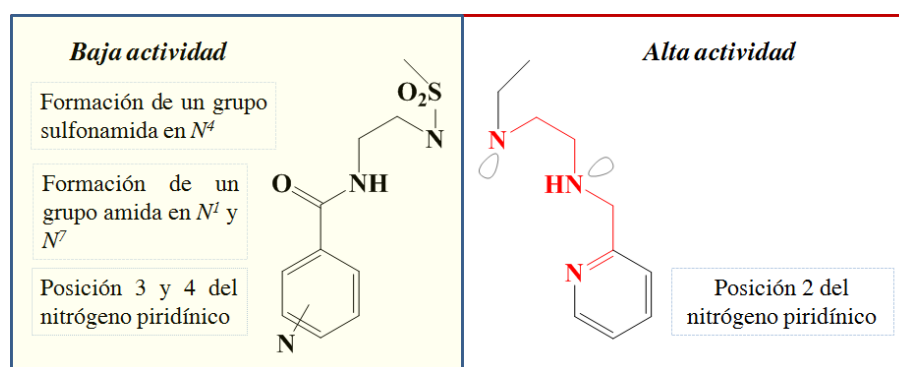


Figura 4.84. Relación Estructura- Actividad de las poliaminas **L1-L5**.

Atendiéndonos a estas premisas podríamos afirmar que el farmacóforo de nuestra pequeña librería consistiría con la cadena bis-2-picolil-1,4-7-triazaheptano, motivo estructural de diferentes poliazaalcanos ampliamente estudiados como receptores moleculares, tanto de especies catiónicas como aniónicas de especial relevancia biológica. Concretamente, se describen como agentes quelantes de Zn (II) ¹⁸⁵ y Cu(II) ,¹⁸⁶ mecanismo por el cual median su actividad antiproliferativa en diferentes líneas tumorales, o como biosensores por su reconocimiento específico de fosfatos¹⁸⁷ o mononucleótidos.¹⁸⁸

Considerando que la principal diferencia estructural entre los compuestos activos y no activos de nuestra librería es la naturaleza de los grupos amino, así como la posición del nitrógeno heterocíclico, uno de los estudios iniciados es la determinación de las constantes de protonación y su especiación a pH fisiológico. Posteriormente, se determinarán sus constantes de complejación con Zn(II) y Cu(II) y se comprobará si existe una correlación entre las constantes de disociación del complejo y la depleción intracelular de estos cationes en diferentes líneas tumorales.

Otro de los aspectos a considerar en posteriores estudios es el transporte al interior de la célula, si se corresponde a un transporte pasivo o activo y, en este último si se realiza por medio del

Sistema de Transporte de Poliaminas (PTS) mediante un ensayo de competición con las poliaminas naturales.

Paralelamente, los derivados activos, **L1a** y **L4a**, serán remitidos al NCI para su evaluación en el panel de 60 líneas celulares. En función de los resultados obtenidos con el posterior análisis COMPARE¹⁸⁹ se estudiarán los mecanismos propuestos derivados del mismo análisis.

4.6. Estudios de actividad antiparasitaria *in vitro* de las poliaminas L1-L5

La evaluación de la actividad antiparasitaria de los derivados poliamínicos **L1-L5** fue realizada por el Grupo de Parasitología de la Universidad de Granada dirigido por el Dr. Manuel Sánchez Moreno. Los diferentes compuestos fueron evaluados en formas extra- e intracelulares de tres aislados de *Leishmania*: *L. infantum*, *L. donovani* y *L. braziliensis*, y frente a *T. cruzi*.

El algoritmo de selección consistió en un cribado inicial frente a formas promastigotes de *Leishmania* spp. y epimastigotes de *T. cruzi*, determinándose el valor IC₅₀ a partir de las curvas dosis-respuesta de acuerdo al protocolo estandarizado por el mismo grupo de investigación.¹⁹⁰

Como fármacos de referencia en la evaluación de la actividad leishmanicida se utilizó el Glucantime®, antimonio de meglumina, fármaco de primera línea en el tratamiento de la leishmaniosis visceral y las diversas formas cutáneas y, el Benznidazol, como fármaco de referencia tripanocida.

Paralelamente, se realizaron estudios de citotoxicidad en macrófagos J774.2 y células Vero para definir el índice de selectividad (IS) como criterio para su selección en posteriores estudios *in vivo*.

Como se muestra en la *tabla 4.27*, los 12 derivados evaluados presentaron relativa actividad frente a las formas extracelulares de ambos kinetoplástidos determinándose valores de IC₅₀ comprendidos entre 3 y 97 µM. No obstante, en su mayoría resultaron citotóxicos tanto en macrófagos J774.2 y células Vero.

Si analizamos los resultados en función de su IS (*tabla 4.28*), un derivado resultó activo y no citotóxico frente a formas promastigotes de todas las especies de *Leishmania*, el derivado **L2e**, de manera significativa en *L. infantum* y *L. braziliensis* con un IS de 453 y 45, respectivamente. Un mayor número de derivados resultaron activos frente a formas epimastigotes de *T. cruzi*, de los cuales, tres presentaron un IS comprendido entre 6 y 9, **L1b**, **L1e** y **L5a**; y dos derivados, **L2b** y **L4a**, fueron activos frente a las formas extracelulares de ambos kinetoplástidos con elevados IS.

En la evaluación posterior de estos mismos derivados (**L1b**, **L1e**, **L2b**, **L2e**, **L4a** y **L5a**) en las formas intracelulares (*tabla 4.29*) pueden distinguirse dos perfiles de actividad: 1) compuestos activos tan sólo en formas epimastigotes de *T. cruzi* (**L1b**, **L1e** y **L5a**) cuya evaluación en formas amastigotes resultó en una reducción considerable de la actividad y, 2) compuestos cuyo IC₅₀ aumenta considerablemente en las formas amastigotes en *Leishmania* spp., correspondiéndose con los derivados **L2b** y **L2e**, o en las formas intracelulares de ambos kinetoplástidos, como el derivado **L4a**.

C ^a	^b IC ₅₀ (μM)				^c CC ₅₀ (μM)	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>T. cruzi</i>	J774	Vero
L1a	16.9 ± 2.9	53.1 ± 4.8	28.7 ± 1.7	27.0 ± 2.5	54.5 ± 6.3	58.1 ± 3.8
L1b	28.6 ± 3.7	81.0 ± 6.3	30.0 ± 2.3	5.7 ± 0.7	38.0 ± 7.1	38.4 ± 2.6
L1c	9.1 ± 1.1	51.7 ± 5.8	23.7 ± 1.8	21.7 ± 1.7	18.9 ± 3.7	25.7 ± 1.5
L1d	47.9 ± 5.6	30.0 ± 1.2	11.53 ± 2.2	11.0 ± 1.3	11.1 ± 0.9	5.2 ± 1.7
L1e	26.3 ± 3.7	20.1 ± 1.6	8.2 ± 0.9	10.0 ± 0.8	17.1 ± 2.2	93.2 ± 5.0
L2a	28.5 ± 3.5	47.3 ± 3.9	9.0 ± 1.2	10.4 ± 1.1	17.2 ± 4.5	41.2 ± 0.8
L2b	20.4 ± 4.1	34.8 ± 2.5	32.7 ± 1.5	36.3 ± 1.6	119.0 ± 7.8	136.2 ± 8.4
L2e	1.92 ± 0.6	96.8 ± 7.4	19.1 ± 1.2	59.6 ± 3.8	870.2 ± 51.2	49.3 ± 5.1
L3a	10.5 ± 1.1	34.3 ± 2.9	19.7 ± 2.0	14.3 ± 1.4	4.1 ± 1.5	14.9 ± 2.5
L4a	11.1 ± 2.0	25.1 ± 1.8	19.8 ± 1.4	21.4 ± 2.0	166.1 ± 10.4	187.6 ± 13.5
L4c	1.41 ± 0.4	20.0 ± 1.6	7.7 ± 1.3	7.4 ± 1.0	17.8 ± 2.1	28.3 ± 3.3
L5a	5.5 ± 0.7	12.8 ± 1.0	19.4 ± 2.1	5.5 ± 0.6	5.8 ± 0.4	37.3 ± 2.5
^d G	18.0 ± 3.1	27.4 ± 3.8	25.6 ± 1.6	-	15.2 ± 1.3	-
^e B	-	-	-	16 ± 1	-	13.6 ± 0.9

Tabla 4.27. Susceptibilidad de las formas promastigotes de *Leishmania* spp. y epimastigotes de *T. cruzi* frente a los derivados poliamínicos L1-L5. ^aC: Compuesto; ^bIC₅₀: concentración de compuesto que produce una reducción de la viabilidad celular de un 50% respecto al cultivo no tratado; ^cCC₅₀: concentración citotóxica media; ^dG: Glucantime® (Antimoniato de meglumina); ^eB: Benznidazol.

	IS			
	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>T. cruzi</i>
L1a	3.2	ND	1.9	2.0
L1b	1.3	ND	1.3	6.7
L1c	2.1	ND	0.8	0.9
L1d	0.2	ND	1.0	0.5
L1e	0.6	ND	1.9	9.3
L2a	0.6	ND	1.9	4.0
L2b	5.8	3.6	3.6	3.7
L2e	453.2	9	45.6	0.8
L3a	0.4	ND	nd	1.0
L4a	15.0	6.6	8.4	8.8
L4c	5.2	ND	2.3	3.8
L5a	1.0	ND	0.3	6.78
^a G	0.8	0.5	0.6	-
^b B	-	-	-	0.8

Tabla 4.28. Índices de selectividad de los derivados L1-L5 frente a formas extracelulares de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*. ^aG: Glucantime® (Antimoniato de meglumina); ^bB: Benznidazol.

	<i>L. infantum</i>		<i>L. donovani</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>T. cruzi</i>	
	^a IC ₅₀	^b IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS
L1b	^c ND	ND	ND	ND	ND	ND	50.0 ± 3.5	7.3
L1e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20.1 ± 1.4	7.8
L2b	12.5 ± 0.6	9.5	17.7 ± 0.9	9.6	12.4 ± 0.8	10.9	29.6 ± 1.7	12.0
L2e	1.11 ± 0.6	784.0	1.1 ± 0.3	511.9	1.7 ± 0.1	29	ND	ND
L4a	6.2 ± 1.2	26.8	0.9 ± 0.0	17.5	9.5 ± 0.8	19.7	4.87 ± 0.5	75.0
L5a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53.2 ± 3.2	15.3
^d G	24.2 ± 2.6	0.62	31.4 ± 4.1	0.48	30.4 ± 6.1	0.5	-	-
^e B	-	-	-	-	-	-	23.3 ± 1.6	0.5

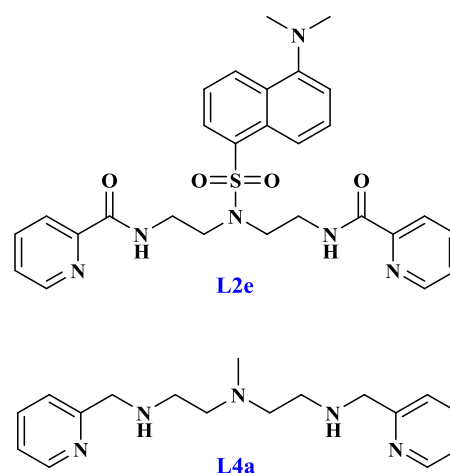
Tabla 4.29. Susceptibilidad de las formas intracelulares de *Leishmania* spp. y *T. cruzi* frente a las poliaminas evaluadas **L1-L5**. ^aIC₅₀: concentración de compuesto que produce una reducción de la viabilidad celular de un 50% respecto al cultivo no tratado; ^bIS: índice de selectividad (IS = CC₅₀/IC₅₀); ^cND: No Determinado. ^dG: Glucantime® (Antimoniato de meglumina); ^eB: Benznidazol.

Con el análisis global de estos resultados podemos concluir que los derivados poliamínicos evaluados presentan un perfil de actividad más leishmanicida que tripanocida.

Curiosamente, el derivado **L2e**, tan sólo activo frente a *Leishmania* spp. presentó unos IS muy superiores respecto a sus análogos estructurales y al fármaco de referencia, de 784 y 511.9 en *L. infantum* y *L. donovani*, respectivamente.

Por otro lado, el derivado **L4a**, identificado anteriormente en los estudios de actividad antitumoral por su capacidad antiproliferativa de amplio espectro, también presentó IS muy superiores al fármaco de referencia, sin embargo en este caso, el IS más significativo registrado resultó frente a *T. cruzi*.

Estudios posteriores en modelos *in vivo* permitirán confirmar la potencialidad de estos derivados como fármacos leishmanicidas y/o tripanocidas.



4.7. Bibliografía

1. (a) Drewry, D. H.; Macarron, R., Enhancements of screening collections to address areas of unmet medical need: an industry perspective. *Curr Opin Chem Biol* **2010**, *14* (3), 289-298; (b) Ray, P. C.; Kiczun, M.; Huggett, M.; Lim, A.; Prati, F.; Gilbert, I. H.; Wyatt, P. G., Fragment library design, synthesis and expansion: nurturing a synthesis and training platform. *Drug Discov Today* **2017**, *22* (1), 43-56; (c) Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L., Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* **2011**, *162* (6), 1239-1249.
2. Dea-Ayuela, M. A.; Castillo, E.; González-Álvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Bolás-Fernández, F.; Borrás, J.; González-Rosende, M. E., *In vivo* and *in vitro* anti-leishmanial activities of 4-nitro-*N*-pyrimidin- and *N*-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and *N*²-(4-nitrophenyl)-*N*¹-propylglycinamide. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17* (21), 7449-7456.
3. Acero-Alarcón, A.; Armero-Alarte, T.; Jorda-Gregori, J. M.; Rojas-Argudo, C.; Zaballos-García, E.; Server-Carrió, J.; Ahjyaje, F. Z.; Sepúlveda-Arqués, J., Unusual ring closure reaction of amides with pyrimidines: Novel stereoselective synthesis of hexahydroimidazo[1,2-*c*]pyrimidines. *Synthesis* **1999**, (12), 2124-2130.
4. Dailey, B. P., High-resolution nuclear magnetic resonance (Pople, J. A.; Schneider, W. G.; Bernstein, H. J.). *J Chem Educ* **1960**, *37* (5), A322.
5. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L., Spectrometric identification of organic compounds. 7th edition, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, **2005**.
6. Morales, F.; Campos, J. M.; Conejo-García, A., ¹H and ¹³C NMR spectral data of p-nitrobenzenesulfonamides and dansylsulfonamides derived from *N*-alkylated o-(purinemethyl)anilines. *Magn Reson Chem* **2016**, *54* (9), 760-770.
7. Pinto, D.; Santos, C. M.; Silva, A. M., Advanced NMR techniques for structural characterization of heterocyclic structures. In Pinho e Melo TMVD (Ed.), Recent research developments in heterocyclic chemistry, Research Signpost, Trivandrum **2007**, 397-475.
8. Suntioinen, S.; Laatikainen, R.; Král, V., ¹H-¹H and ¹H-¹⁹F coupling constants of some styrene, benzaldehyde and benzylidene amine derivatives. *Magn Reson Chem* **1994**, *32* (1), 51-54.
9. Guo, W.; Wong, T. C., Study of ¹³C-¹⁹F and ¹H-¹⁹F couplings in some fluorinated aromatic compounds using two-dimensional ¹³C-¹H chemical shift correlation spectroscopy with proton homonuclear decoupling. *Magn Reson Chem* **1986**, *24* (1), 75-79.
10. Lopez, C.; Claramunt, R. M.; Trofimenko, S.; Elguero, J., A ¹³C NMR spectroscopy study of the structure of N-H pyrazoles and indazoles. *Can. J. Chem.* **1993**, *71* (5), 678-684.
11. Obasi, L.; Oruma, U.; Al-Swaidan, I.; Ramasami, P.; Ezeorah, C.; Ochonogor, A., Synthesis, Characterization and Antibacterial Studies of *N*-(Benzothiazol-2-yl)-4-chlorobenzenesulphonamide and Its Neodymium(III) and Thallium(III) Complexes. *Molecules* **2017**, *22* (2), 153.
12. Almutairi, M. S.; Xavier, S.; Sathish, M.; Ghabbour, H. A.; Sebastian, S.; Periandy, S.; Al-Wabli, R. I.; Attia, M. I., Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV, ¹H and ¹³C NMR) profiling and computational studies on methyl 5-methoxy-1H-indole-2-carboxylate: A potential precursor to biologically active molecules. *J Mol Struct* **2017**, *1133*, 199-210.
13. Black, P.; Heffernan, M., The analysis of the proton magnetic resonance spectra of heteroaromatic systems. IV. Benzofuran, indole, and related compounds. *Aust J Chem* **1965**, *18* (3), 353-361.
14. Berger, S.; Diehl, B. W. K., ¹³C and ¹H NMR chemical shifts of 2-substituted anthracenes. *Magn Reson Chem* **1989**, *27* (2), 201-203.
15. Spitteller, P.; Spitteller, M.; Jovanovic, J., NMR analysis of 6-(2',3'-dihydro-1'*H*-inden-1'-yl)-1*H*-indene. *Magn Reson Chem* **2002**, *40* (5), 371-376.
16. Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, A., Piperidine: Structure, preparation, reactivity, and synthetic applications of piperidine and its derivatives. *Studies in Organic Chemistry 43*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam – Oxford – New York -Tokyo, **1991**.

17. Keller, T. H.; Pichota, A.; Yin, Z., A practical view of 'druggability'. *Curr Opin Chem Biol* **2006**, *10* (4), 357-361.
18. (a) Nwaka, S.; Ramirez, B.; Brun, R.; Maes, L.; Douglas, F.; Ridley, R., Advancing drug innovation for neglected diseases-criteria for lead progression. *PLoS Negl Trop Dis* **2009**, *3* (8), e440; (b) Katsuno, K.; Burrows, J. N.; Duncan, K.; van Huijsduijnen, R. H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C. E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B. T., Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14* (11), 751-758.
19. Supuran, C. T.; Innocenti, A.; Mastrolorenzo, A.; Scozzafava, A., Antiviral sulfonamide derivatives. *Mini Rev Med Chem* **2004**, *4* (2), 189-200.
20. Ameen, M., Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. *Expert Opin Pharmacother* **2010**, *11* (4), 557-569.
21. Bilbao-Ramos, P.; Sifontes-Rodríguez, S.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernandez, F., A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular *Leishmania* amastigotes. *J Microbiol Methods* **2012**, *89* (1), 8-11.
22. Berman, J., Miltefosine, an FDA-approved drug for the 'orphan disease', leishmaniasis. *Expert Opin Orphan Drugs* **2015**, *3* (6), 727-735.
23. Vega, C.; Rolón, M.; Martínez-Fernández, A. R.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A., A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. *Parasitol Res* **2005**, *95* (4), 296-298.
24. (a) Almeida, R. P.; Barral-Netto, M.; De Jesus, A. M.; De Freitas, L. A.; Carvalho, E. M.; Barral, A., Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg* **1996**, *54* (2), 178-184; (b) de Oliveira Cardoso, F.; da Silva Freitas de Souza, C.; Gonçalves Mendes, V.; Abreu-Silva, A. L.; da Costa, S. C. G.; da Silva Calabrese, K., Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *J Infect Dis* **2010**, *201* (12), 1933-1940.
25. Magill, A. J.; Groggl, M.; Gasser, R. A., Jr.; Sun, W.; Oster, C. N., Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *N Engl J Med* **1993**, *328* (19), 1383-1387.
26. Siriwardana, H. V. Y. D.; Noyes, H. A.; Beeching, N. J.; Chance, M. L.; Karunaweera, N. D.; Bates, P. A., *Leishmania donovani* and cutaneous leishmaniasis, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis* **2007**, *13* (3), 476-478.
27. (a) Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). Target Product Profile for Visceral Leishmaniasis. <http://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/tpp-vl/>, (último acceso diciembre 2016); (b) Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). Target Product Profile for Cutaneous Leishmaniasis. <http://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/tpp-cl/>, (último acceso diciembre 2016).
28. (a) Adai, V.; Schnorbusch, K.; Zimic, M.; Gutierrez, A.; Decuyper, S.; Vanaerschot, M.; S, D. E. D.; Maes, I.; Llanos-Cuentas, A.; Chappuis, F.; Arevalo, J.; Dujardin, J. C., Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different *in vitro* susceptibility to pentavalent antimony. *Parasitology* **2011**, *138* (2), 183-193; (b) Coelho, A. C.; Trinconi, C. T.; Costa, C. H.; Uliana, S. R., *In vitro* and *in vivo* miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* **2014**, *8* (7), e2999; (c) Allen, S.; Neal, R. A., The *in vitro* susceptibility of macrophages infected with amastigotes of *Leishmania* spp. to pentavalent antimonial drugs and other compounds with special relevance to cutaneous isolates. In *Leishmaniasis: The current status and new strategies for control*, Hart, D. T., Ed. Springer US. Boston, MA, **1989**, pp 711-720.
29. Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H., Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **2006**, *19* (1), 111-126.
30. Basselin, M.; Denise, H.; Coombs, G. H.; Barrett, M. P., Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, *46* (12), 3731-3738.
31. Bhandari, V.; Kulshrestha, A.; Deep, D. K.; Stark, O.; Prajapati, V. K.; Ramesh, V.; Sundar, S.; Schonian, G.; Dujardin, J. C.; Salotra, P., Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment

- in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. *Plos Neglect Trop D* **2012**, *6* (5), e1657.
32. Beach, D. H.; Goad, L. J.; Holz, G. G., Jr., Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **1988**, *31* (2), 149-162.
 33. Avila, J. L.; Casanova, M. A., Comparative effects of 4-aminopyrazolopyrimidine, its 2'-deoxyriboside derivative, and allopurinol on *in vitro* growth of american *Leishmania* species. *Antimicrob Agents Chemother* **1982**, *22* (3), 380-385.
 34. Croft, S. L.; Yardley, V.; Kendrick, H., Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2002**, *96 Suppl 1*, S127-129.
 35. (a) Wyllie, S.; Patterson, S.; Stojanovski, L.; Simeons, F. R.; Norval, S.; Kime, R.; Read, K. D.; Fairlamb, A. H., The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci Transl Med* **2012**, *4* (119), 119re1; (b) Bahia, M. T.; de Andrade, I. M.; Martins, T. A. F.; do Nascimento, Á. F. d. S.; Diniz, L. d. F.; Caldas, I. S.; Talvani, A.; Trunz, B. B.; Torreele, E.; Ribeiro, I., Fexinidazole: A potential new drug candidate for Chagas disease. *Plos Neglect Trop D* **2012**, *6* (11), e1870.
 36. (a) Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Wilkinson, S. R.; Kaiser, M., Novel nitro(triazole/imidazole)-based heteroarylamides/sulfonamides as potential antitrypanosomal agents. *Eur J Med Chem* **2014**, *87*, 79-88; (b) Müller, J.; Rout, S.; Leitsch, D.; Vaithilingam, J.; Hehl, A.; Müller, N., Comparative characterisation of two nitroreductases from *Giardia lamblia* as potential activators of nitro compounds. *Int J Parasitol* **2015**, *5* (2), 37-43.
 37. Spain, J. C., Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* **1995**, *49*, 523-55.
 38. Patterson, S.; Wyllie, S., Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol* **2014**, *30* (6), 289-298.
 39. Boiani, M.; Piacenza, L.; Hernández, P.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; González, M.; Denicola, A., Mode of action of nifurtimox and *N*-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? *Biochem Pharmacol* **2010**, *79* (12), 1736-1745.
 40. (a) Walsh, J. S.; Miwa, G. T., Bioactivation of drugs: risk and drug design. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2011**, *51*, 145-167; (b) Brenk, R.; Schipani, A.; James, D.; Krasowski, A.; Gilbert, I. H.; Frearson, J.; Wyatt, P. G., Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases. *ChemMedChem* **2008**, *3* (3), 435-444.
 41. Hall, B. S.; Bot, C.; Wilkinson, S. R., Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem* **2011**, *286* (15), 13088-13095.
 42. (a) Machado-Silva, A.; Cerqueira, P. G.; Grazielle-Silva, V.; Gadelha, F. R.; Peloso Ede, F.; Teixeira, S. M.; Machado, C. R., How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutat Res Rev Mutat Res* **2016**, *767*, 8-22; (b) Peloso, E. F.; Dias, L.; Queiroz, R. M.; Leme, A. F.; Pereira, C. N.; Carnielli, C. M.; Werneck, C. C.; Sousa, M. V.; Ricart, C. A.; Gadelha, F. R., *Trypanosoma cruzi* mitochondrial trypanodioxin peroxidase is located throughout the cell and its pull down provides one step towards the understanding of its mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1864* (1), 1-10; (c) Castro, H.; Tomas, A. M., Peroxidases of trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal* **2008**, *10* (9), 1593-1606.
 43. (a) Vree, T. B.; Hekster, Y. A., Clinical pharmacokinetics of sulfonamides and their metabolites: an encyclopedia. *Antibiot Chemother (1971)* **1987**, *37*, 1-214; (b) Solensky, R., Drug desensitization. *Immunol Allergy Clin North Am* **2004**, *24* (3), 425-443.
 44. Seydel, J. K., Mode of action and quantitative structure-activity relationship of sulfonamides in biological systems of different complexity (enzymes, bacteria, rat, and human). *Int J Quantum Chem* **1981**, *20* (1), 131-150.
 45. Siqueira-Neto, J. L.; Song, O. R.; Oh, H.; Sohn, J. H.; Yang, G.; Nam, J.; Jang, J.; Cechetto, J.; Lee, C. B.; Moon, S.; Genovesio, A.; Chatelain, E.; Christophe, T.; Freitas-Junior, L. H., Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. *PLoS Negl Trop Dis* **2010**, *4* (5), e675.
 46. Malkia, A.; Murtomaki, L.; Urtti, A.; Kontturi, K., Drug permeation in biomembranes: *in vitro* and *in silico* prediction and influence of physicochemical properties. *Eur J Pharm Sci* **2004**, *23* (1), 13-47.

47. (a) Reguera, R. M.; Calvo-Álvarez, E.; Álvarez-Velilla, R.; Balaña-Fouce, R., Target-based vs. phenotypic screenings in *Leishmania* drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2014**, *4* (3), 355-357; (b) Vermeersch, M.; da Luz, R. I.; Toté, K.; Timmermans, J.-P.; Cos, P.; Maes, L., *In vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: Practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**, *53* (9), 3855-3859; (c) Wert, L.; Alakurtti, S.; Corral, M. J.; Sánchez-Fortun, S.; Yli-Kauhaluoma, J.; Alunda, J. M., Toxicity of betulin derivatives and *in vitro* effect on promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* and *L. donovani*. *J Antibiot* **2011**, *64* (7), 475-481; (d) Mookerjee Basu, J.; Mookerjee, A.; Banerjee, R.; Saha, M.; Singh, S.; Naskar, K.; Tripathy, G.; Sinha, P. K.; Pandey, K.; Sundar, S.; Bimal, S.; Das, P. K.; Choudhuri, S. K.; Roy, S., Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, *52* (3), 1080-1093.
48. Zangger, H.; Mottram, J. C.; Fasel, N., Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* **2002**, *9* (10), 1126-1139.
49. Croft, S. L.; Brazil, R. P., Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* *in vitro*. *Ann Trop Med Parasitol* **1982**, *76* (1), 37-43.
50. Muelas-Serrano, S.; Pérez-Serrano, J.; Gómez-Barrio, A.; Aran, V. J.; Rodríguez-Caabeiro, F., Ultrastructural alterations induced by nifurtimox and another nitro derivative on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* **2002**, *88* (2), 97-101.
51. Yang, W., Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q Rev Biophys* **2011**, *44* (1), 1-93.
52. Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U., Artificial metallonucleases. *Chem Commun* **2005**, (20), 2540-2548.
53. Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J., Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: Quantitative dissection of the role of metal ions. *Acc Chem Res* **1999**, *32* (6), 485-493.
54. (a) García-Giménez, J. L.; González-Álvarez, M.; Liu-González, M.; Macías, B.; Borrás, J.; Alzuet, G., Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with *N*-(9*H*-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of p53 and Bcl-2 proteins in the apoptotic mechanism. *J Inorg Biochem* **2009**, *103* (6), 923-934; (b) González-Álvarez, M.; Pascual-Álvarez, A.; del Castillo Agudo, L.; Castineiras, A.; Liu-González, M.; Borrás, J.; Alzuet-Pina, G., Mixed-ligand copper(ii)-sulfonamide complexes: effect of the sulfonamide derivative on DNA binding, DNA cleavage, genotoxicity and anticancer activity. *Dalton Trans* **2013**, *42* (28), 10244-10259; (c) Hangan, A. C.; Turza, A.; Stan, R. L.; Sevestre, B.; Páll, E.; Cetean, S.; Oprean, L. S., Synthesis, crystal structure and characterization of new biologically active Cu(II) complexes with ligand derived from *N*-substituted sulfonamide. *J Chem Sci* **2016**, *128* (5), 815-824.
55. (a) Seng, H.-L.; Ong, H.-K. A.; Rahman, R. N. Z. R. A.; Yamin, B. M.; Tiekink, E. R. T.; Tan, K. W.; Maah, M. J.; Caracelli, I.; Ng, C. H., Factors affecting nucleolytic efficiency of some ternary metal complexes with DNA binding and recognition domains. Crystal and molecular structure of Zn(phen)(edda). *J Inorg Biochem* **2008**, *102* (11), 1997-2011; (b) Macías, B.; Villa, M. V.; García, I.; Castiñeiras, A.; Borrás, J.; Cejudo-Marin, R., Copper complexes with sulfonamides: crystal structure and interaction with pUC18 plasmid and hydrogen peroxide. *Inorg Chim Acta* **2003**, *342*, 241-246.
56. (a) Macías, B.; García, I.; Villa, M. a. V.; Borrás, J. n.; González-Álvarez, M.; Castiñeiras, A., Structural characterisation and nuclease activity of mixed copper(II) complexes with sulfonamides and bipyridil. *Inorg Chim Acta* **2003**, *353*, 139-144; (b) González-Álvarez, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; del Castillo-Agudo, L.; Montejo-Bernardo, J. M.; Gutiérrez-Rodríguez, A.; García-Granda, S., Evaluation of antiproliferative activities and apoptosis induction caused by copper(II)-benzothiazolesulfonamide complexes in Jurkat T lymphocytes and Caco-2 cells. *J Biol Inorg Chem* **2008**, *13* (8), 1249-1265.
57. (a) Neyens, E.; Baeyens, J., A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J Hazard Mater* **2003**, *98* (1-3), 33-50; (b) Kehrer, J. P., The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **2000**, *149* (1), 43-50.

58. (a) Gallagher, J.; Chen, C. H.; Pan, C. Q.; Perrin, D. M.; Cho, Y. M.; Sigman, D. S., Optimizing the targeted chemical nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper by ligand modification. *Bioconjug Chem* **1996**, *7* (4), 413-420; (b) Kellett, A.; Howe, O.; O'Connor, M.; McCann, M.; Creaven, B. S.; McClean, S.; Foltyn-Arfa Kia, A.; Casey, A.; Devereux, M., Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. *Free Radic Biol Med* **2012**, *53* (3), 564-576.
59. Pogożelski, W. K.; Tullius, T. D., Oxidative strand scission of nucleic acids: Routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. *Chem Rev* **1998**, *98* (3), 1089-1108.
60. Jiang, Q.; Xiao, N.; Shi, P.; Zhu, Y.; Guo, Z., Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. *Coord Chem Rev* **2007**, *251* (15-16), 1951-1972.
61. Li, L.; Murthy, N. N.; Telsler, J.; Zakharov, L. N.; Yap, G. P.; Rheingold, A. L.; Karlin, K. D.; Rokita, S. E., Targeted guanine oxidation by a dinuclear copper(II) complex at single stranded/double stranded DNA junctions. *Inorg Chem* **2006**, *45* (18), 7144-7159.
62. Meyers, J. A.; Sánchez, D.; Elwell, L. P.; Falkow, S., Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **1976**, *127* (3), 1529-1537.
63. Sigman, D. S.; Landgraf, R.; Perrin, D. M.; Pearson, L., Nucleic acid chemistry of the cuprous complexes of 1,10-phenanthroline and derivatives. *Met Ions Biol Syst* **1996**, *33*, 485-513.
64. (a) Frey, S. T.; Sun, H. H. J.; Murthy, N. N.; Karlin, K. D., A new trinuclear copper complex and its reactions with plasmid DNA. *Inorg Chim Acta* **1996**, *242* (1), 329-338; (b) González-Álvarez, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; Pitie, M.; Meunier, B., DNA cleavage studies of mononuclear and dinuclear copper(II) complexes with benzothiazolesulfonamide ligands. *J Biol Inorg Chem* **2003**, *8* (6), 644-652.
65. Nakamoto, K.; Tsuboi, M.; Strahan, G. D., Groove-Binding Drugs. In *Drug-DNA Interactions*, John Wiley & Sons, Inc., **2008**; pp 209-244.
66. Lutsenko, S., Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr Opin Chem Biol* **2010**, *14* (2), 211-217.
67. Stafford, S. L.; Bokil, N. J.; Achard, M. E.; Kapetanovic, R.; Schembri, M. A.; McEwan, A. G.; Sweet, M. J., Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep* **2013**, *33* (4), 541-554.
68. (a) Kim, H. W.; Chan, Q.; Afton, S. E.; Caruso, J. A.; Lai, B.; Weintraub, N. L.; Qin, Z., Human macrophage ATP7A is localized in the trans-Golgi apparatus, controls intracellular copper levels, and mediates macrophage responses to dermal wounds. *Inflammation* **2012**, *35* (1), 167-175; (b) Kim, B. E.; Nevitt, T.; Thiele, D. J., Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* **2008**, *4* (3), 176-185.
69. Hood, M. I.; Skaar, E. P., Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* **2012**, *10* (8), 525-537.
70. (a) Manning, T.; Mikula, R.; Lee, H.; Calvin, A.; Darrach, J.; Wylie, G.; Phillips, D.; Bythell, B. J., The copper (II) ion as a carrier for the antibiotic capreomycin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, *24* (3), 976-982; (b) Haeili, M.; Moore, C.; Davis, C. J. C.; Cochran, J. B.; Shah, S.; Shrestha, T. B.; Zhang, Y.; Bossmann, S. H.; Benjamin, W. H.; Kutsch, O.; Wolschendorf, F., Copper Complexation Screen Reveals Compounds with Potent Antibiotic Properties against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**, *58* (7), 3727-3736.
71. Turner, P. V.; Brabb, T.; Pekow, C.; Vasbinder, M. A., Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **2011**, *50* (5), 600-613.
72. Mondal, S. K.; Mondal, N. B.; Banerjee, S.; Mazumder, U. K., Determination of drug-like properties of a novel antileishmanial compound: *In vitro* absorption, distribution, metabolism, and excretion studies. *Indian J Pharmacol* **2009**, *41* (4), 176-181.
73. Heald, R.; Nogales, E., Microtubule dynamics. *J Cell Sci* **2002**, *115* (1), 3-4.
74. Kuppens, I. E., Current state of the art of new tubulin inhibitors in the clinic. *Curr Clin Pharmacol* **2006**, *1* (1), 57-70.

75. (a) Schneider, A.; Sherwin, T.; Sasse, R.; Russell, D. G.; Gull, K.; Seebeck, T., Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei brucei* contain the same alpha-tubulin isoforms. *J Cell Biol* **1987**, *104* (3), 431-438; (b) Perdomo, D.; Bonhivers, M.; Robinson, D. R., The trypanosome flagellar pocket collar and its ring forming protein-TbBILBO1. *Cells* **2016**, *5* (1), E9 (c) Vaughan, S., Assembly of the flagellum and its role in cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* **2010**, *13* (4), 453-458.
76. Werbovetz, K. A., Tubulin as an antiprotozoal drug target. *Mini Rev Med Chem* **2002**, *2* (6), 519-529.
77. (a) Havens, C. G.; Bryant, N.; Asher, L.; Lamoreaux, L.; Perfetto, S.; Brendle, J. J.; Werbovetz, K. A., Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **2000**, *110* (2), 223-236; (b) Dantas, A. P.; Barbosa, H. S.; De Castro, S. L., Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol* **2003**, *35* (3), 287-294.
78. (a) Werbovetz, K. A.; Brendle, J. J.; Sackett, D. L., Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **1999**, *98* (1), 53-65; (b) Luis, L.; Serrano, M. L.; Hidalgo, M.; Mendoza-León, A., Comparative analyses of the β -tubulin gene and molecular modeling reveal molecular insight into the colchicine resistance in kinetoplastids organisms. *Biomed Res Int* **2013**, *2013*, 843748; (c) Peacock, C. S.; Seeger, K.; Harris, D.; Murphy, L.; Ruiz, J. C.; Quail, M. A.; Peters, N.; Adlem, E.; Tivey, A.; Aslett, M.; Kerhornou, A.; Ivens, A.; Fraser, A.; Rajandream, M. A.; Carver, T.; Norbertczak, H.; Chillingworth, T.; Hance, Z.; Jagels, K.; Moule, S.; Ormond, D.; Rutter, S.; Squares, R.; Whitehead, S.; Rabinowitsch, E.; Arrowsmith, C.; White, B.; Thurston, S.; Bringaud, F.; Baldauf, S. L.; Faulconbridge, A.; Jeffares, D.; Depledge, D. P.; Oyola, S. O.; Hilley, J. D.; Brito, L. O.; Tosi, L. R.; Barrell, B.; Cruz, A. K.; Mottram, J. C.; Smith, D. F.; Berriman, M., Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* **2007**, *39* (7), 839-847.
79. Nanavaty, V.; Lama, R.; Sandhu, R.; Zhong, B.; Kulman, D.; Bobba, V.; Zhao, A.; Li, B.; Su, B., Orally active and selective tubulin inhibitors as anti-trypanosome agents. *PLoS One* **2016**, *11* (1), e0146289.
80. Morgan, R. E.; Werbovetz, K. A., Selective lead compounds against kinetoplastid tubulin. In *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*, Majumder, H. K., Ed. Springer New York, New York, 2008; pp 33-47.
81. Lacomble, S.; Vaughan, S.; Gadelha, C.; Morphew, M. K.; Shaw, M. K.; McIntosh, J. R.; Gull, K., Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. *J Cell Sci* **2009**, *122* (8), 1081-1090.
82. Luis, L.; Serrano, M. L.; Hidalgo, M.; Mendoza-León, A., Comparative analyses of the beta-tubulin gene and molecular modeling reveal molecular insight into the colchicine resistance in kinetoplastids organisms. *Biomed Res Int* **2013**, *2013*, 843748.
83. (a) Fong, D., Effect of the anti-microtubule compound tubulozole on *Leishmania* protozoan parasites *in vitro*. *FEMS Microbiol Lett* **1993**, *107* (1), 95-99; (b) Chan, M. M.; Triemer, R. E.; Fong, D., Effect of the anti-microtubule drug oryzalin on growth and differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. *Differentiation* **1991**, *46* (1), 15-21.
84. Scott, D. E.; Coyne, A. G.; Hudson, S. A.; Abell, C., Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology. *Biochemistry* **2012**, *51* (25), 4990-5003.
85. Aldeghi, M.; Malhotra, S.; Selwood, D. L.; Chan, A. W. E., Two- and three-dimensional rings in drugs. *Chem Biol Drug Des* **2014**, *83* (4), 450-461.
86. Ishikawa, M.; Hashimoto, Y., Improvement in aqueous solubility in small molecule drug discovery programs by disruption of molecular planarity and symmetry. *J Med Chem* **2011**, *54* (6), 1539-1554.
87. (a) Bringmann, G.; Brun, R.; Kaiser, M.; Neumann, S., Synthesis and antiprotozoal activities of simplified analogs of naphthylisoquinoline alkaloids. *Eur J Med Chem* **2008**, *43* (1), 32-42; (b) Bringmann, G.; Zhang, G.; Olschläger, T.; Stich, A.; Wu, J.; Chatterjee, M.; Brun, R., Highly selective antiplasmodial naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*. *Phytochemistry* **2013**, *91*, 220-228; (c) Ibrahim, S. R.; Mohamed, G. A., Naphthylisoquinoline alkaloids potential drug leads. *Fitoterapia* **2015**, *106*, 194-225.
88. Mondal, S. K.; Mondal, N. B.; Banerjee, S.; Mazumder, U. K., Determination of drug-like properties of a novel antileishmanial compound: *In vitro* absorption, distribution, metabolism, and excretion studies. *Indian J Pharmacol* **2009**, *41* (4), 176-181.

89. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *46* (1-3), 3-26.
90. Pagliero, R. J.; Lusvardi, S.; Pierini, A. B.; Brun, R.; Mazzieri, M. R., Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorg Med Chem* **2010**, *18* (1), 142-150.
91. Williams, J. A.; Hyland, R.; Jones, B. C.; Smith, D. A.; Hurst, S.; Goosen, T. C.; Peterkin, V.; Koup, J. R.; Ball, S. E., Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* **2004**, *32* (11), 1201-1208.
92. Shah, S. S.; Rivera, G.; Ashfaq, M., Recent advances in medicinal chemistry of sulfonamides. Rational design as anti-tumoral, anti-bacterial and anti-inflammatory agents. *Mini Rev Med Chem* **2013**, *13* (1), 70-86.
93. Dorosti, Z.; Yousefi, M.; Sharafi, S. M.; Darani, H. Y., Mutual action of anticancer and antiparasitic drugs: are there any shared targets? *Future Oncol* **2014**, *10* (15), 2529-2539.
94. Sharma, S. V.; Haber, D. A.; Settleman, J., Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10* (4), 241-253.
95. (a) Shoemaker, R. H., The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6* (10), 813-823; (b) Yamori, T., Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother Pharmacol* **2003**, *52* Suppl 1, S74-S9.
96. Jaeger, S.; Duran-Frigola, M.; Aloy, P., Drug sensitivity in cancer cell lines is not tissue-specific. *Mol Cancer* **2015**, *14*, 40.
97. Sebaugh, J. L., Guidelines for accurate EC₅₀/IC₅₀ estimation. *Pharm Stat* **2011**, *10* (2), 128-134.
98. Bähr, O.; Rieger, J.; Duffner, F.; Meyermann, R.; Weller, M.; Wick, W., P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein mediate specific patterns of multidrug resistance in malignant glioma cell lines, but not in primary glioma cells. *Brain Pathol* **2003**, *13* (4), 482-494.
99. Chen, F.; Wang, W.; El-Deiry, W. S., Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem Pharmacol* **2010**, *80* (5), 724-730.
100. Krishan, A., Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* **1975**, *66* (1), 188-193.
101. Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O.; et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92* (20), 9363-9367.
102. Koopman, G.; Reutelingsperger, C. P.; Kuijten, G. A.; Keehnen, R. M.; Pals, S. T.; van Oers, M. H., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **1994**, *84* (5), 1415-1420.
103. Bossy-Wetzell, E.; Green, D. R., Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods Enzymol* **2000**, *322*, 15-18.
104. Krysko, D. V.; Berghe, T. V.; Parthoens, E.; D'Herde, K.; Vandenabeele, P., Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. *Methods Enzymol* **2008**, *442*, 307-341.
105. Yamada, H. Y.; Gorbsky, G. J., Spindle checkpoint function and cellular sensitivity to antimetabolic drugs. *Mol Cancer Ther* **2006**, *5* (12), 2963-2969.
106. Rodier, F.; Campisi, J., Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **2011**, *192* (4), 547-556.
107. (a) Lukas, J.; Lukas, C.; Bartek, J., Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **2004**, *3* (8-9), 997-1007; (b) Bartek, J.; Lukas, J., DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* **2007**, *19* (2), 238-245.
108. Sharma, A.; Singh, K.; Almasan, A., Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol* **2012**, *920*, 613-626.
109. Ivashkevich, A.; Redon, C. E.; Nakamura, A. J.; Martin, R. F.; Martin, O. A., Use of the γ -H2AX assay to monitor dna damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett* **2012**, *327* (1-2), 123-133.

110. Franken, N. A. P.; Rodermond, H. M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C., Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc* **2006**, *1* (5), 2315-2319.
111. Guédin, A.; Lacroix, L.; Mergny, J. L., Thermal melting studies of ligand DNA interactions. *Methods Mol Biol* **2010**, *613*, 25-35.
112. Thordarson, P., Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (3), 1305-1323.
113. Tse, W. C.; Boger, D. L., A Fluorescent intercalator displacement assay for establishing DNA binding selectivity and affinity. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **2004**, *37* (1), 61-69.
114. Morgan, A. R.; Evans, D. H.; Lee, J. S.; Pulleyblank, D. E., Review: ethidium fluorescence assay. Part II. Enzymatic studies and DNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res* **1979**, *7* (3), 571-594.
115. Ivanov, V. I.; Minchenkova, L. E.; Schyolkina, A. K.; Poletayev, A. I., Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism. *Biopolymers* **1973**, *12* (1), 89-110.
116. Berova, N.; Di Bari, L.; Pescitelli, G., Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. *Chem Soc Rev* **2007**, *36* (6), 914-931.
117. Pospelova, T. V.; Demidenko, Z. N.; Bukreeva, E. I.; Pospelov, V. A.; Gudkov, A. V.; Blagosklonny, M. V., Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell cycle* **2009**, *8* (24), 4112-4118.
118. Turinetti, V.; Giachino, C., Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43* (5), 2489-2498.
119. (a) Li, Q.; Sham, H.; Woods, K. W.; Steiner, B. A.; Stephen, L. G. I. I.; Barr, K. J.; Imade, H. M.; Rosenberg, S., Cell proliferation inhibitors. US6521658 B1, **2003**, 20030218; (b) Mohan, R.; Banerjee, M.; Ray, A.; Manna, T.; Wilson, L.; Owa, T.; Bhattacharyya, B.; Panda, D., Antimitotic sulfonamides inhibit microtubule assembly dynamics and cancer cell proliferation. *Biochemistry* **2006**, *45* (17), 5440-5449.
120. Nakayama, Y.; Uno, N.; Uno, K.; Mizoguchi, Y.; Komoto, S.; Kazuki, Y.; Nanba, E.; Inoue, T.; Oshimura, M., Recurrent micronucleation through cell cycle progression in the presence of microtubule inhibitors. *Cell Struct Funct* **2015**, *40* (1), 51-59.
121. Gascoigne, K. E.; Taylor, S. S., How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci* **2009**, *122* (15), 2579-2585.
122. Shelanski, M. L.; Gaskin, F.; Cantor, C. R., Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1973**, *70* (3), 765-768.
123. Lee, J. C.; Timasheff, S. N., The reconstitution of microtubules from purified calf brain tubulin. *Biochemistry* **1975**, *14* (23), 5183-5187.
124. (a) Long, B. H.; Carboni, J. M.; Wasserman, A. J.; Cornell, L. A.; Casazza, A. M.; Jensen, P. R.; Lindel, T.; Fenical, W.; Fairchild, C. R., Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to Paclitaxel (Taxol®). *Cancer Res* **1998**, *58* (6), 1111-1115; (b) Vasquez, R. J.; Howell, B.; Yvon, A. M.; Wadsworth, P.; Cassimeris, L., Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability *in vivo* and *in vitro*. *Mol Biol Cell* **1997**, *8* (6), 973-985.
125. Prencipe, M.; Fitzpatrick, P.; Gorman, S.; Tosetto, M.; Klinger, R.; Furlong, F.; Harrison, M.; O'Connor, D.; Roninson, I. B.; O'Sullivan, J.; McCann, A., Cellular senescence induced by aberrant MAD2 levels impacts on paclitaxel responsiveness *in vitro*. *Br J Cancer* **2009**, *101* (11), 1900-1908.
126. Klein, L. E.; Freeze, B. S.; Smith, A. B., 3rd; Horwitz, S. B., The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence. *Cell Cycle* **2005**, *4* (3), 501-507.
127. (a) Groth-Pedersen, L.; Ostenfeld, M. S.; Høyer-Hansen, M.; Nylandsted, J.; Jäättelä, M., Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. *Cancer Res* **2007**, *67* (5), 2217-2225; (b) Duan, L.; Sterba, K.; Kolomeichuk, S.; Kim, H.; Brown, P. H.; Chambers, T. C., Inducible overexpression of c-Jun in MCF7 cells causes resistance to vinblastine via inhibition of drug-induced apoptosis and senescence at a step subsequent to mitotic arrest. *Biochem Pharmacol* **2007**, *73* (4), 481-490.
128. Rouan, S. K.; Otterness, I. G.; Cunningham, A. C.; Holden, H. E.; Rhodes, C. T., Reversal of colchicine-induced mitotic arrest in Chinese hamster cells with a colchicine-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* **1990**, *137* (4), 779-787.

129. Thomas, N. E.; Thamkachy, R.; Sivakumar, K. C.; Sreedevi, K. J.; Louis, X. L.; Thomas, S. A.; Kumar, R.; Rajasekharan, K. N.; Cassimeris, L.; Sengupta, S., Reversible action of diaminothiazoles in cancer cells is implicated by the induction of a fast conformational change of tubulin and suppression of microtubule dynamics. *Mol Cancer Ther* **2014**, *13* (1), 179-189.
130. Fox, E.; Maris, J. M.; Widemann, B. C.; Meek, K.; Goodwin, A.; Goodspeed, W.; Kromplewski, M.; Fouts, M. E.; Medina, D.; Cho, S. Y.; Cohn, S. L.; Krivoshik, A.; Hagey, A. E.; Adamson, P. C.; Balis, F. M., A phase 1 study of ABT-751, an orally bioavailable tubulin inhibitor, administered daily for 7 days every 21 days in pediatric patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* **2006**, *12* (16), 4882-4887.
131. (a) Krejci, P.; Prochazkova, J.; Smutny, J.; Chlebova, K.; Lin, P.; Aklian, A.; Bryja, V.; Kozubik, A.; Wilcox, W. R., FGFR3 signaling induces a reversible senescence phenotype in chondrocytes similar to oncogene-induced premature senescence. *Bone* **2010**, *47* (1), 102-110; (b) Mouton, R. E.; Venable, M. E., Ceramide induces expression of the senescence histochemical marker, β -galactosidase, in human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* **2000**, *113* (3), 169-181.
132. Akhmanova, A.; Stehbens, S. J.; Yap, A. S., Touch, grasp, deliver and control: functional cross-talk between microtubules and cell adhesions. *Traffic* **2009**, *10* (3), 268-274.
133. Etienne-Manneville, S., Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2013**, *29*, 471-499.
134. Liao, G.; Nagasaki, T.; Gundersen, G. G., Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci* **1995**, *108* (Pt 11), 3473-3483.
135. Liang, C.-C.; Park, A. Y.; Guan, J.-L., *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc* **2007**, *2* (2), 329-333.
136. Lu, Y.; Chen, J.; Xiao, M.; Li, W.; Miller, D. D., An Overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm Res* **2012**, *29* (11), 2943-2971.
137. Dorléans, A.; Gigant, B.; Ravelli, R. B.; Mailliet, P.; Mikol, V.; Knossow, M., Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106* (33), 13775-13779.
138. (a) Patil, S. A.; Patil, R.; Miller, D. D., Indole molecules as inhibitors of tubulin polymerization: potential new anticancer agents. *Future Med Chem* **2012**, *4* (16), 2085-2115; (b) Brancale, A.; Silvestri, R., Indole, a core nucleus for potent inhibitors of tubulin polymerization. *Med Res Rev* **2007**, *27* (2), 209-238.
139. Yoshino, H.; Ueda, N.; Nijima, J.; Sugumi, H.; Kotake, Y.; Koyanagi, N.; Yoshimatsu, K.; Asada, M.; Watanabe, T., Novel sulfonamides as potential, systemically active antitumor agents. *J Med Chem* **1992**, *35* (13), 2496-2497.
140. (a) Owa, T.; Okauchi, T.; Yoshimatsu, K.; Sugi, N. H.; Ozawa, Y.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Okabe, T.; Kitoh, K.; Yoshino, H., A focused compound library of novel *N*-(7-indolyl)benzenesulfonamides for the discovery of potent cell cycle inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, *10* (11), 1223-1226; (b) Owa, T.; Yoshino, H.; Okauchi, T.; Okabe, T.; Ozawa, Y.; Hata Sugi, N.; Yoshimatsu, K.; Nagasu, T.; Koyanagi, N.; Kitoh, K., Synthesis and biological evaluation of *N*-(7-indolyl)-3-pyridinesulfonamide derivatives as potent antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12* (16), 2097-2100.
141. Yokoi, A.; Kuromitsu, J.; Kawai, T.; Nagasu, T.; Hata Sugi, N.; Yoshimatsu, K.; Yoshino, H.; Owa, T., Profiling novel sulfonamide antitumor agents with cell-based phenotypic screens and array-based gene expression analysis. *Mol Cancer Ther* **2002**, *1* (4), 275-286.
142. Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliari, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A., Medicinal chemistry of combretastatin A4: Present and future directions. *J Med Chem* **2006**, *49* (11), 3033-3044.
143. Ohsumi, K.; Hatanaka, T.; Fujita, K.; Nakagawa, R.; Fukuda, Y.; Nihei, Y.; Suga, Y.; Morinaga, Y.; Akiyama, Y.; Tsuji, T., Syntheses and antitumor activity of cis-restricted combretastatins: 5-membered heterocyclic analogues. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, *8* (22), 3153-3158.
144. Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; López, J. L.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M., Diarylmethyloxime and hydrazone derivatives with 5-indolyl moieties as potent inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16* (11), 5952-5961.
145. Medina, J. C., Benzenesulfonamides and benzamides as therapeutic agents. *PCT Int. Appl.* US6191170 B1, **1999**, 19990722.

146. Hu, L.; Li, Z.-r.; Li, Y.; Qu, J.; Ling, Y.-H.; Jiang, J.-d.; Boykin, D. W., Synthesis and structure–activity relationships of carbazole sulfonamides as a novel class of antimitotic agents against solid tumors. *J Med Chem* **2006**, *49* (21), 6273-6282.
147. Wang, Y.-M.; Hu, L.-X.; Liu, Z.-M.; You, X.-F.; Zhang, S.-H.; Qu, J.-R.; Li, Z.-R.; Li, Y.; Kong, W.-J.; He, H.-W.; Shao, R.-G.; Zhang, L.-R.; Peng, Z.-G.; Boykin, D. W.; Jiang, J.-D., *N*-(2,6-dimethoxypyridine-3-yl)-9-methylcarbazole-3-sulfonamide as a novel tubulin ligand against human cancer. *Clin Cancer Res* **2008**, *14* (19), 6218-6227.
148. (a) Chen, J.; Dong, X.; Liu, T.; Lou, J.; Jiang, C.; Huang, W.; He, Q.; Yang, B.; Hu, Y., Design, synthesis, and quantitative structure-activity relationship of cytotoxic gamma-carboline derivatives. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17* (9), 3324-3331; (b) Chen, J.; Liu, T.; Wu, R.; Lou, J.; Cao, J.; Dong, X.; Yang, B.; He, Q.; Hu, Y., Design, synthesis, and biological evaluation of novel *N*- γ -carboline arylsulfonamides as anticancer agents. *Bioorg Med Chem* **2010**, *18* (24), 8478-8484.
149. Nguyen, T. L.; McGrath, C.; Hermone, A. R.; Burnett, J. C.; Zaharevitz, D. W.; Day, B. W.; Wipf, P.; Hamel, E.; Gussio, R., A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *J Med Chem* **2005**, *48* (19), 6107-6116.
150. Aucejo, R.; Alarcón, J.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Marchin, K. L.; Soriano, C.; Lodeiro, C.; Bernardo, M. A.; Pina, F.; Pina, J.; de Melo, J., A new Zn-II tweezer pyridine-naphthalene system - An off-on-off system working in a biological pH window. *Eur J Inorg Chem* **2005**, 4301-4308.
151. Wuts, P. G. M.; Greene, T. W., Protection for the amino group. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., **2006**; pp 696-926.
152. Ng, C. Y.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E., New multidentate ligands. 18. Synthesis of 1,4-bis(bis(2-aminoethyl)aminomethyl)benzene: binuclear chelating tendencies and mixed-ligand binuclear chelate formation. *Inorg Chem* **1979**, *18* (11), 2982-2986.
153. Anelli, P. L.; Lunazzi, L.; Montanari, F.; Quici, S., Doubly and triply bridged polyoxapolyazaheterophanes derived from 2,4,6-trichloro-s-triazine. *J. Org. Chem* **1984**, *49* (22), 4197-4203.
154. Pitarch, J.; Clares, M. P.; Belda, R.; Costa, R. D.; Navarro, P.; Orti, E.; Soriano, C.; García-España, E., Zn(II)-coordination and fluorescence studies of a new polyazamacrocycle incorporating 1*H*-pyrazole and naphthalene units. *Dalton Trans* **2010**, *39* (33), 7741-7746.
155. Ing, H. R.; Manske, R. H. F., CCCXII.-A modification of the Gabriel synthesis of amines. *J Chem Soc* **1926**, *129* (0), 2348-2351.
156. Gibson, M. S.; Bradshaw, R. W., The Gabriel synthesis of primary amines. *Angew. Chem. Int. Ed. (English)* **1968**, *7* (12), 919-930.
157. Lamarque, L.; Navarro, P.; Miranda, C.; Arán, V. J.; Ochoa, C.; Escartí, F.; García-España, E.; Latorre, J.; Luis, S. V.; Miravet, J. F., Dopamine interaction in the absence and in the presence of Cu²⁺ ions with macrocyclic and macrobicyclic polyamines containing pyrazole units. crystal structures of [Cu²(L1)(H₂O)₂](ClO₄)₄ and [Cu²(H-1L3)](ClO₄)₃·2H₂O. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (43), 10560-10570.
158. SUPRAMED “Supramolecular Chemistry applied to the Design, Synthesis and Evaluation of bioactive compounds of Anti-inflammatory, Anti-tumour or Anti-parasitic Action”. <http://www.supramedic.com/>, (último acceso junio de 2016).
159. Crawford, S., Is it time for a new paradigm for systemic cancer treatment? Lessons from a century of cancer chemotherapy. *Front Pharmacol* **2013**, *4*, 68.
160. (a) Elmaci, İ.; Altinoz, M. A., A Metabolic inhibitory cocktail for grave cancers: metformin, pioglitazone and lithium combination in treatment of pancreatic cancer and glioblastoma multiforme. *Biochem Genet* **2016**, *54* (5), 573-618; (b) Bloch, O.; Han, S. J.; Cha, S.; Sun, M. Z.; Aghi, M. K.; McDermott, M. W.; Berger, M. S.; Parsa, A. T., Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: clinical article. *J Neurosurg* **2012**, *117* (6), 1032-1038; (c) DiBlasio, C. J.; Malcolm, J. B.; Hammett, J.; Wan, J. Y.; Aleman, M. A.; Patterson, A. L.; Wake, R. W.; Derweesh, I. H., Survival outcomes in men receiving androgen-deprivation therapy as primary or salvage treatment for localized or advanced prostate cancer: 20-year single-centre experience. *BJU Int* **2009**, *104* (9), 1208-1214.
161. Song, Y. S.; Lee, B. Y.; Hwang, E. S., Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mech Ageing Dev* **2005**, *126* (5), 580-590.

162. (a) Mohammadrezaei, F. M.; Movaghar, A. F.; Gharghabi, M., The effect of caffeine and Chk2 inhibitor on doxorubicin-induced cellular senescence in MCF-7 Cells. *Drug Res (Stuttg)* **2016**, *66* (9), 450-454; (b) McKenna, E.; Traganos, F.; Zhao, H.; Darzynkiewicz, Z., Persistent DNA damage caused by low levels of mitomycin C induces irreversible cell senescence. *Cell Cycle* **2012**, *11* (16), 3132-3140; (c) Kasper, M.; Barth, K., Bleomycin and its role in inducing apoptosis and senescence in lung cells - modulating effects of caveolin-1. *Curr Cancer Drug Targets* **2009**, *9* (3), 341-353.
163. John, S.; Briatka, T.; Rudolf, E., Diverse sensitivity of cells representing various stages of colon carcinogenesis to increased extracellular zinc: implications for zinc chemoprevention. *Oncol Rep* **2011**, *25* (3), 769-780.
164. Ewald, J. A.; Desotelle, J. A.; Almassi, N.; Jarrard, D. F., Drug-induced senescence bystander proliferation in prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Br J Cancer*. **2008**, *98* (7), 1244-1249.
165. Hotta, K.; Tabata, M.; Kiura, K.; Kozuki, T.; Hisamoto, A.; Katayama, H.; Takigawa, N.; Fujimoto, N.; Fujiwara, K.; Ueoka, H.; Tanimoto, M., Gefitinib induces premature senescence in non-small cell lung cancer cells with or without EGFR gene mutation. *Oncol Rep* **2007**, *17* (2), 313-317.
166. Krętowski, R.; Borzym-Kluczyk, M.; Cechowska-Pasko, M., Efficient induction of apoptosis by proteasome inhibitor: bortezomib in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Mol Cell Biochem* **2014**, *389* (1-2), 177-185.
167. Ewald, J. A.; Peters, N.; Desotelle, J. A.; Hoffmann, F. M.; Jarrard, D. F., A high-throughput method to identify novel senescence-inducing compounds. *J Biomol Screen* **2009**, *14* (7), 853-858.
168. Dimri, G. P., What has senescence got to do with cancer? *Cancer cell* **2005**, *7* (6), 505-512.
169. Muñoz-Espín, D.; Serrano, M., Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2014**, *15* (7), 482-496.
170. Lee, M.; Lee, J.-S., Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. *BMB Rep* **2014**, *47* (2), 51-59.
171. The Broad Institute-Novartis. Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). <https://portals.broadinstitute.org/ccle/home>, (último acceso mayo 2016).
172. (a) Roberson, R. S.; Kussick, S. J.; Vallieres, E.; Chen, S. Y.; Wu, D. Y., Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* **2005**, *65* (7), 2795-2803; (b) Han, Z.; Wei, W.; Dunaway, S.; Darnowski, J. W.; Calabresi, P.; Sedivy, J.; Hendrickson, E. A.; Balan, K. V.; Pantazis, P.; Wyche, J. H., Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem* **2002**, *277* (19), 17154-17160; (c) Roninson, I. B., Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* **2003**, *63* (11), 2705-2715.
173. Lemasters, J. J.; Qian, T.; Bradham, C. A.; Brenner, D. A.; Cascio, W. E.; Trost, L. C.; Nishimura, Y.; Nieminen, A. L.; Herman, B., Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* **1999**, *31* (4), 305-319.
174. Kroemer, G.; Zamzami, N.; Susin, S. A., Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **1997**, *18* (1), 44-51.
175. Perelman, A.; Wachtel, C.; Cohen, M.; Haupt, S.; Shapiro, H.; Tzur, A., JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis* **2012**, *3*, e430.
176. Schwarze, S. R.; Fu, V. X.; Desotelle, J. A.; Kenowski, M. L.; Jarrard, D. F., The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia* **2005**, *7* (9), 816-823.
177. Vousden, K. H.; Lane, D. P., p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (4), 275-283.
178. Childs, B. G.; Baker, D. J.; Kirkland, J. L.; Campisi, J.; van Deursen, J. M., Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* **2014**, *15* (11), 1139-1153.
179. (a) Di, X.; Shiu, R. P.; Newsham, I. F.; Gewirtz, D. A., Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to Adriamycin. *Biochem Pharmacol* **2009**, *77* (7), 1139-1150; (b) Knizhnik, A. V.; Roos, W. P.; Nikolova, T.; Quiros, S.; Tomaszowski, K. H.; Christmann, M.; Kaina, B., Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PloS One* **2013**, *8* (1), e55665.

180. Balasundaram, D.; Tyagi, A. K., Polyamine-DNA nexus: structural ramifications and biological implications. *Mol Cell Biochem* **1991**, *100* (2), 129-140.
181. Dehennaut, V.; Loison, I.; Dubuissez, M.; Nassour, J.; Abbadie, C.; Leprince, D., DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair. *J Biol Chem* **2013**, *288* (15), 10254-10264.
182. Firsanov, D. V.; Solovjeva, L. V.; Svetlova, M. P., H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. *Clin Epigenetics* **2011**, *2* (2), 283-297.
183. Aird, K. M.; Zhang, R., Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol Biol* **2013**, *965*, 185-196.
184. Rogakou, E. P.; Boon, C.; Redon, C.; Bonner, W. M., Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J Cell Biol* **1999**, *146* (5), 905-916.
185. Torti, S. V.; Ma, R.; Venditto, V. J.; Torti, F. M.; Planalp, R. P.; Brechbiel, M. W., Preliminary evaluation of the cytotoxicity of a series of tris-2-aminoethylamine (Tren) based hexadentate heterocyclic donor agents. *Bioorg Med Chem* **2005**, *13* (21), 5961-5967.
186. Fatfat, M.; Merhi, R. A.; Rahal, O.; Stoyanovsky, D. A.; Zaki, A.; Haidar, H.; Kagan, V. E.; Gali-Muhtasib, H.; Machaca, K., Copper chelation selectively kills colon cancer cells through redox cycling and generation of reactive oxygen species. *BMC Cancer* **2014**, *14* (1), 1-12.
187. Kim, S. K.; Lee, D. H.; Hong, J.-I.; Yoon, J., Chemosensors for pyrophosphate. *Acc. Chem. Res* **2009**, *42* (1), 23-31.
188. Kurishita, Y.; Kohira, T.; Ojida, A.; Hamachi, I., Organelle-localizable fluorescent chemosensors for site-specific multicolor imaging of nucleoside polyphosphate dynamics in living cells. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (45), 18779-18789.
189. National Cancer Institute, NCI. Division of Cancer Treatment & Diagnosis (DCTP). Development therapeutics Program (DTP). COMPARE Analysis. Disponible en https://dtp.cancer.gov/databases_tools/compare.htm, (último acceso abril 2017).
190. Sánchez-Moreno, M.; Gómez-Contreras, F.; Navarro, P.; Marín, C.; Ramírez-Macías, I.; Olmo, F.; Sanz, A. M.; Campayo, L.; Cano, C.; Yunta, M. J., *In vitro* leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. *T J Antimicrob Chemother* **2012**, *67* (2), 387-397.

5

Conclusiones

En la presente memoria describimos el diseño, la síntesis y la evaluación antiparasitaria y antitumoral de una librería de derivados de sulfonamidas y poliaminas, cuyos resultados obtenidos nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se han sintetizado y caracterizado 125 derivados de sulfonamidas *N*-sustituidas (**S1-S26**). Los rendimientos obtenidos varían de moderados a buenos, siendo cuantitativos para determinados compuestos. La caracterización estructural se ha realizado por RMN 1D (^1H y ^{13}C), RMN 2D (^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HSQC) y espectrometría de masas de alta resolución. El análisis espectroscópico ha permitido confirmar los desplazamientos y constantes de acoplamiento característicos de anillos aromáticos, heteroaromáticos o alicíclicos.
2. La evaluación antiparasitaria *in vitro* de las sulfonamidas **S1-S26** frente *Leishmania* spp. ha permitido confirmar la actividad de los cabezas de serie **S2b** y **S3b** frente a otras especies de *Leishmania* e identificar seis nuevos derivados activos de diversa naturaleza heterocíclica, la sulfonamida monocíclica **S4f** (tiazol) y los sistemas benzofusionados **S8e** (indol), **S10a** (indazol), **S13a** (benzotiazol), **S15e** (isoquinolina) y **S25d** (piperidina).
3. La evaluación antiparasitaria en un modelo de leishmaniosis visceral de las sulfonamidas seleccionadas ha conducido a la identificación de tres derivados (**S2b**, **S3b** y **S10a**), que por su índice terapéutico y actividad *in vivo* frente a *L. infantum* los convierten en cabezas de serie o prototipos a partir de los cuales diseñar nuevos compuestos para el tratamiento de esta parasitosis.
4. La relevancia terapéutica de los nitroderivados en el tratamiento de la leishmaniosis se ha puesto de manifiesto a través de la actividad mostrada frente a formas promastigotes de *Leishmania* spp de las *N*-4-nitrobencenosulfonamidas **S2b** y **S3b**, en comparación con sus análogos estructurales no nitrados, así como por las *N*-4-nitrobencenosulfonamidas con anillos benzofusionados saturados **S18b**, **S19b**, **S20b**, **S22b** y **S23b**.
5. Estudios de actividad nucleasa *in vitro* con las sulfonamidas **S2b** y **S3b** han demostrado su capacidad de escisión del ADN, en presencia de cobre (II) y un agente reductor, mediante un mecanismo oxidativo por la generación de especies ROS.
6. La sulfonamida **S10a**, derivado indazólico 5-sustituido, altera la disposición microtubular de promastigotes de *L. infantum*, por lo que debido a su tolerabilidad y eficacia *in vivo* puede ser considerado como un nuevo prototipo en el desarrollo de agentes anti-tubulina de elevada especificidad frente a estos parásitos.
7. La evaluación antiparasitaria *in vitro* de las de las sulfonamidas **S1-S26** frente a *T. cruzi* ha permitido identificar seis derivados, **S2b**, **S3b**, **S7a**, **S11e**, **S11d** y **S15e**, activos con un elevado índice de selectividad. Su posterior evaluación en un modelo de infección aguda ha conducido a la determinación de la actividad tripanocida *in vivo* de la

sulfonamida **S15e**, un análogo estructural simplificado de alcaloides naftilisoquinoleínicos de eficacia demostrada en el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas, convirtiéndole en un nuevo cabeza de serie.

8. Los estudios de REA nos han permitido establecer las características estructurales esenciales que determinan la actividad antiprotozoaria de las sulfonamidas **S1-S26**. De manera generalizada, en sulfonamidas monocíclicas heteroaromáticas o con anillos alicíclicos benzofusionados la *para*-sustitución con un grupo nitro aumenta considerablemente la actividad. Entre las sulfonamidas bicíclicas heteroaromáticas, resultan más activas las bencenosulfonamidas no sustituidas o naftalenosulfonamidas.
9. En el presente trabajo se ha demostrado la actividad antiproliferativa *in vitro* frente a líneas celulares de diferente origen tumoral de la sulfonamida **S8e**, derivado indólico que inhibe la polimerización *in vitro* de la tubulina de manera reversible, lo que le convierte en un potencial cabeza de serie de compuestos antitumorales. Además, se han llevado a cabo estudios de *docking* que postulan su unión al sitio de unión de la Colchicina y permiten establecer los requisitos estructurales para su actividad.
10. Los resultados obtenidos en la evaluación farmacológica de las sulfonamidas **S2b**, **S3b**, **S10a**, **S15e** y **S8e**, compuestos de fácil síntesis y actividad antiparasitaria frente a protozoos kinetoplástidos y antiproliferativa frente a diversas líneas tumorales, confirman el papel esencial de la entidad molecular sulfonamida en el arsenal terapéutico como grupo farmacofórico validado en el diseño de nuevos fármacos.
11. Se han sintetizado y caracterizado 12 derivados poliamínicos (**L1-L5**), con rendimientos de buenos a moderados. Todos ellos han sido aislados en su forma clorhidrato como sólidos de elevado punto de fusión. La caracterización estructural se ha realizado por RMN 1D (^1H y ^{13}C), RMN 2D (^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HSQC) y espectrometría de masas de alta resolución.
12. La evaluación antitumoral de las poliaminas **L1-L5** ha permitido la identificación de los derivados **L1a** y **L4a**, como poliaminas con un perfil antiproliferativo *in vitro* significativo, validado en hasta 8 líneas celulares de diferente origen tumoral. La similitud estructural entre ambos compuestos han permitido establecer una primera aproximación de la Relación Estructura-Actividad (REA), estableciéndose como elemento farmacofórico la bis-2-picolil-dietilentiamina.
13. Las poliaminas **L1a** y **L4a** promueven senescencia con una evidente parada del ciclo celular en la fase G1/G0, no asociada a daño al ADN, seguida de muerte celular por apoptosis. A pesar de la similitud estructural y sus valores de IC_{50} , la magnitud de inducción secuencial de senescencia y apoptosis es dependiente de línea y compuesto.
14. La evaluación antiparasitaria *in vitro* de las poliaminas **L1-L5** ha permitido la identificación de tres derivados poliamínicos como potenciales agentes leishmanicidas y/o tripanocidas: **L2b**, **L2e** y **L4a**, cuyos elevados índices de selectividad plantean su evaluación en modelos *in vivo*.

15. La coincidente actividad antiparasitaria frente a *Leishmania* spp. y *T. cruzi*, y antiproliferativa en líneas celulares de diferente origen tumoral de la poliamina **L4a**, caracterizada por su sencillez estructural y fácil síntesis, sustenta el interés en el desarrollo de derivados poliamínicos con ambas actividades.

6

Anexos

ANEXO-1.

Evaluación de la capacidad antiproliferativa de las sulfonamidas seleccionadas de las series **S8-S11** y **S13-S22**. (*material suplementario*).

Figura A1.1. Viabilidad celular de un panel representativo de líneas celulares de diferente origen tumoral tras el tratamiento con las sulfonamidas de las series **S8, S10-11, S13, S17** y **S20-S21** (*1° screening*)..... 378

Figura A1.2. Viabilidad celular de Jeko-1, SKMG-3 y SW620 tras el tratamiento con las sulfonamidas seleccionadas de las series **S8-S11** y **S13-S22** (*2° Screening*)..... 379

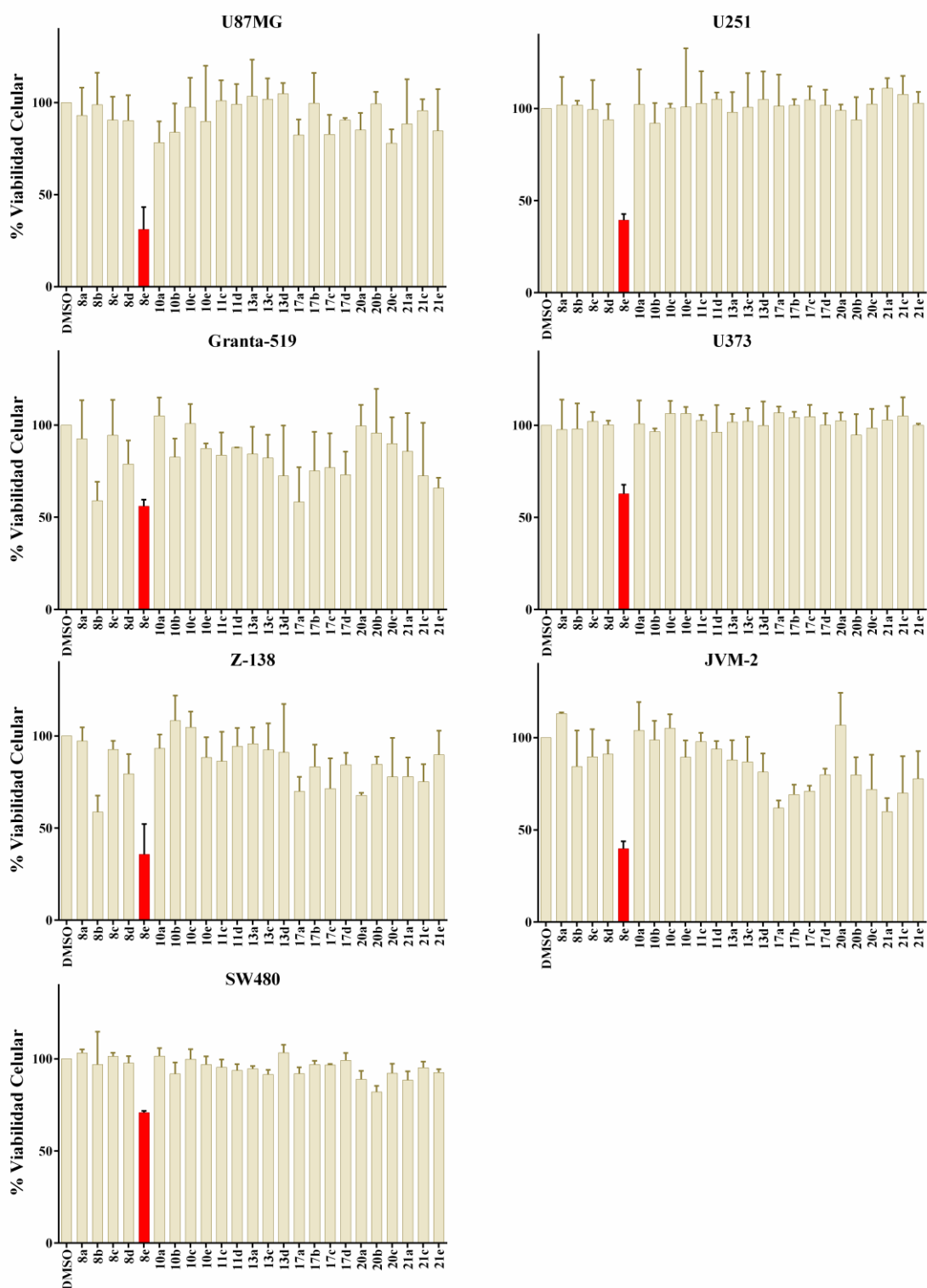


Figura A1.1. Viabilidad celular de un panel representativo de líneas celulares de diferente origen tumoral tras el tratamiento con las sulfonamidas de las series **S8**, **S10-11**, **S13**, **S17** y **S20-S21** (*1° screening*). Viabilidad celular de las líneas indicadas tras un tratamiento 10 μ M durante 48 horas con las sulfonamidas seleccionadas. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por triplicado.

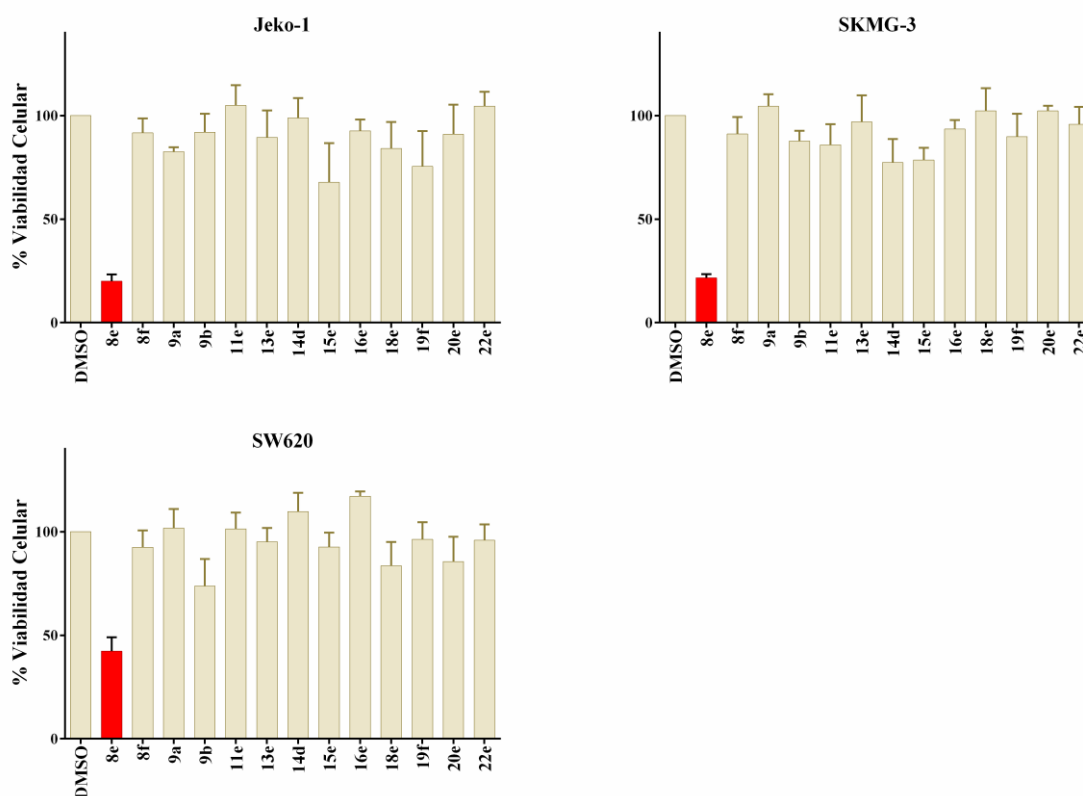


Figura A1.2. Viabilidad celular de Jeko-1, SKMG-3 y SW620 tras el tratamiento con las sulfonamidas seleccionadas de las series **S8-S11** y **S13-S22** (*2^o Screening*). Viabilidad celular de las líneas indicadas tras un tratamiento 10 μ M durante 48 horas con las sulfonamidas seleccionadas. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres ensayos independientes evaluada cada condición por triplicado.

ANEXO-2.

COLECCIÓN DE ESPECTROS DE RMN DE LAS POLIAMINAS L1-L5

Figura A2.1. Espectro de RMN ^1H del compuesto L3-ft	383
Figura A2.2. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L3-ft	383
Figura A2.3. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L3-ft	384
Figura A2.4. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L3-ft	384
Figura A2.5. Espectro de RMN ^1H del compuesto L5-ft	385
Figura A2.6. Diagramas de acoplamiento de los hidrógenos del anillo quinolínico q3 y q9 de L5-ft	385
Figura A2.7. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L5-ft	386
Figura A2.8. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L5-ft	386
Figura A2.9. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L5-ft	387
Figura A2.10. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1	388
Figura A2.11. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1	388
Figura A2.12. Espectro de RMN ^1H del compuesto L2	389
Figura A2.13. Espectro DEPT del compuesto L2	389
Figura A2.14. Espectro de RMN ^1H del compuesto L3	390
Figura A2.15. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L3	390
Figura A2.16. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L3	391
Figura A2.17. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L3	391
Figura A2.18. Espectro de RMN ^1H del compuesto L5	392
Figura A2.19. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L5	392
Figura A2.20. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1a	393
Figura A2.21. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1a	393
Figura A2.22. Espectro DEPT del compuesto L1a	394
Figura A2.23. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1b	395
Figura A2.24. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1b	395
Figura A2.25. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1c	396
Figura A2.26. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1c	396
Figura A2.27. Espectro DEPT del compuesto L1c	397
Figura A2.28. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1d	398
Figura A2.29. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L1d	398
Figura A2.30. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1d	399
Figura A2.31. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L1d	399
Figura A2.32. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1e	400
Figura A2.33. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L1e	400
Figura A2.34. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L1e	401
Figura A2.35. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1e	401
Figura A2.36. Espectro de RMN ^1H del compuesto L2a	402
Figura A2.37. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L2a	402
Figura A2.38. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L2a	403
Figura A2.39. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L2a	403

Figura A2.40. Espectro de RMN ^1H del compuesto L2b	404
Figura A2.41. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L2b	404
Figura A2.42. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L2b	405
Figura A2.43. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L2b	405
Figura A2.44. Espectro de RMN ^1H del compuesto L2e	406
Figura A2.45. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L2e	406
Figura A2.46. Espectro DEPT del compuesto L2e	407
Figura A2.47. Espectro de RMN ^1H del compuesto L3a	408
Figura A2.48. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L3a	408
Figura A2.49. Espectro de RMN ^1H del compuesto L4a	409
Figura A2.50. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L4a	409
Figura A2.51. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L4a	410
Figura A2.52. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L4a	410
Figura A2.53. Espectro de RMN ^1H del compuesto L4c	411
Figura A2.54. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L4c	411

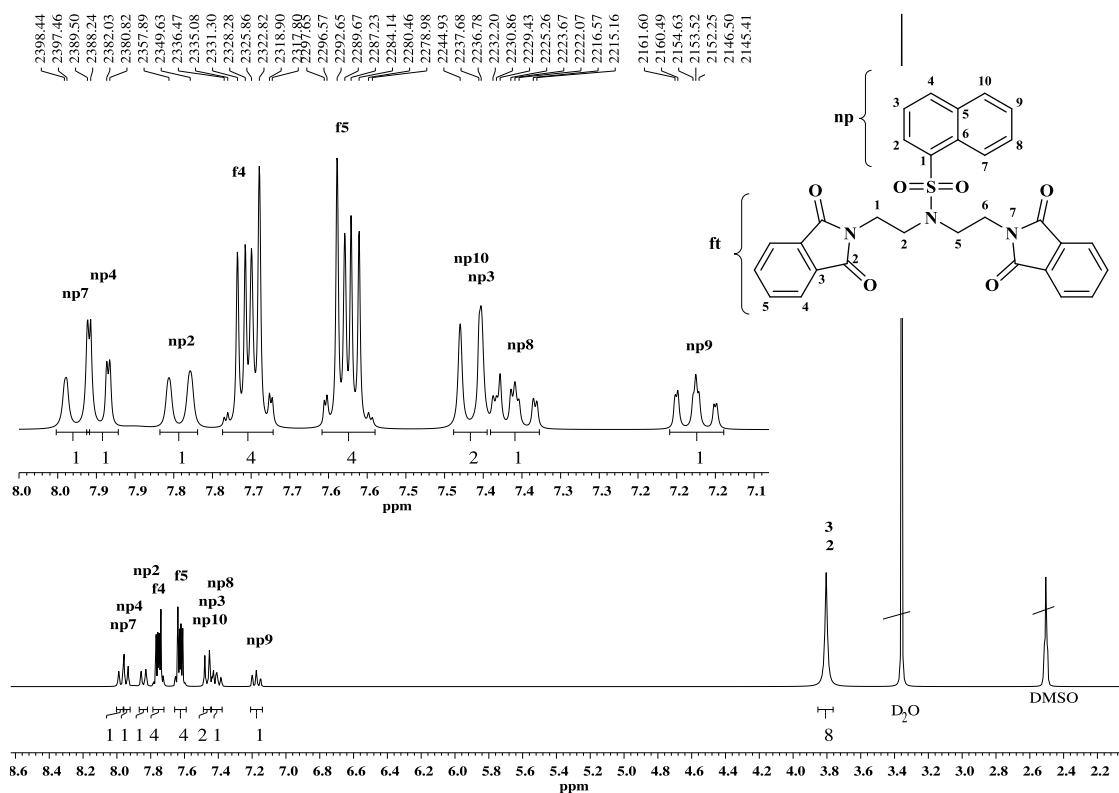


Figura A2.1. Espectro de RMN ¹H del compuesto L3-ft.

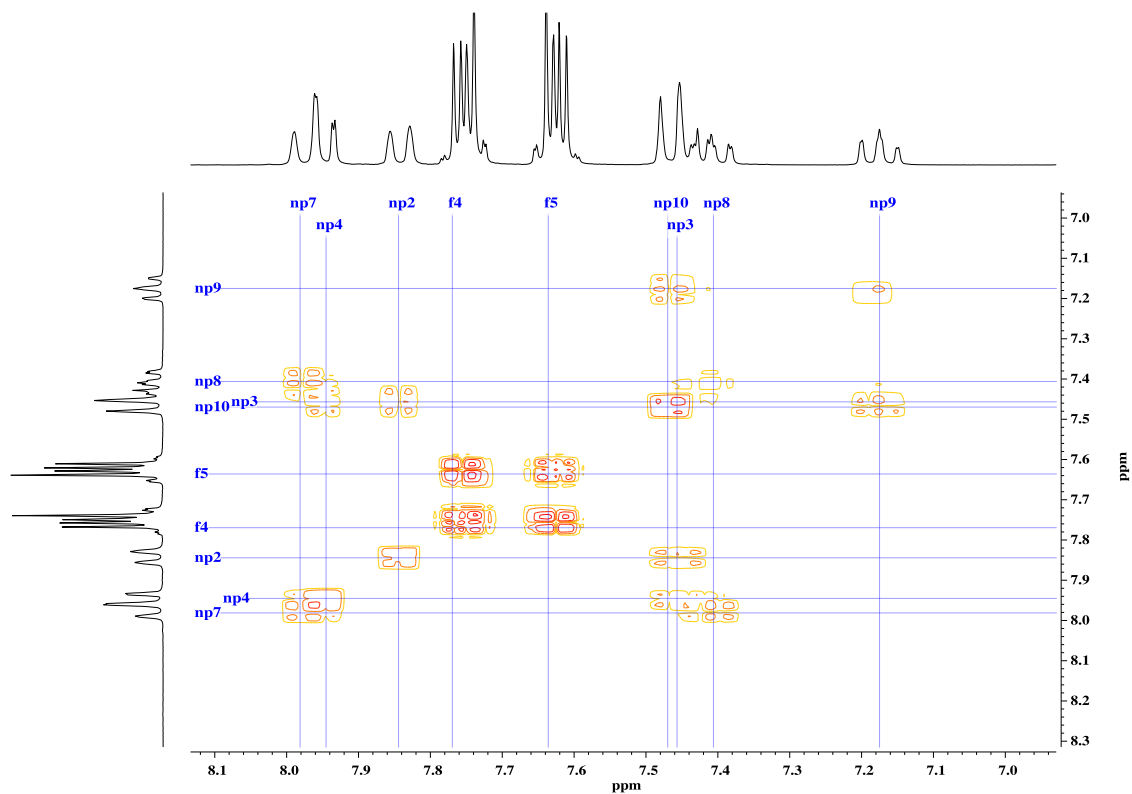


Figura A2.2. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ¹H-¹H COSY de L3-ft.

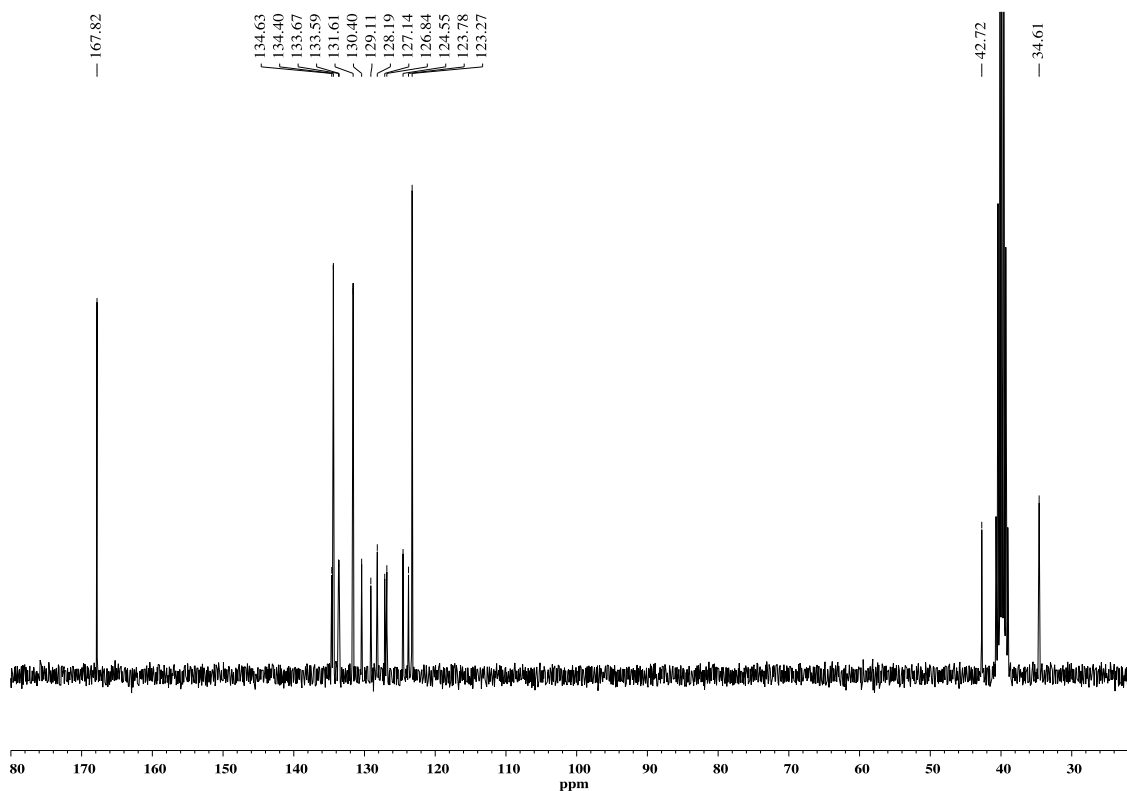


Figura A2.3. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L3-ft.

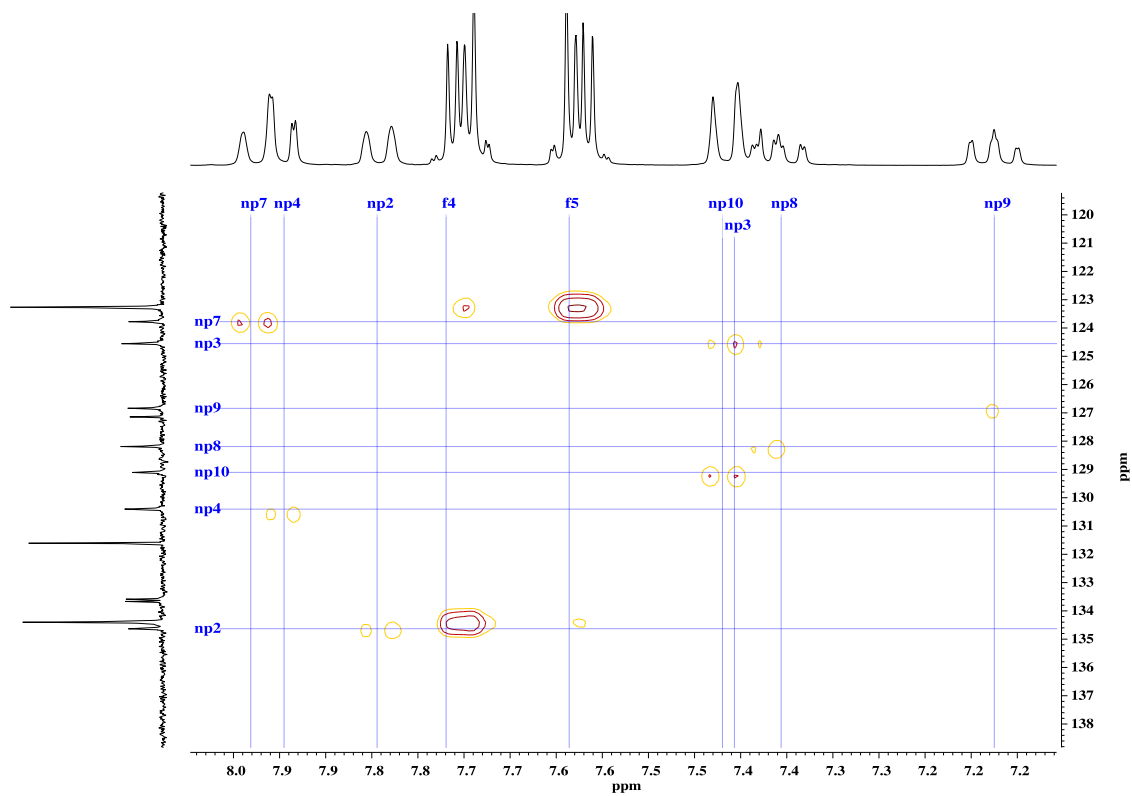


Figura A2.4. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L3-ft.

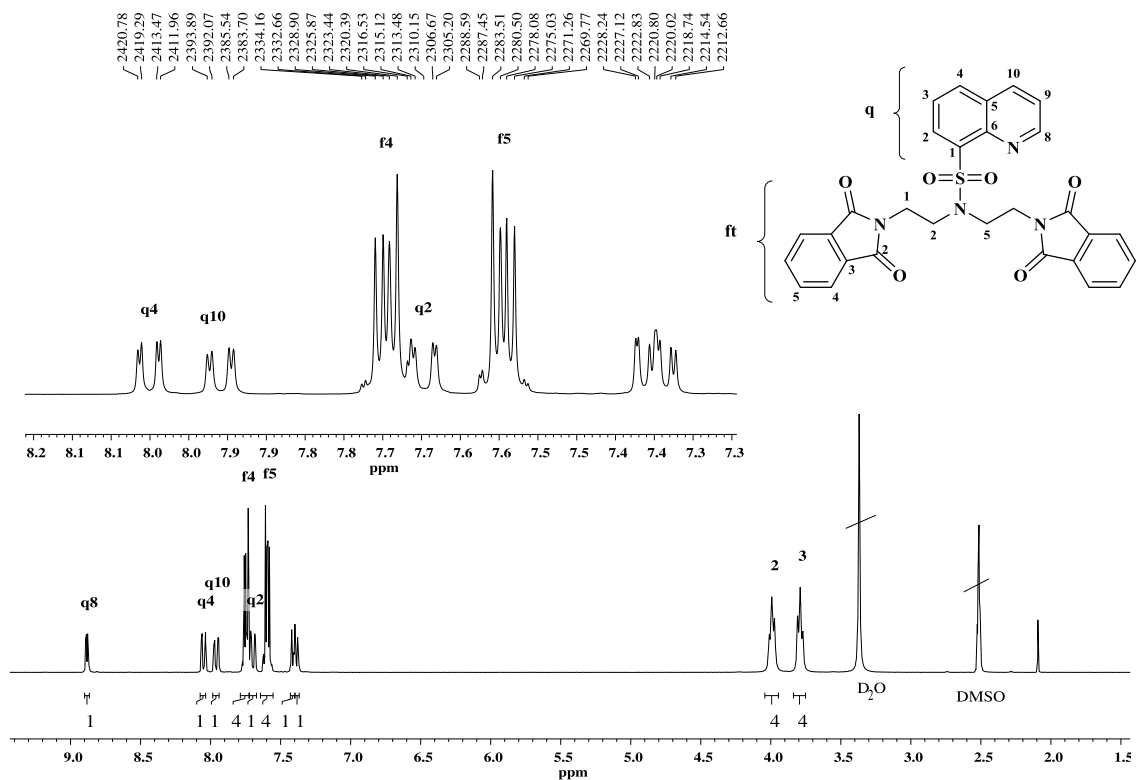


Figura A2.5. Espectro de RMN ^1H del compuesto L5-ft.

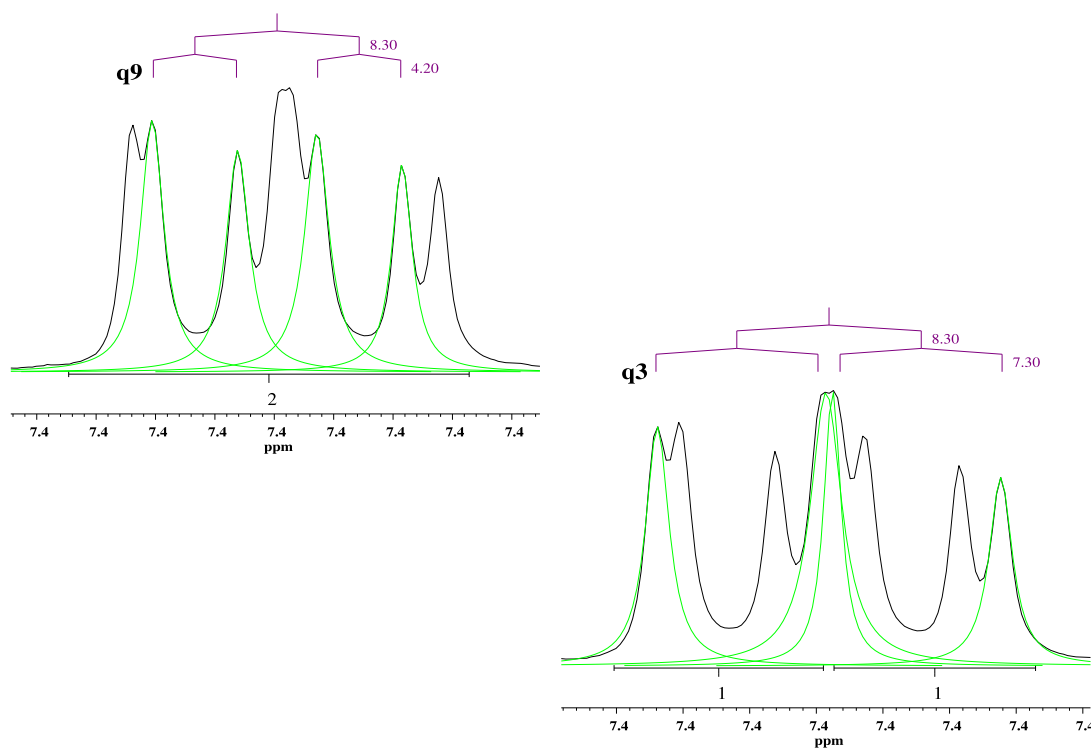


Figura A2.6. Diagramas de acoplamiento de los hidrógenos del anillo quinolinico q3 y q9 de L5-ft.

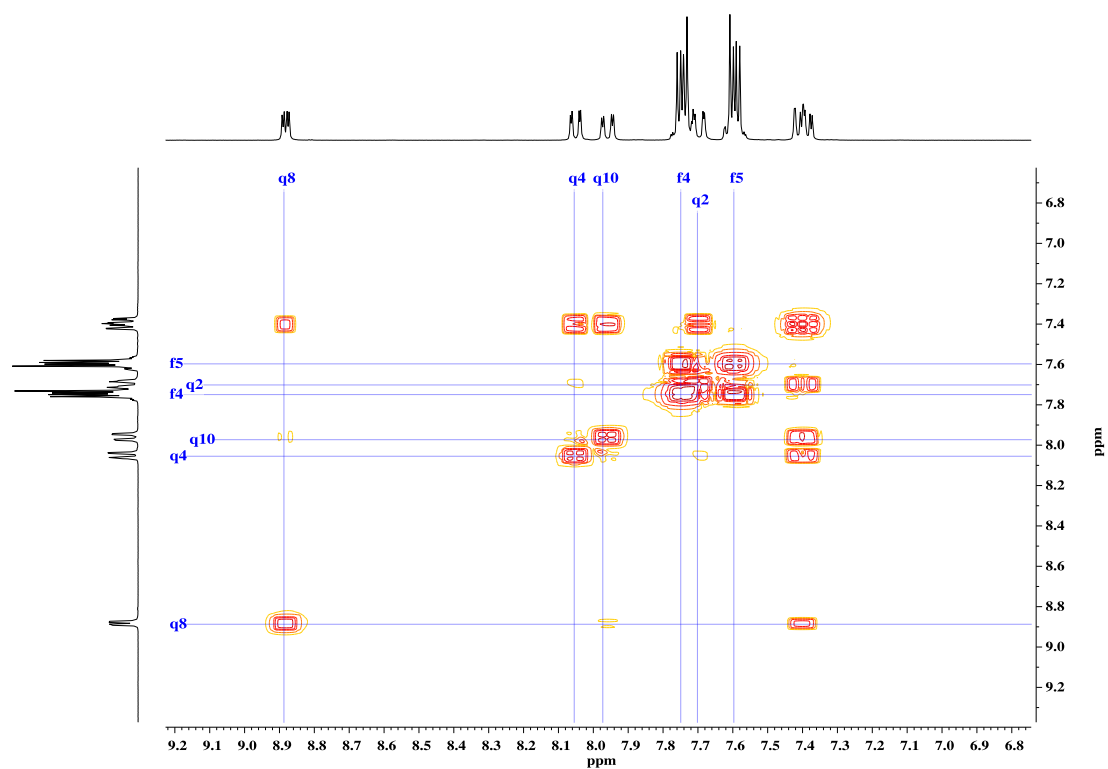


Figura A2.7. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L5-ft.

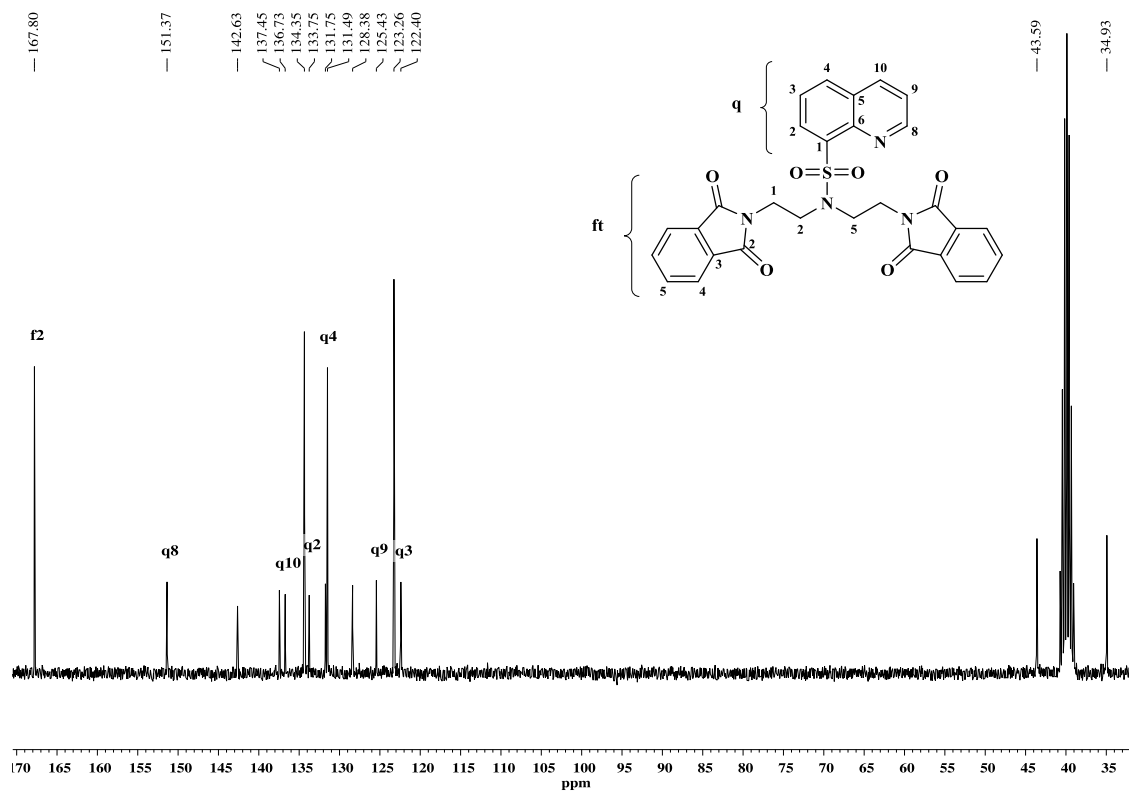


Figura A2.8. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L5-ft.

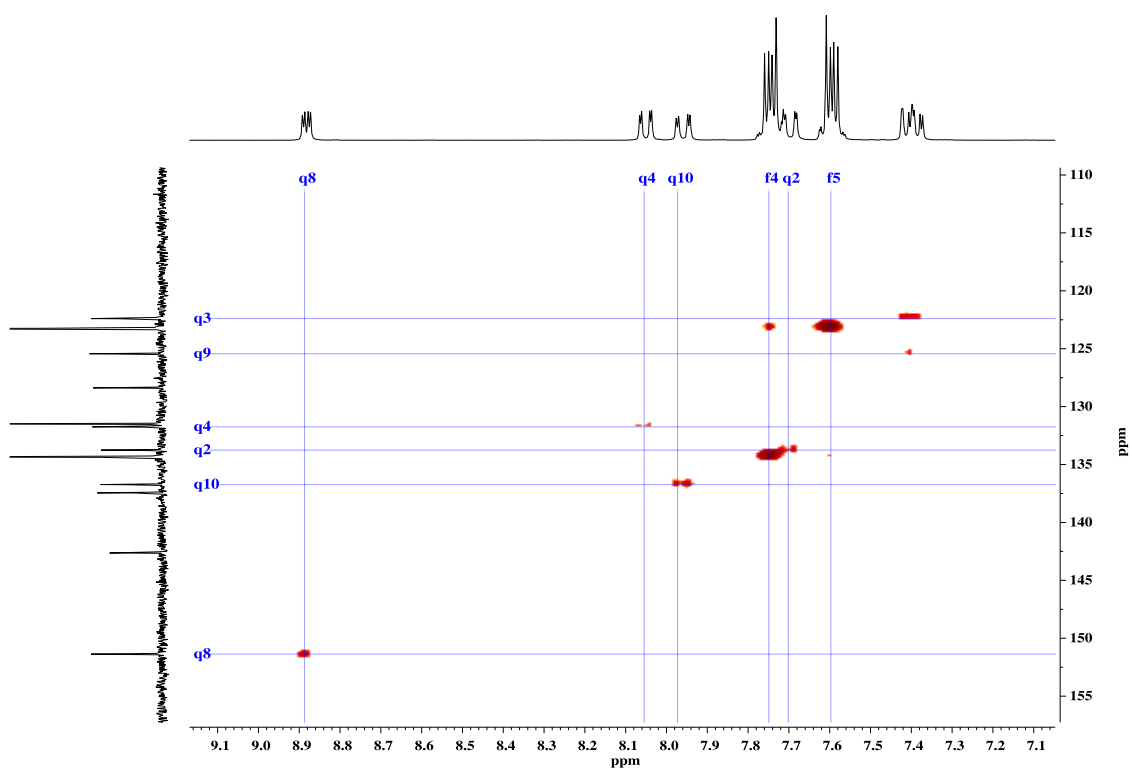


Figura A2.9. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L5-ft.

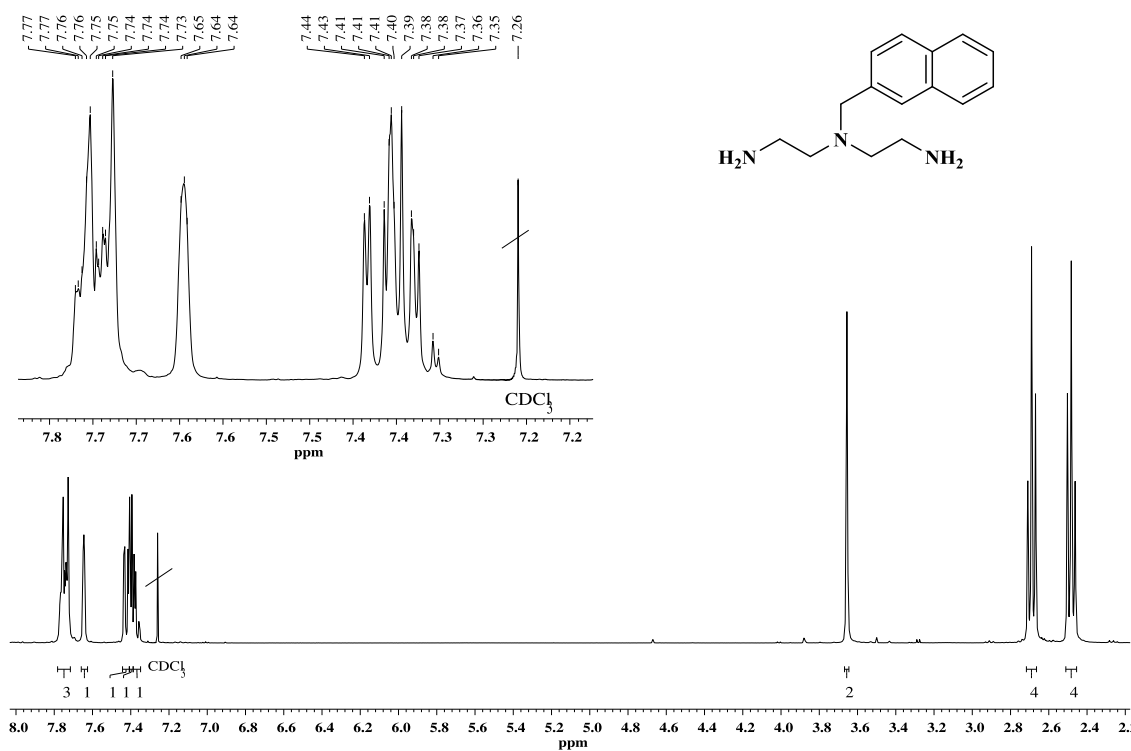


Figura A2.10. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1.

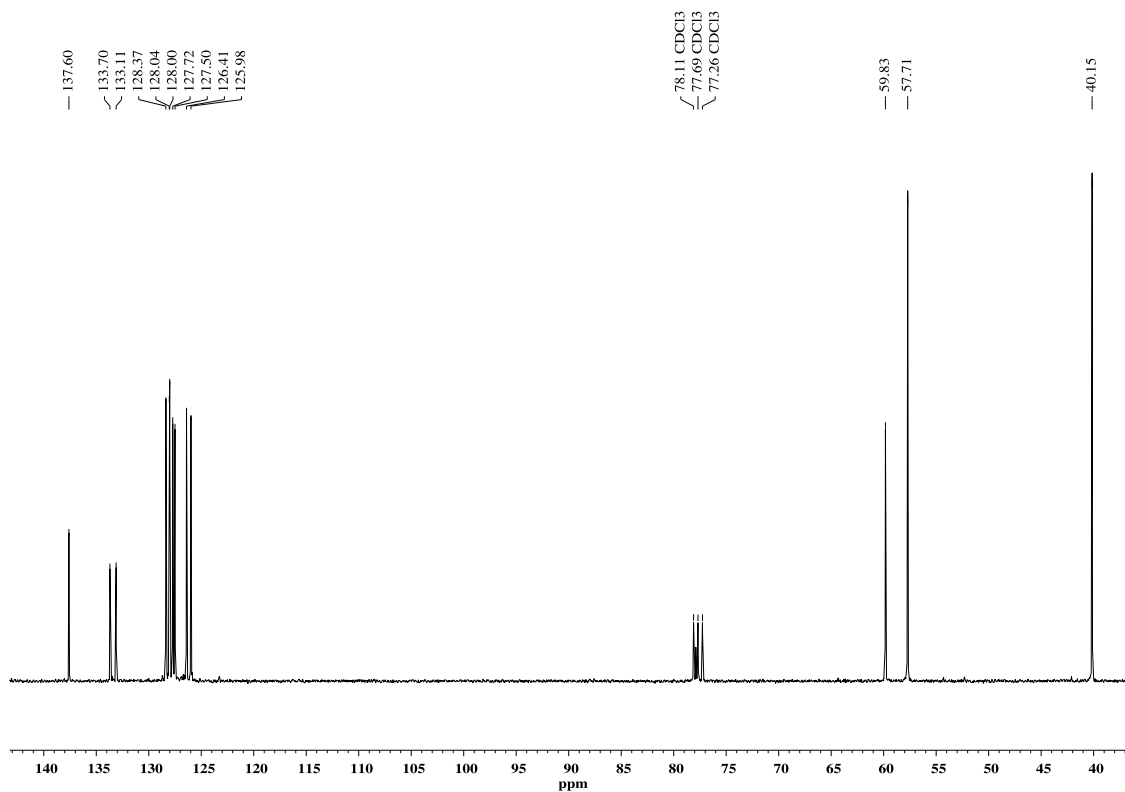


Figura A2.11. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1.

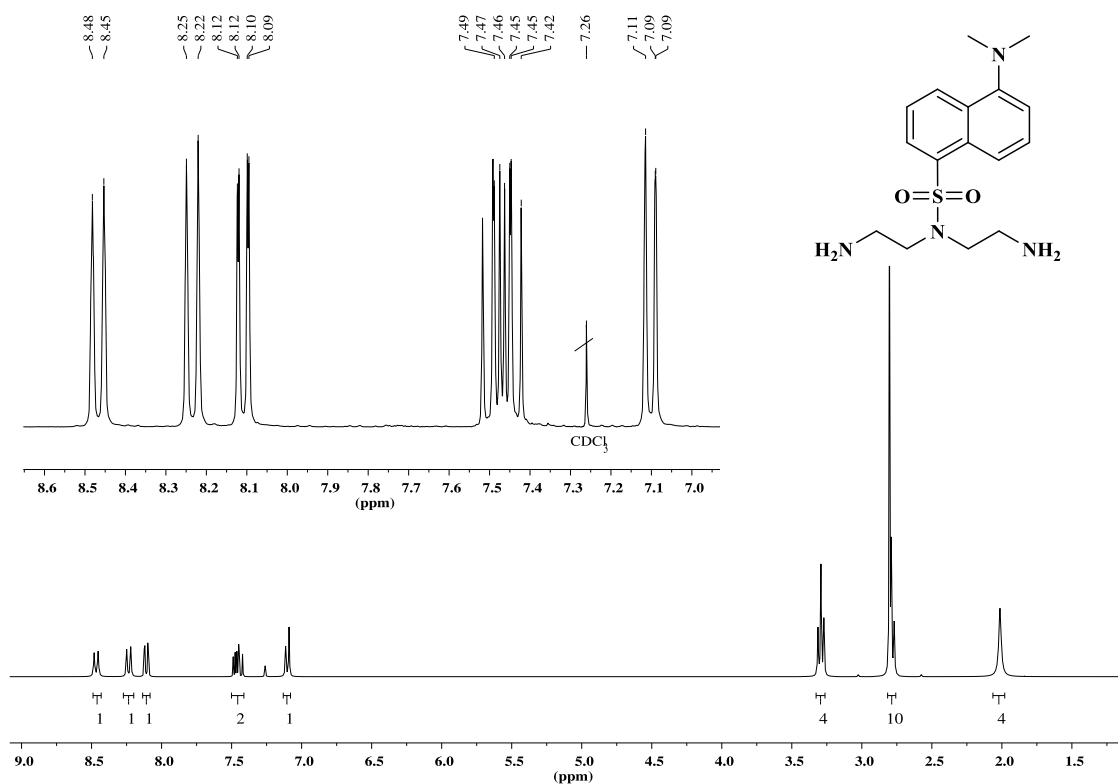


Figura A2.12. Espectro de RMN ^1H del compuesto L2.

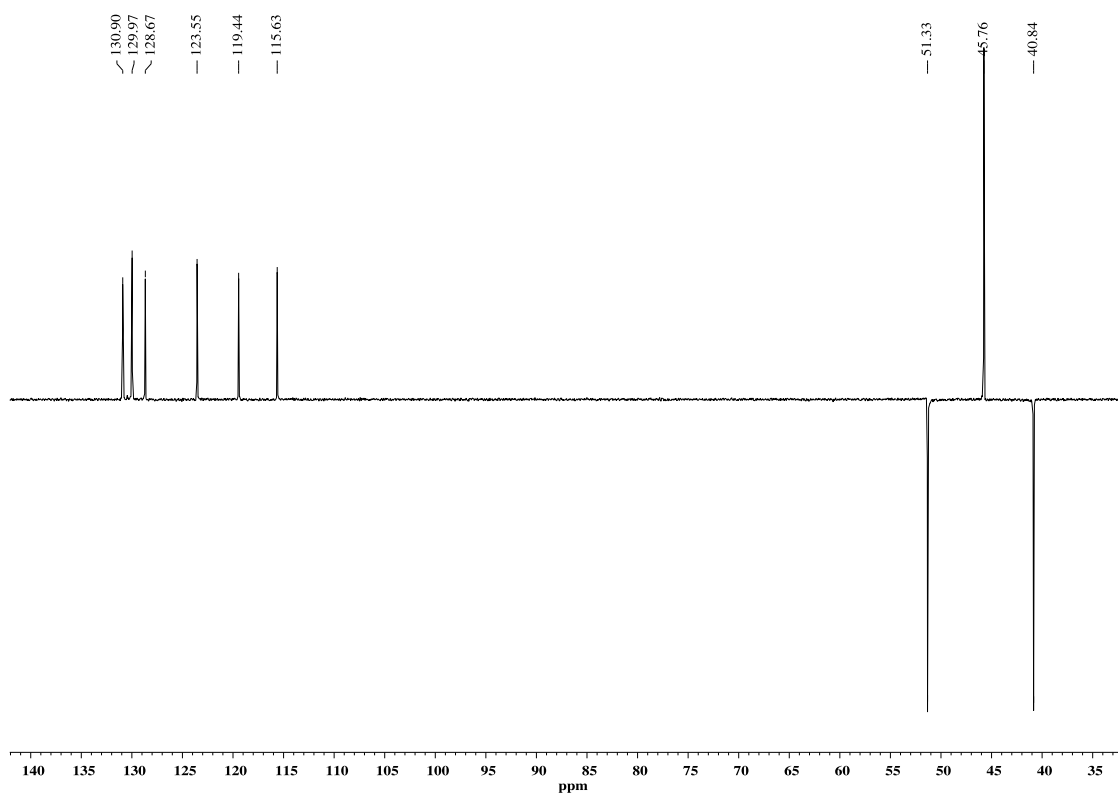


Figura A2.13. Espectro DEPT del compuesto L2.

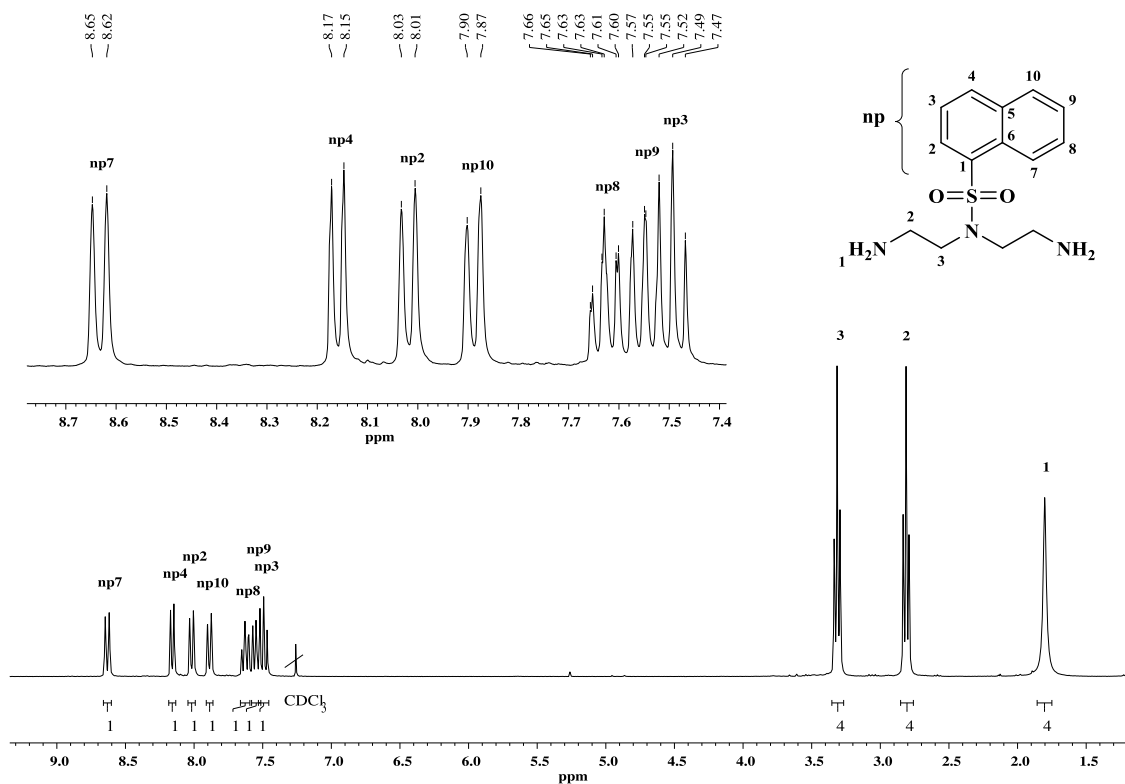


Figura A2.14. Espectro de RMN ^1H del compuesto L3.

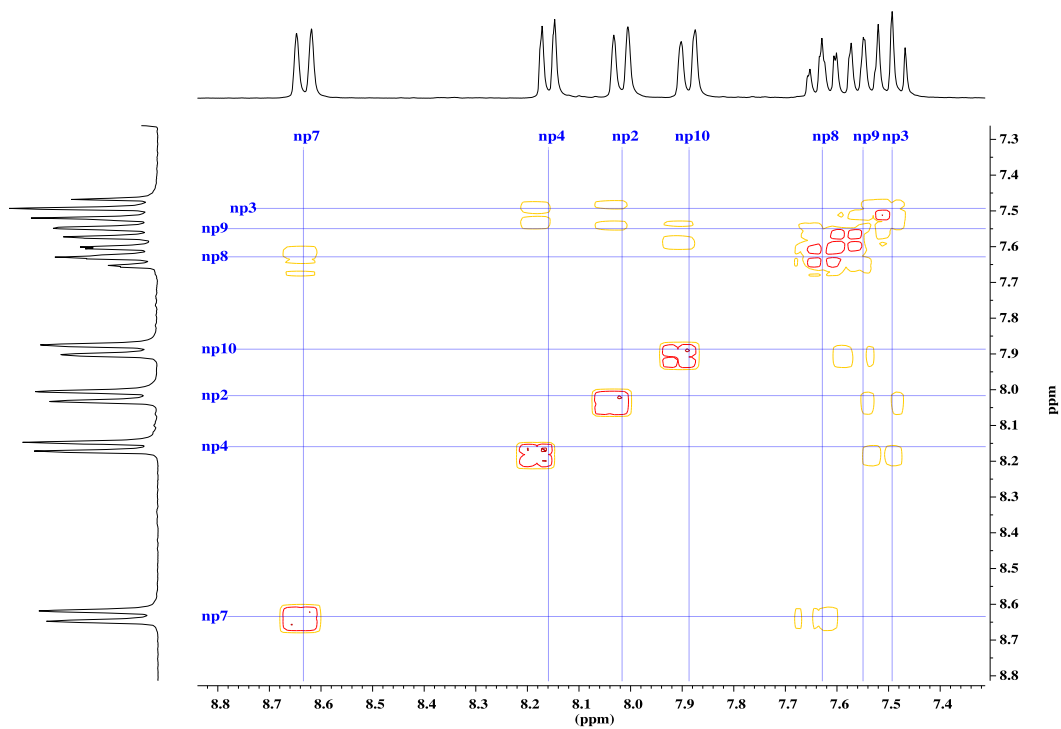


Figura A2.15. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L3.

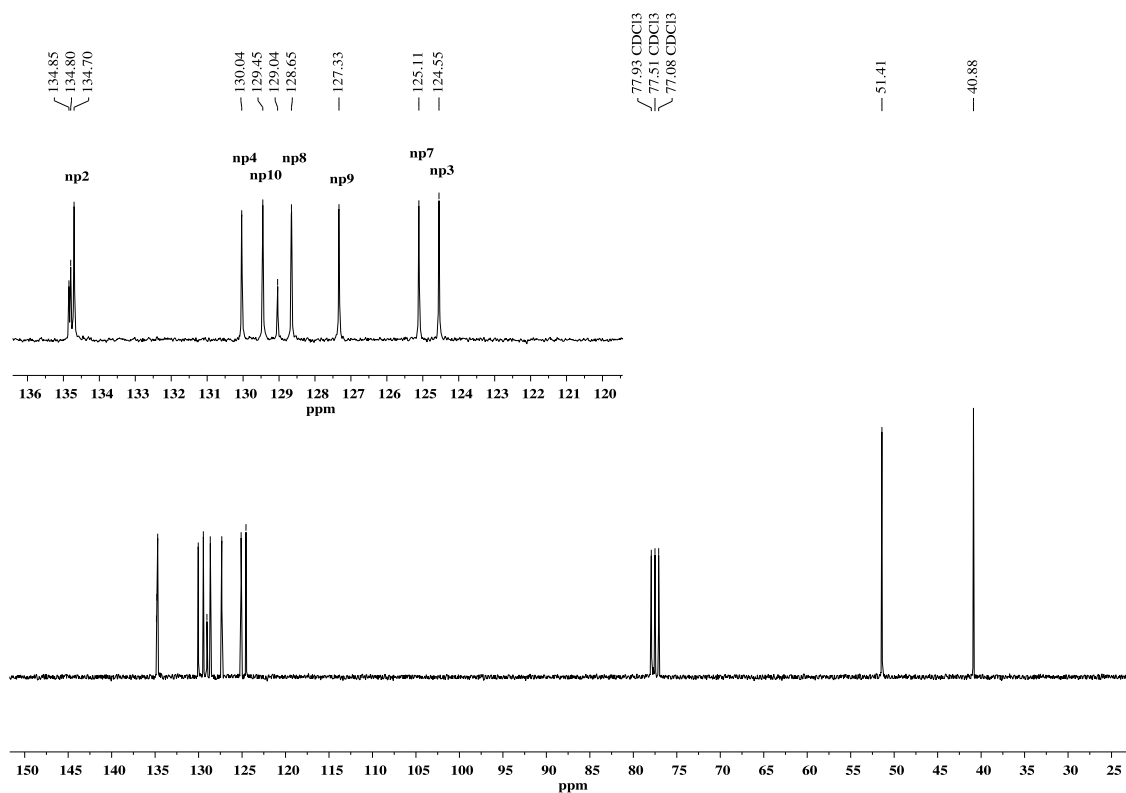


Figura A2.16. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L3.

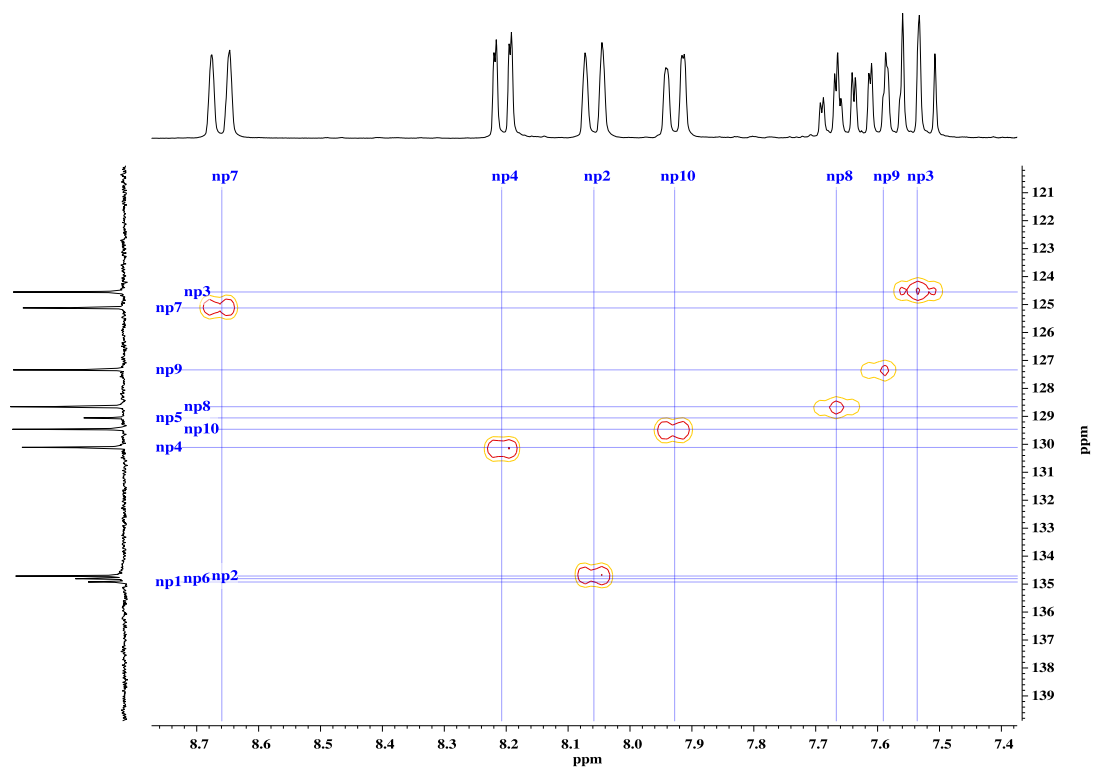


Figura A2.17. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L3.

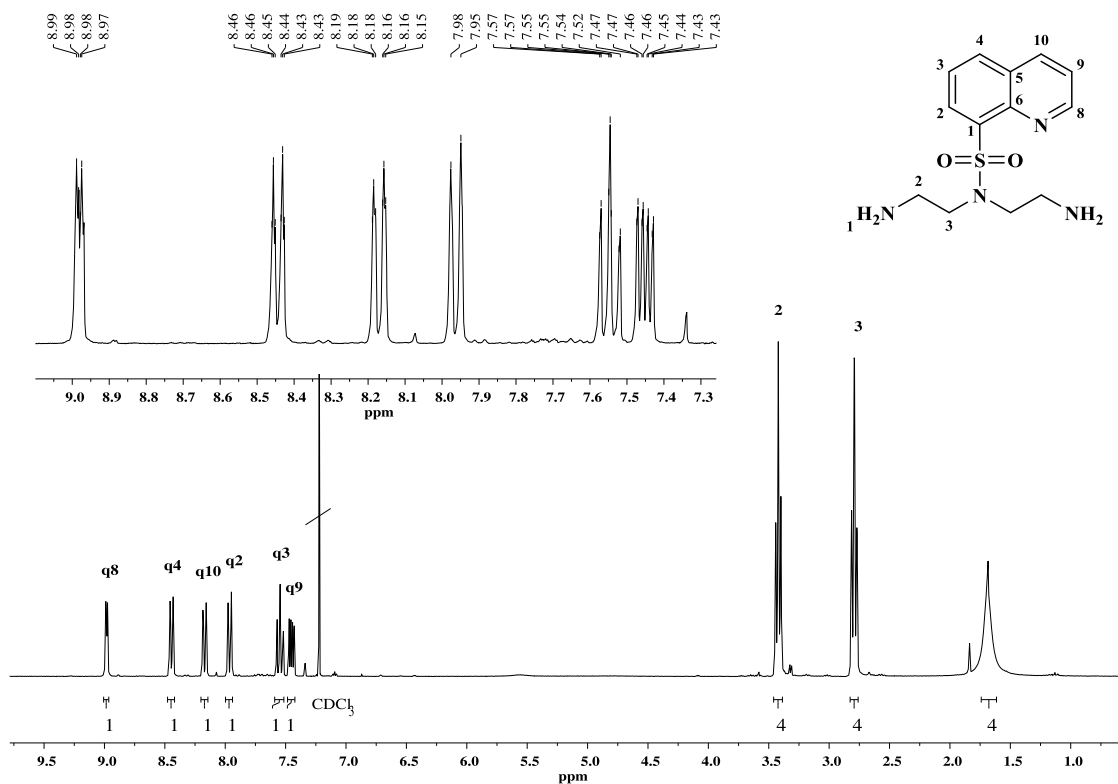


Figura A2.18. Espectro de RMN ^1H del compuesto L5.

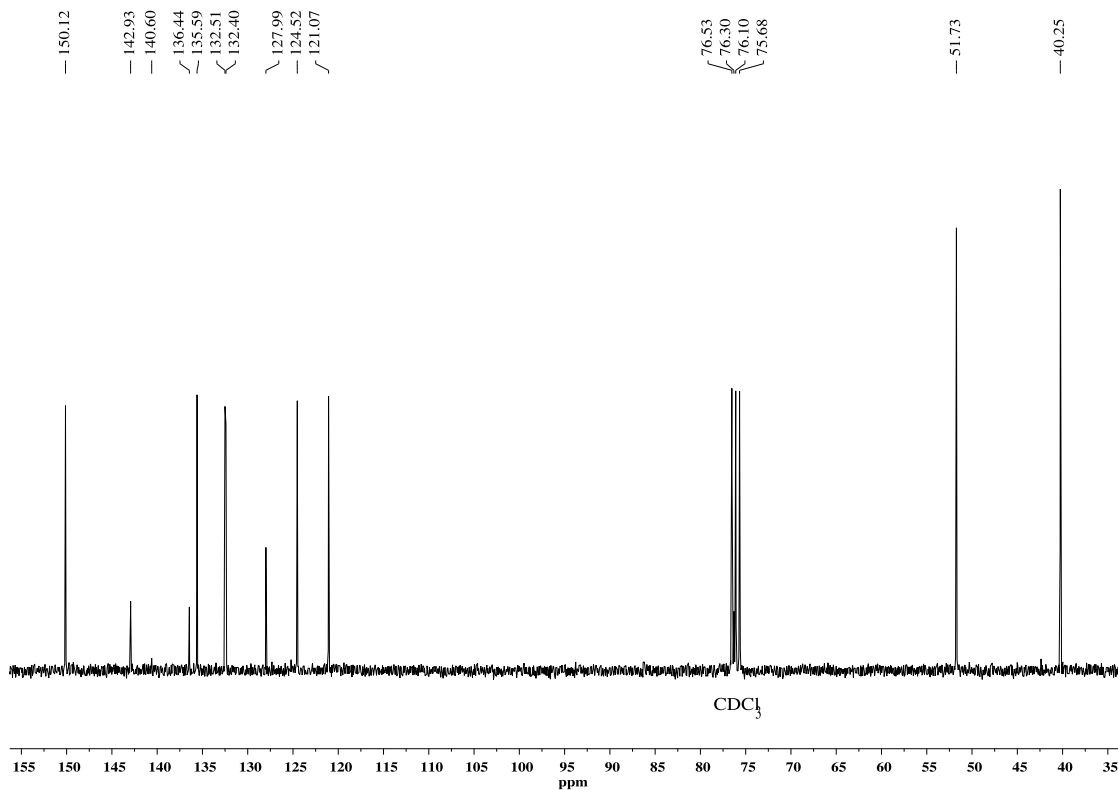


Figura A2.19. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L5.

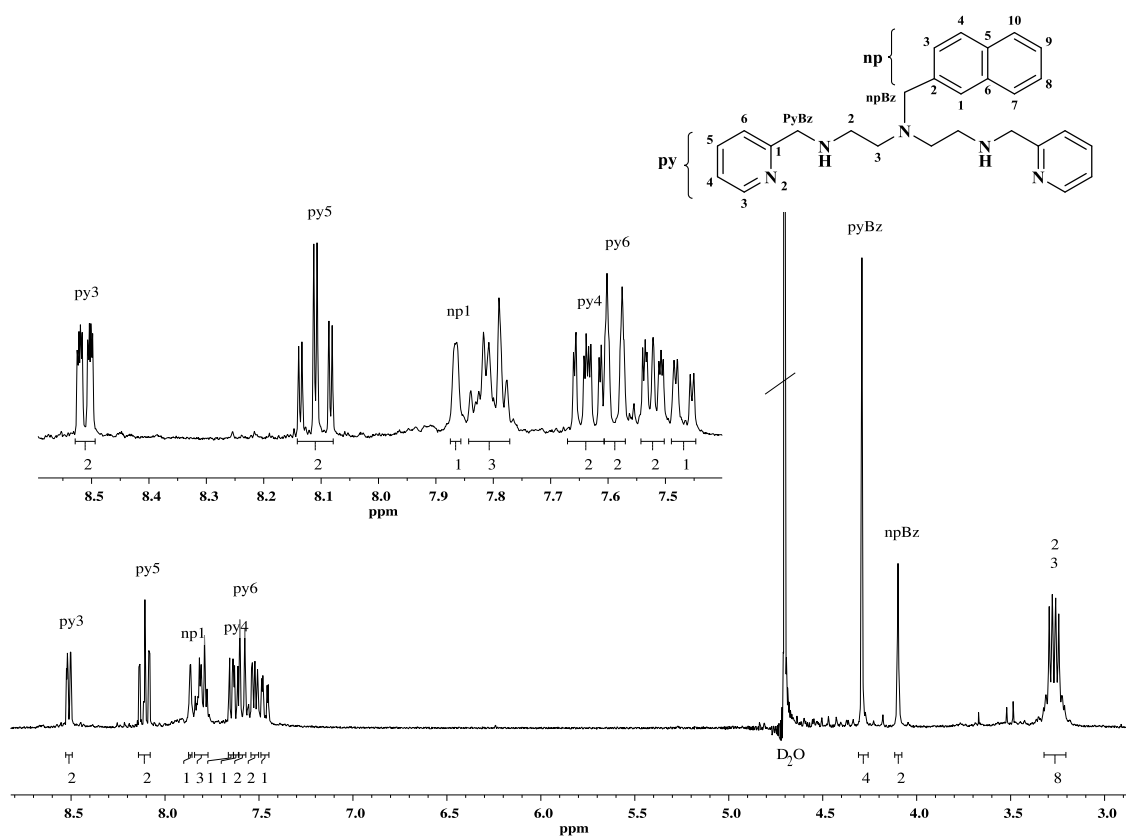


Figura A2.20. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1a.

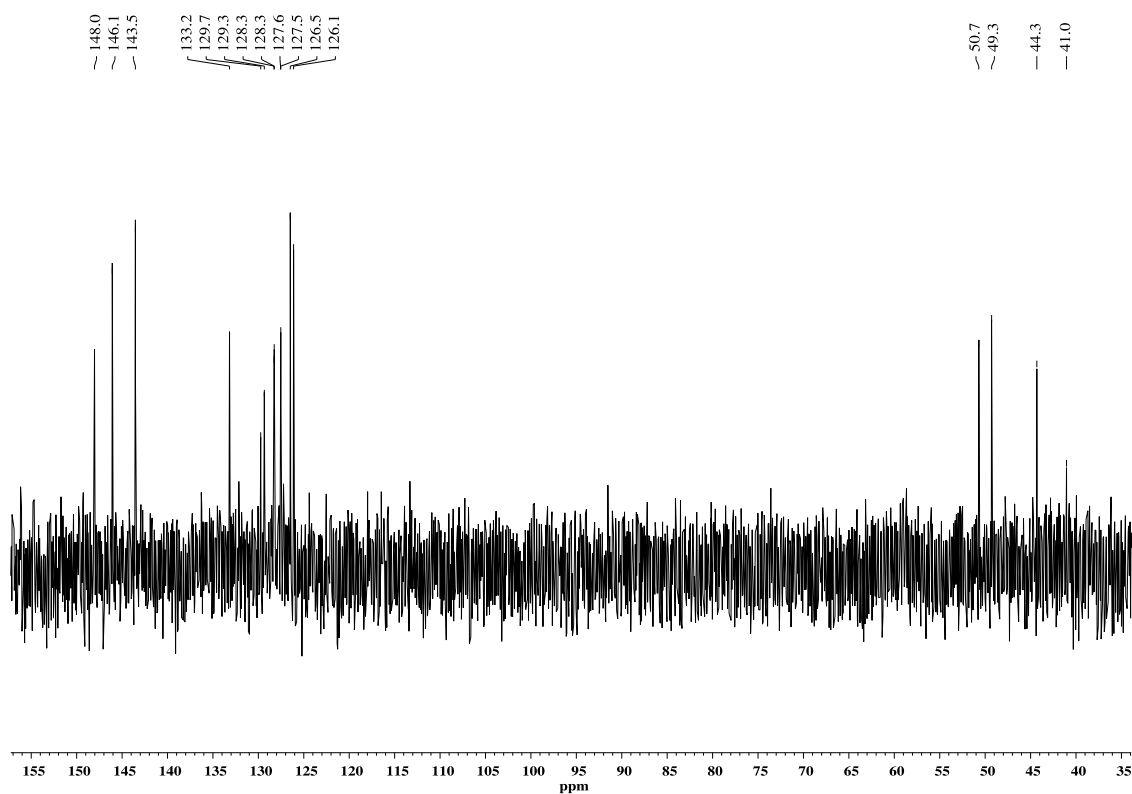


Figura A2.21. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1a.

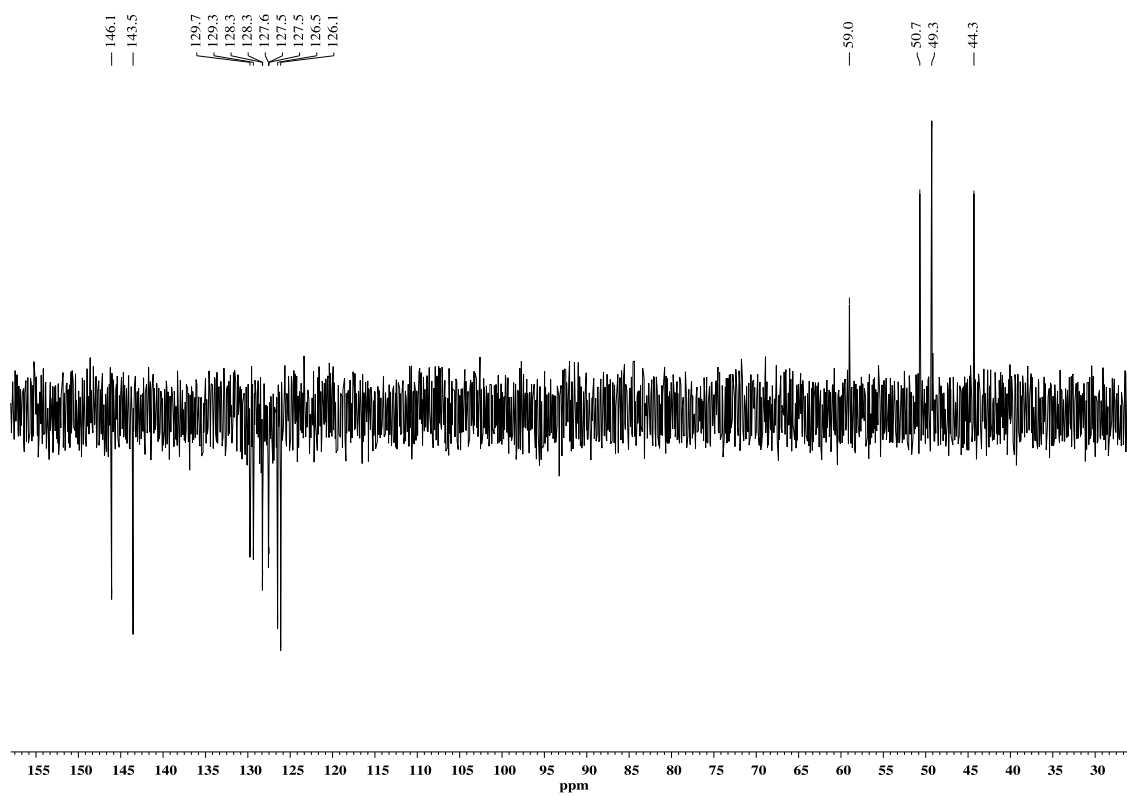


Figura A2.22. Espectro DEPT del compuesto L1a.

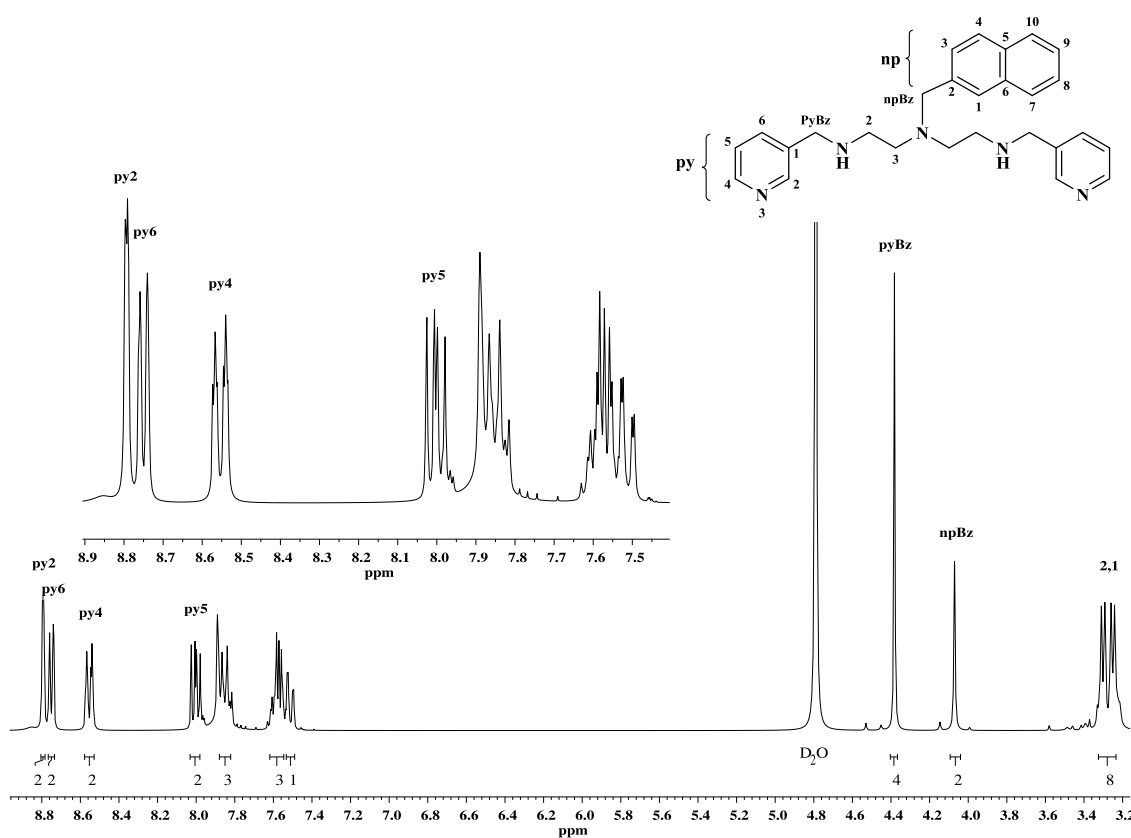


Figura A2.23. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1b.

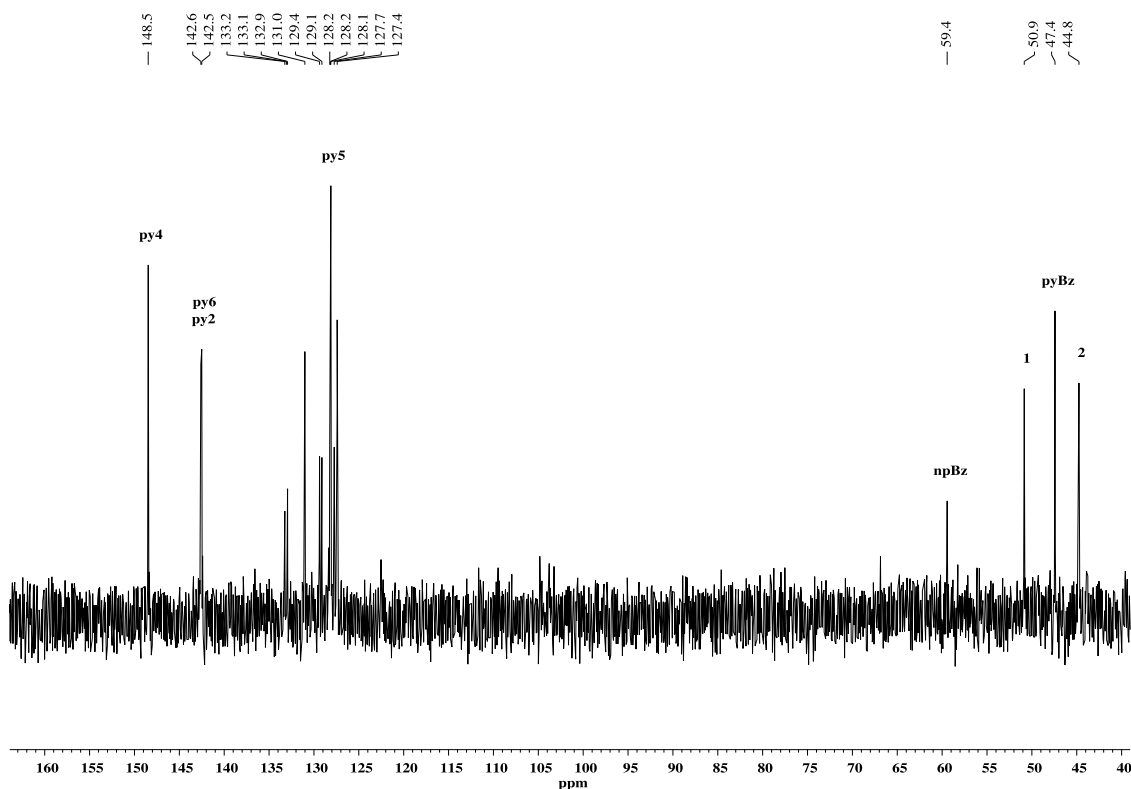


Figura A2.24. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1b.

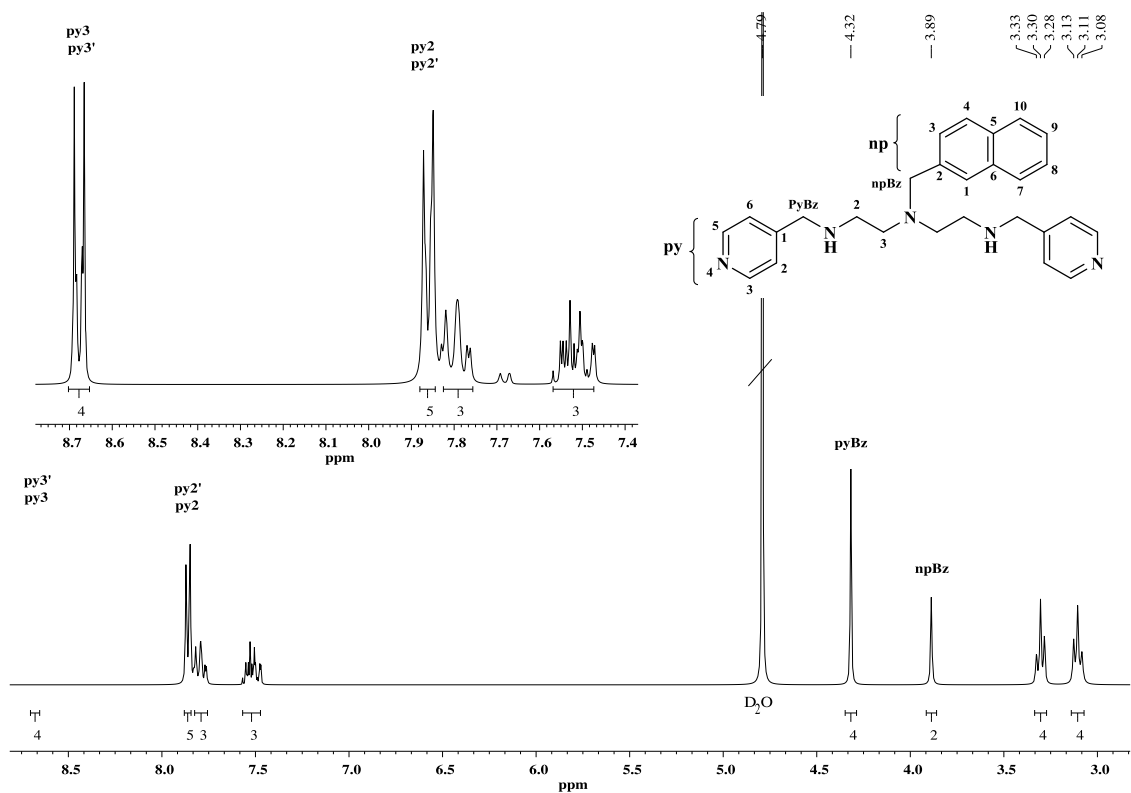


Figura A2.25. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1c.

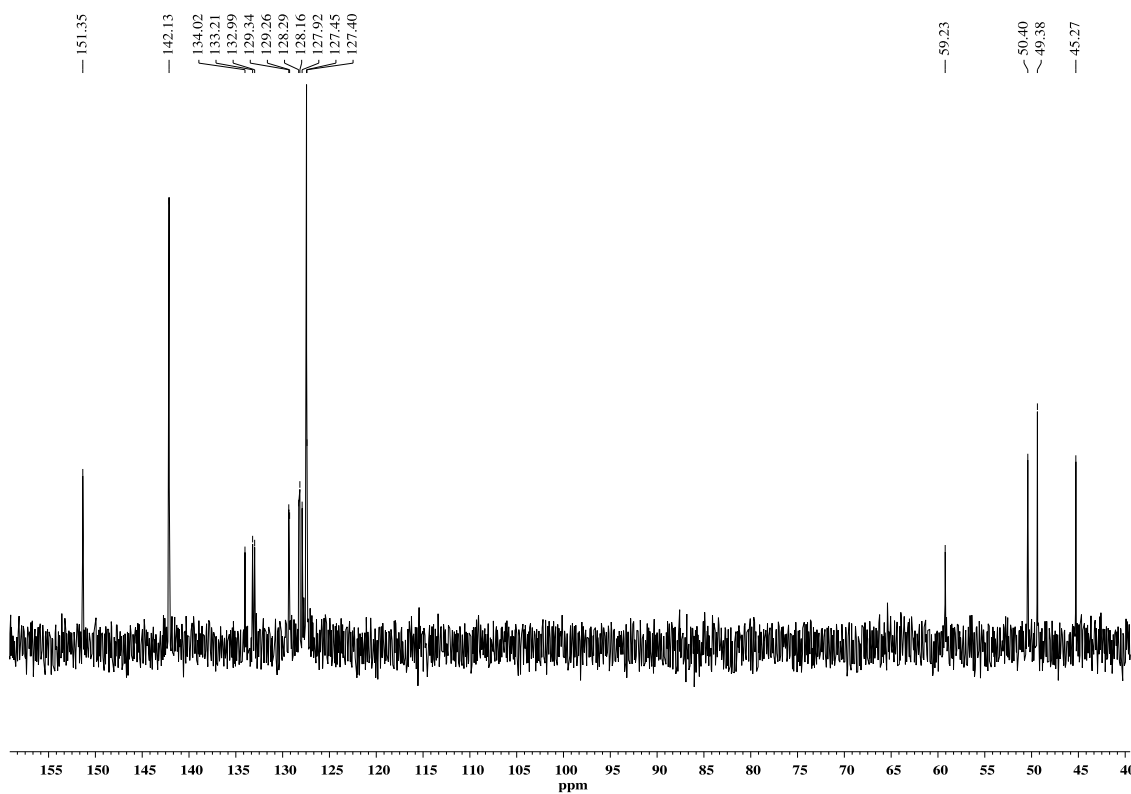


Figura A2.26. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1c.

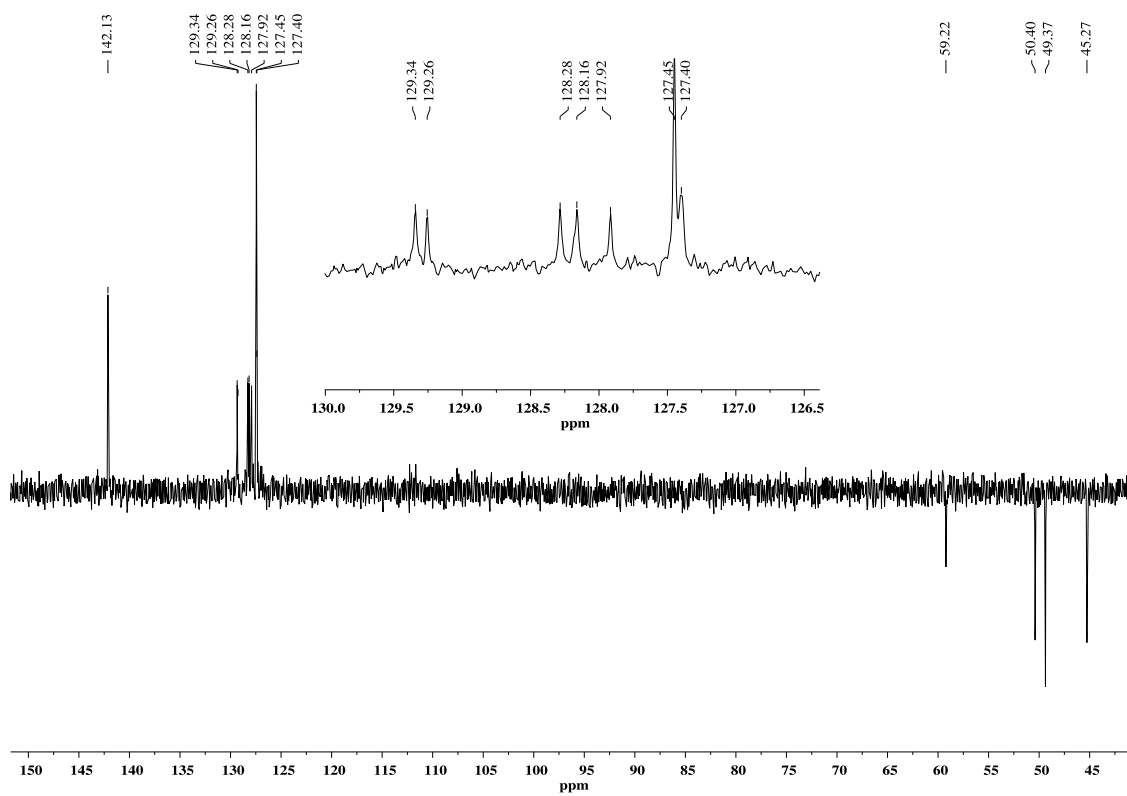


Figura A2.27. Espectro DEPT del compuesto L1c.

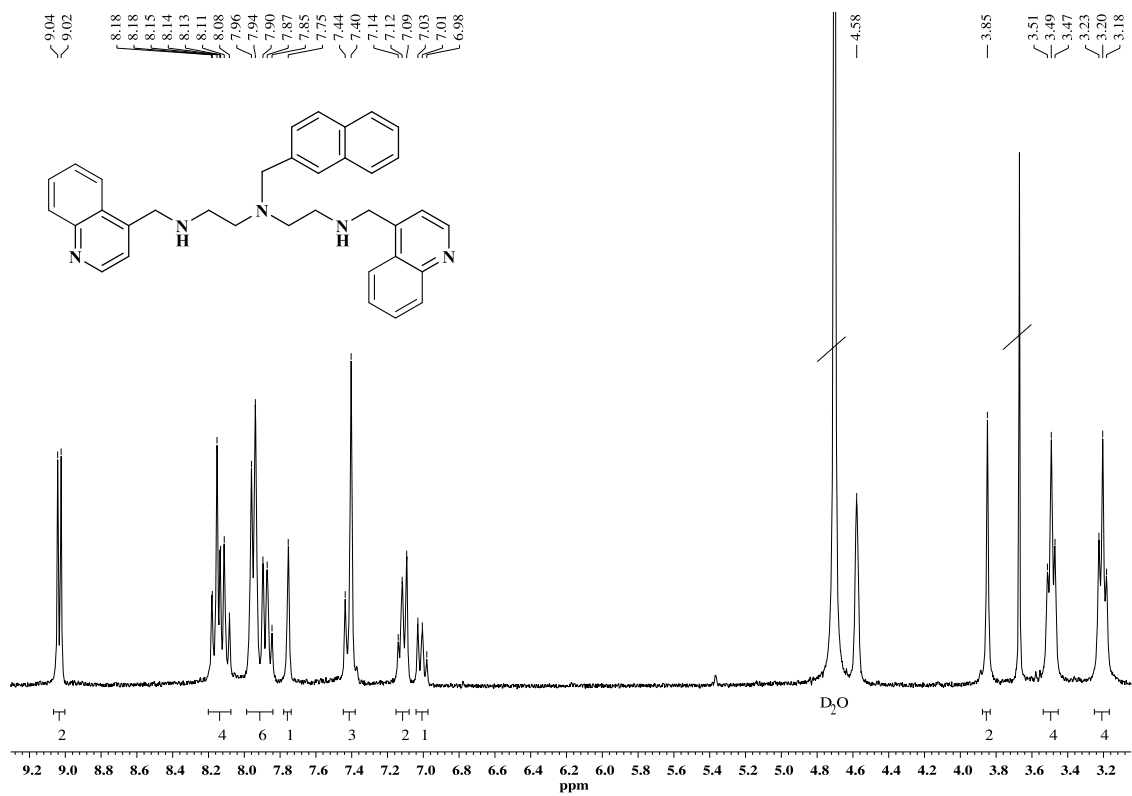


Figura A2.28. Espectro de RMN ¹H del compuesto L1d.

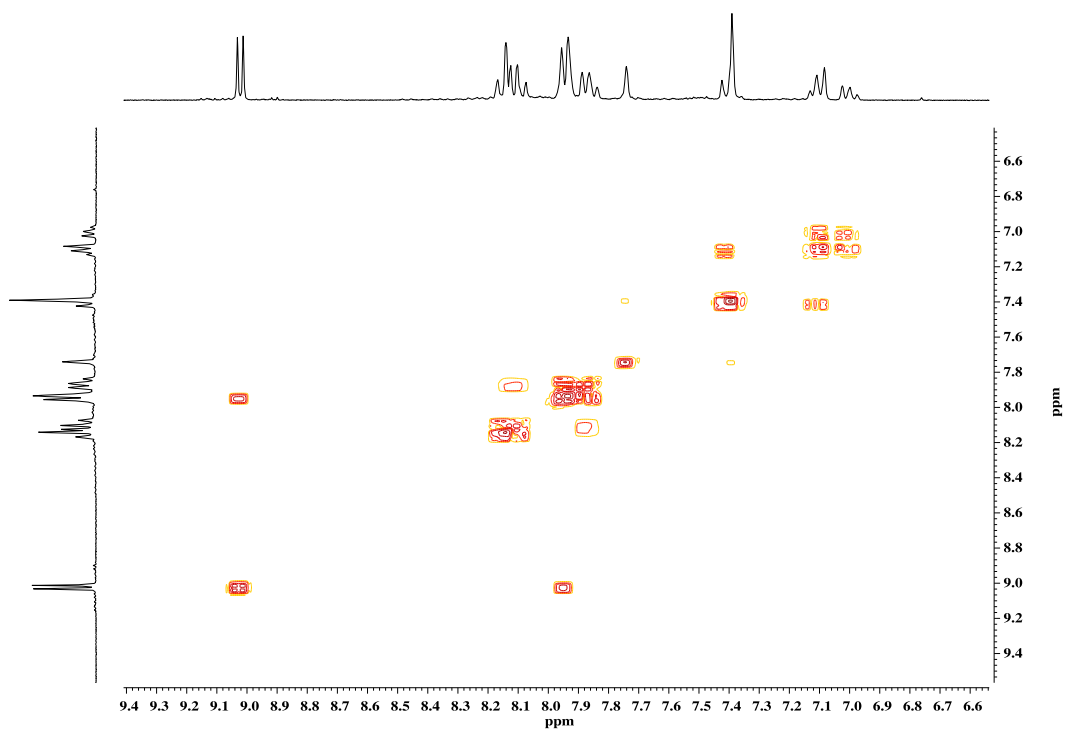


Figura A2.29. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ¹H-¹H COSY de L1d.

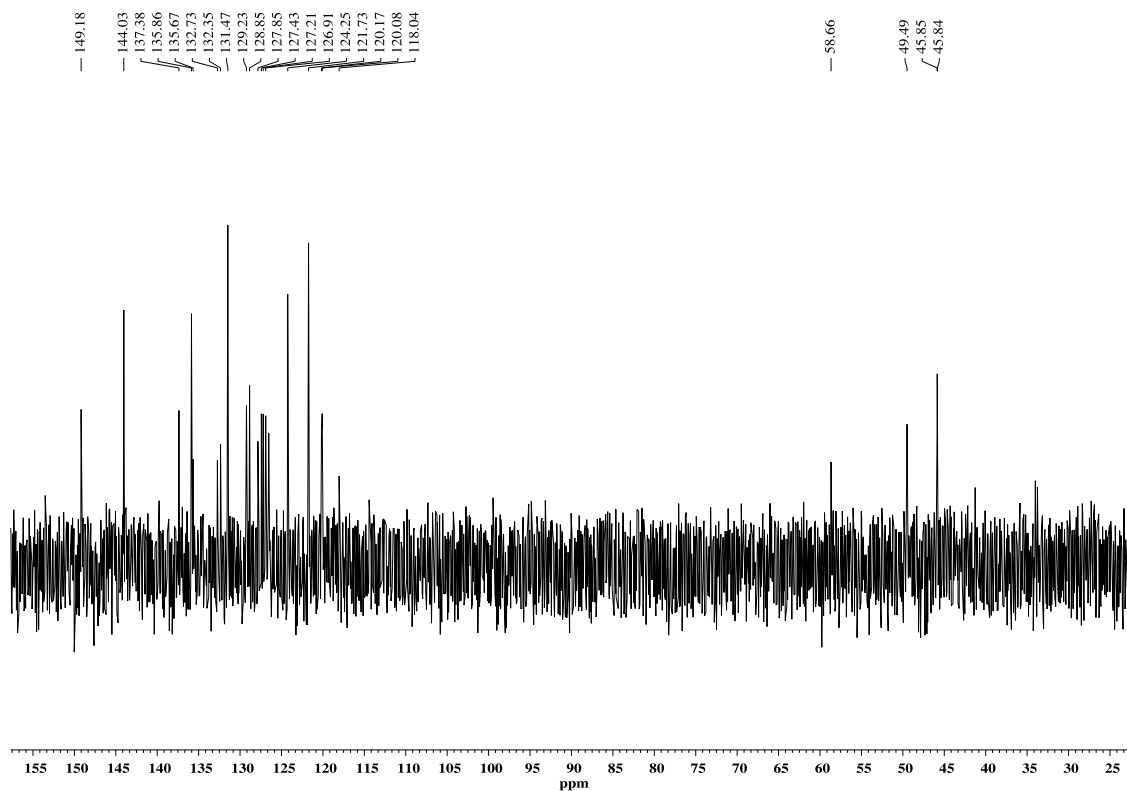


Figura A2.30. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1d.

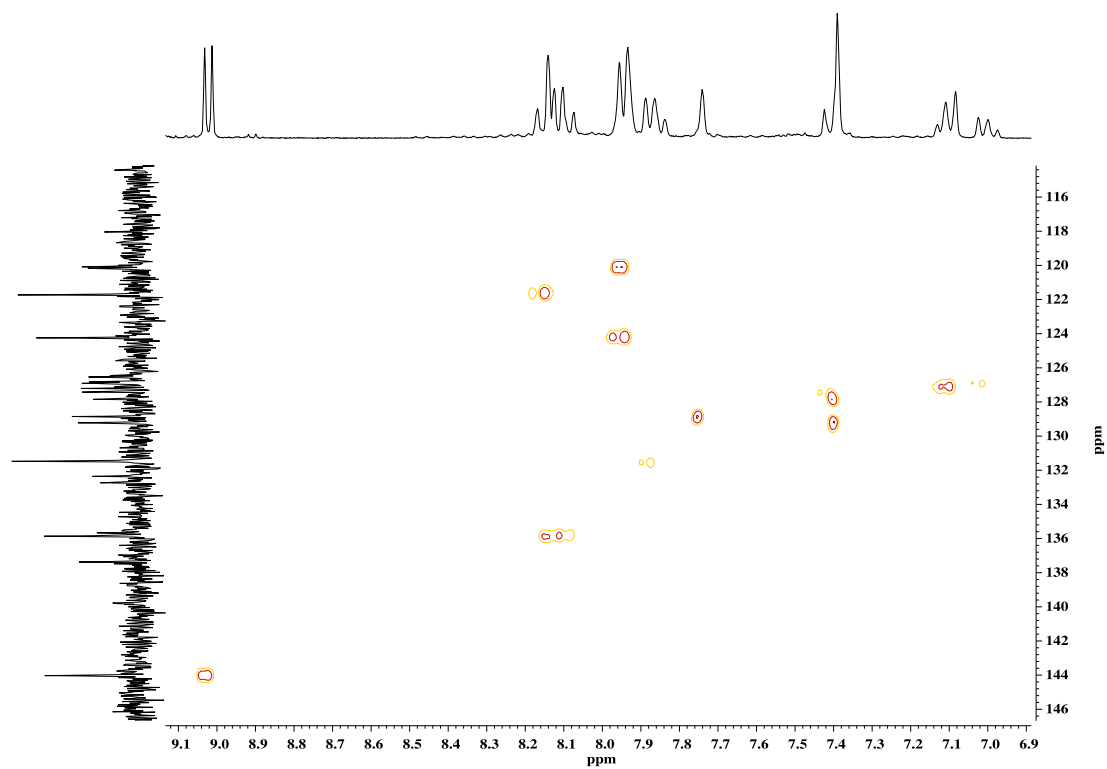


Figura A2.31. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L1d.

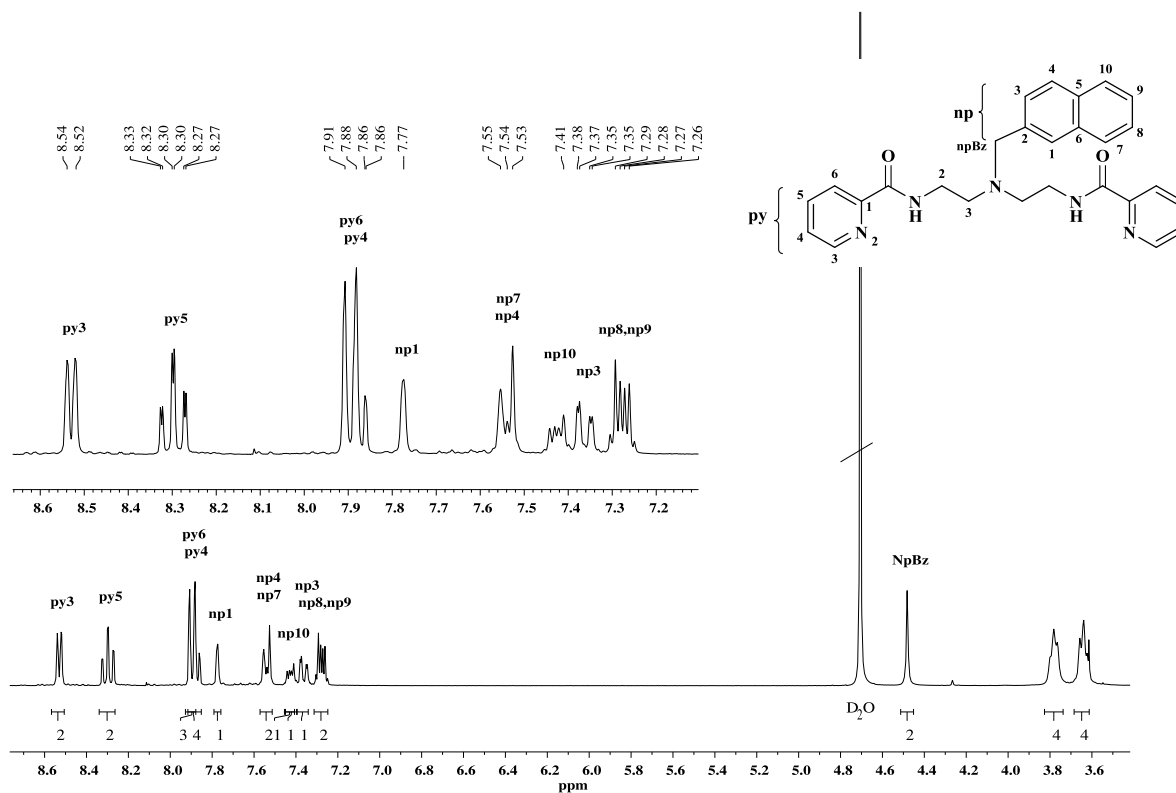


Figura A2.32. Espectro de RMN ^1H del compuesto L1e.

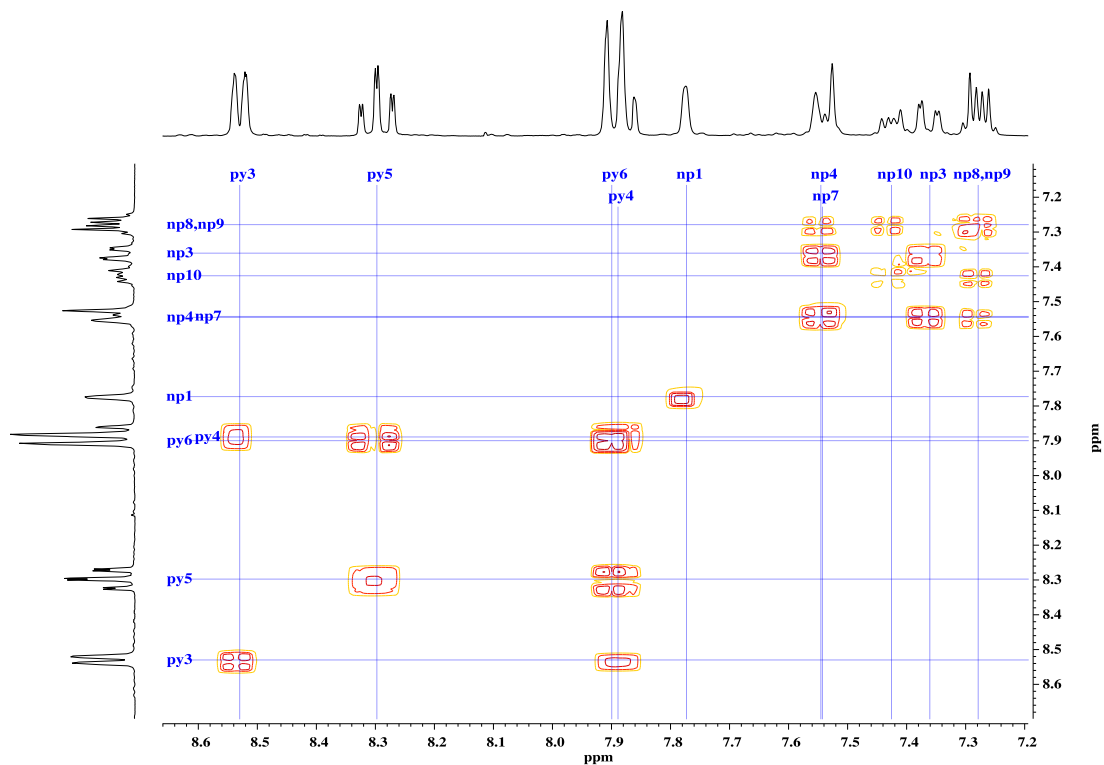


Figura A2.33. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L1e.

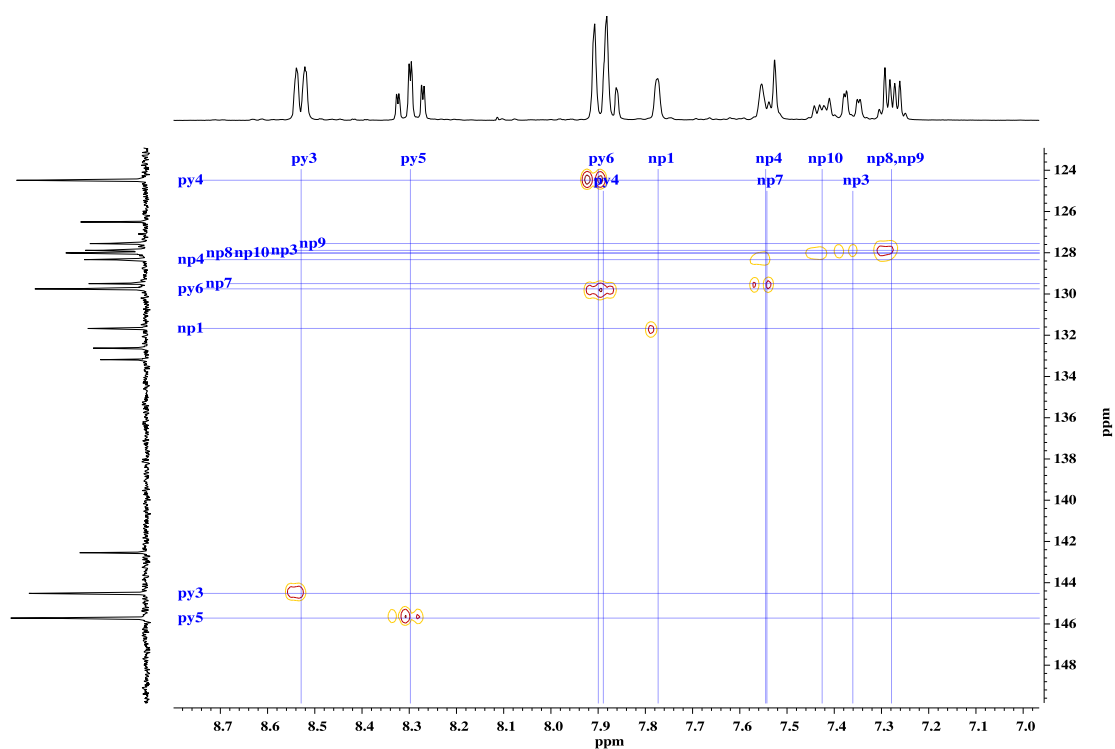


Figura A2.34. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L1e.

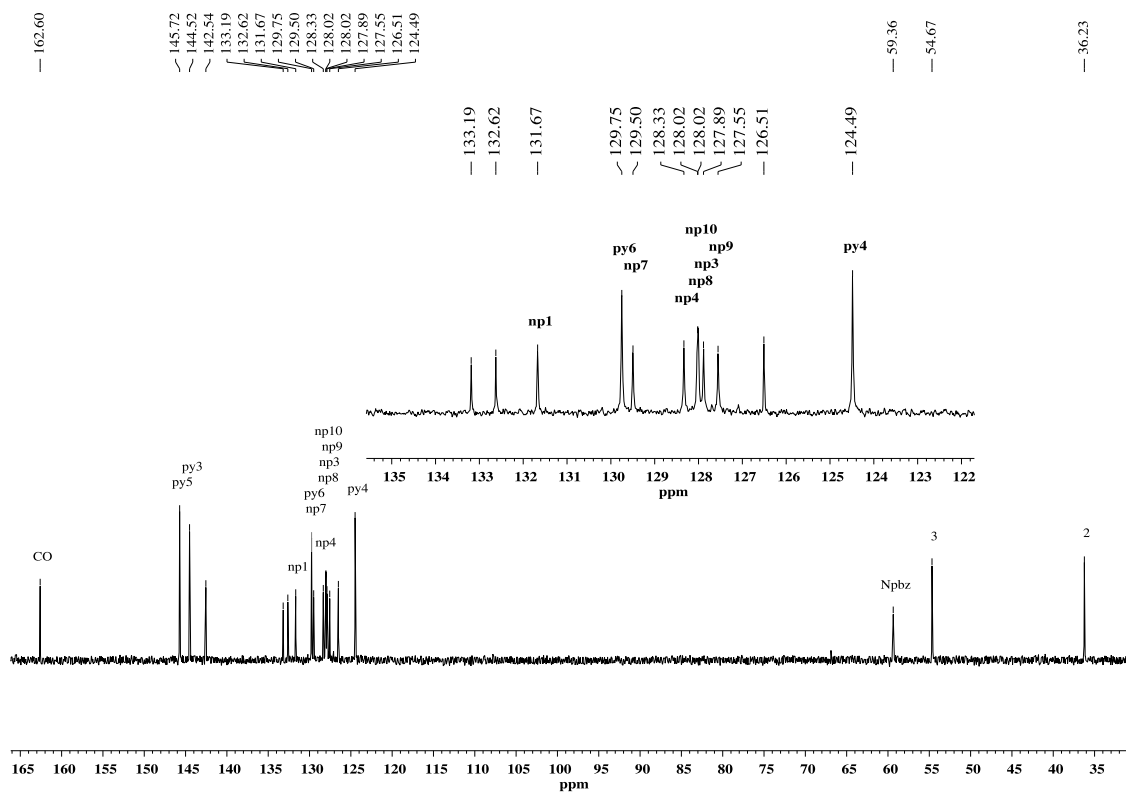


Figura A2.35. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L1e.

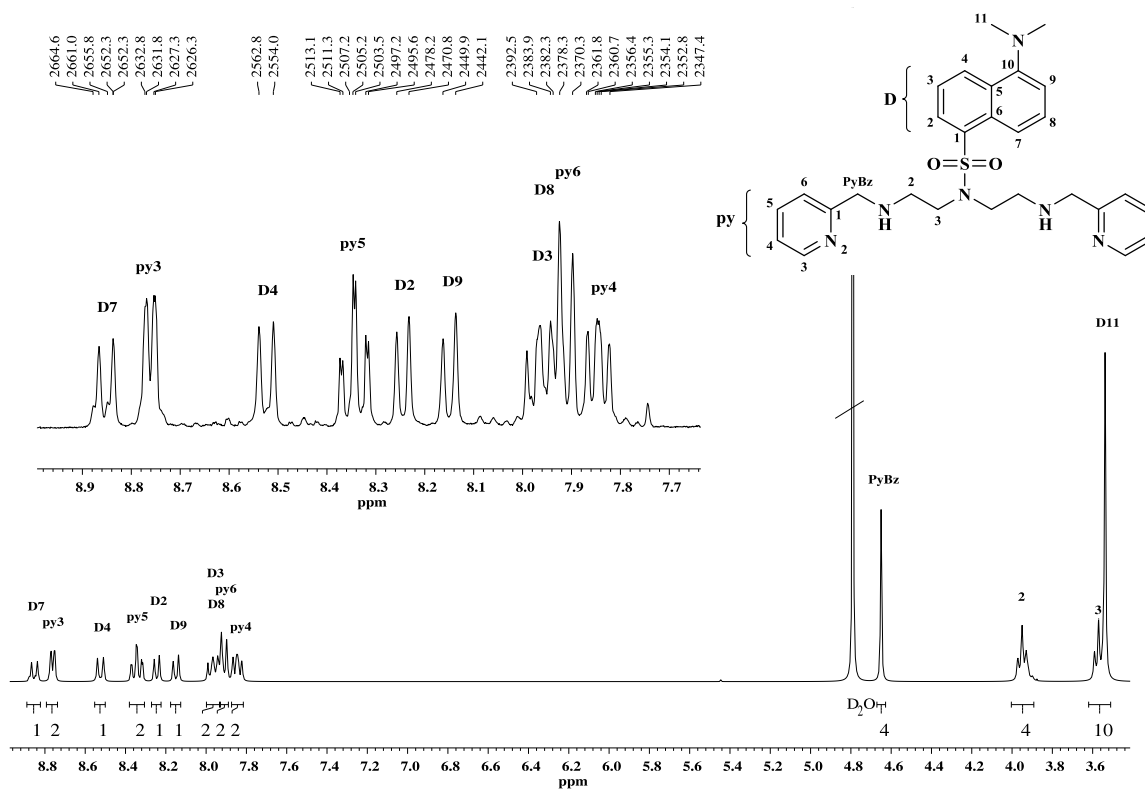


Figura A2.36. Espectro de RMN ¹H del compuesto L2a.

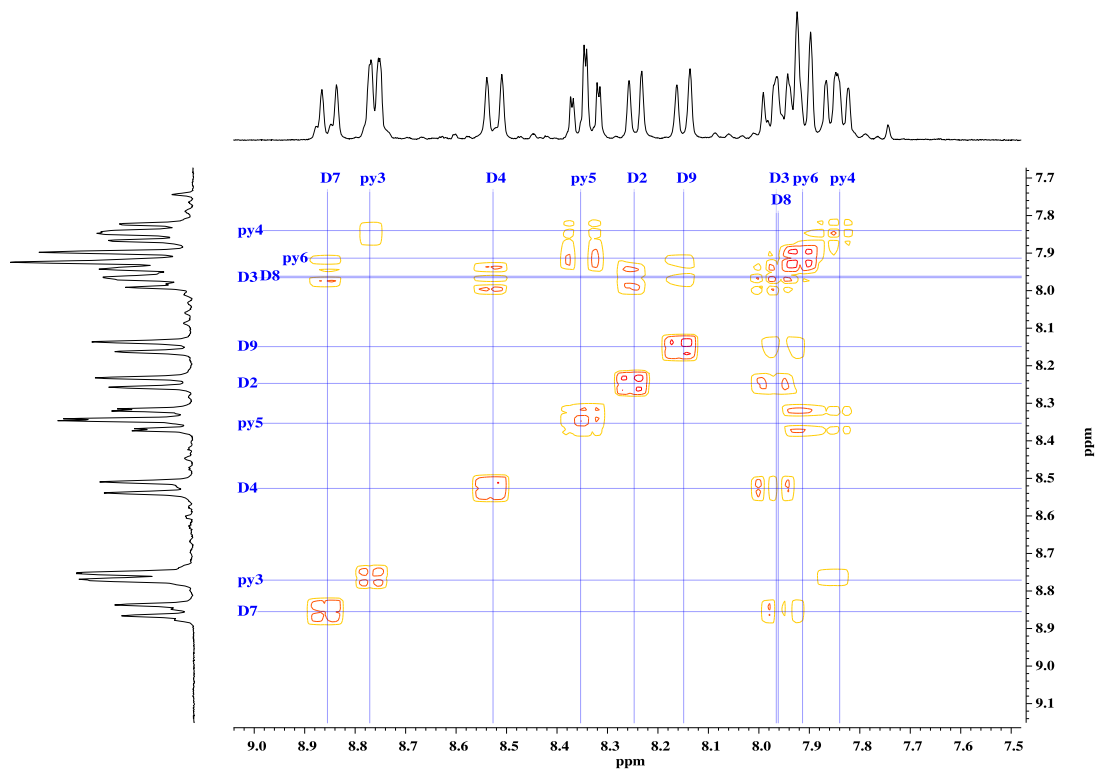


Figura A2.37. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ¹H-¹H COSY de L2a.

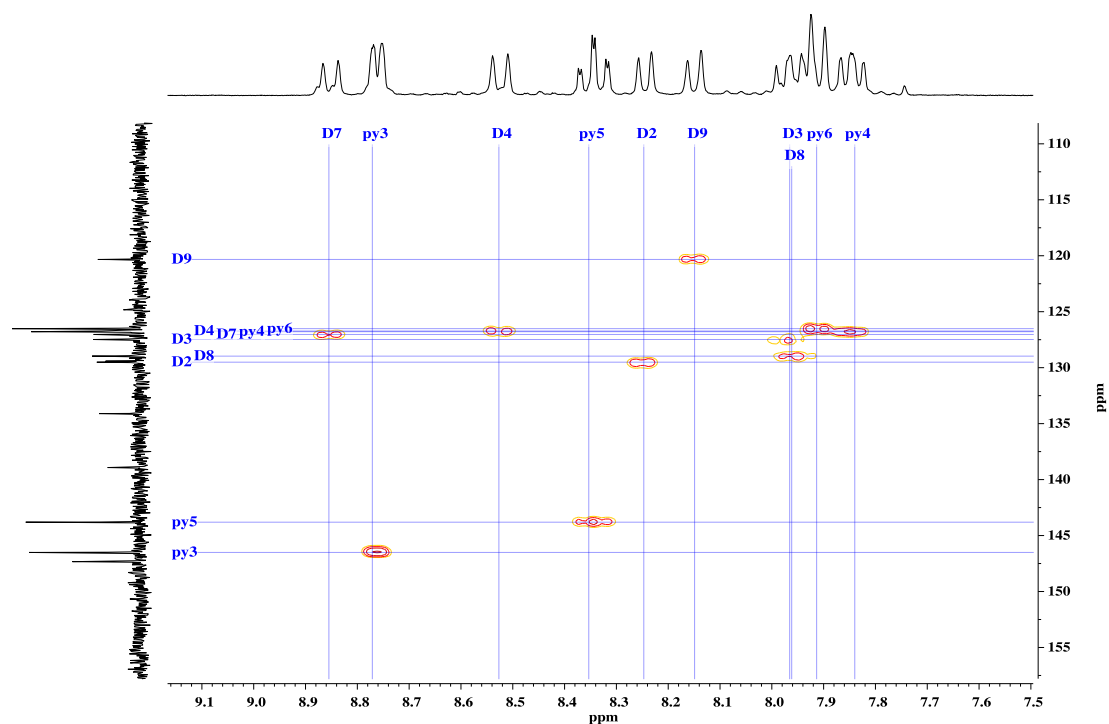


Figura A2.38. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L2a.

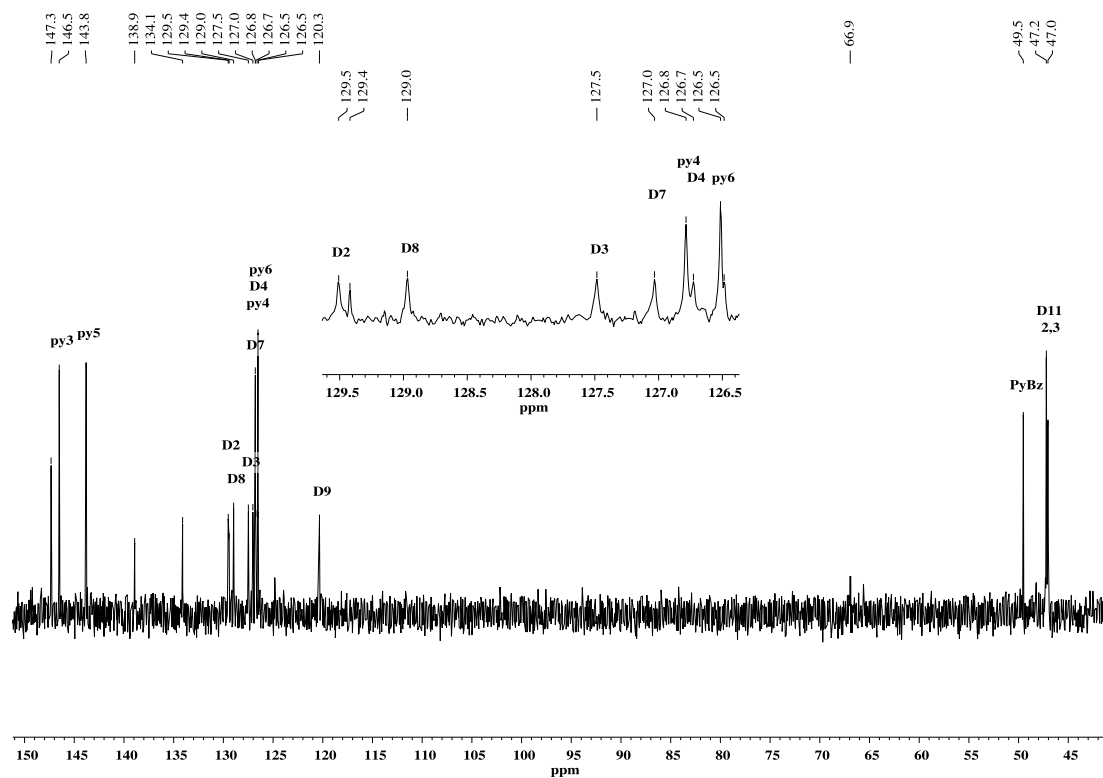


Figura A2.39. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L2a.

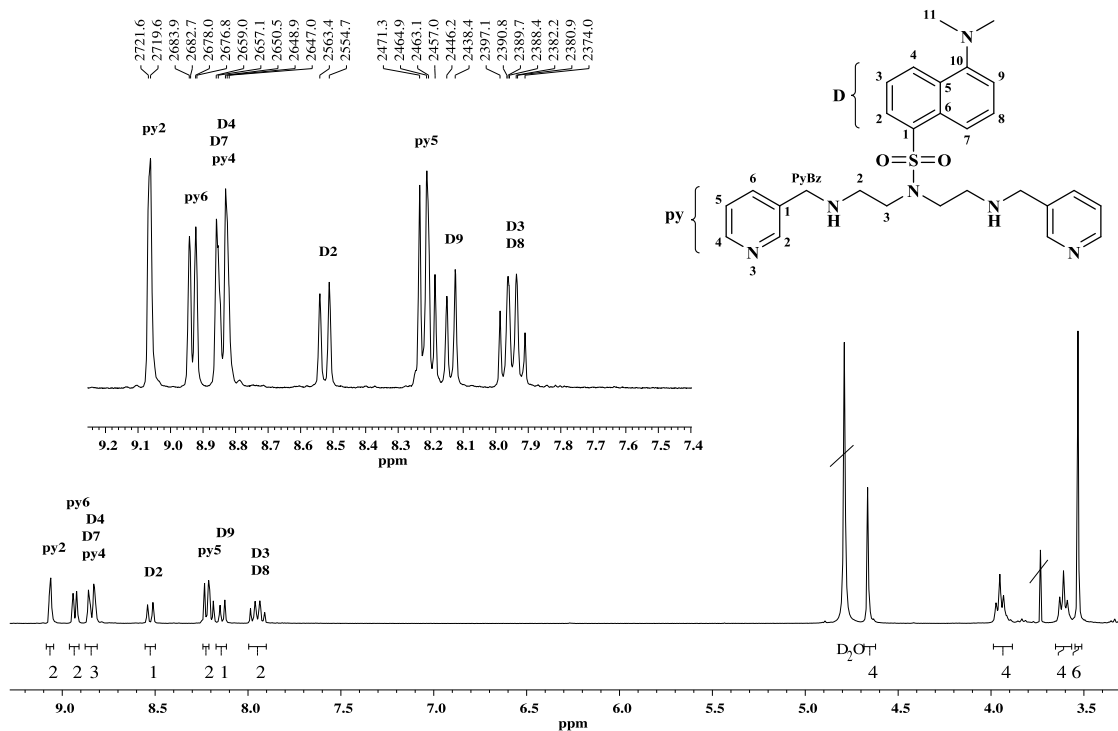


Figura A2.40. Espectro de RMN ^1H del compuesto L2b.

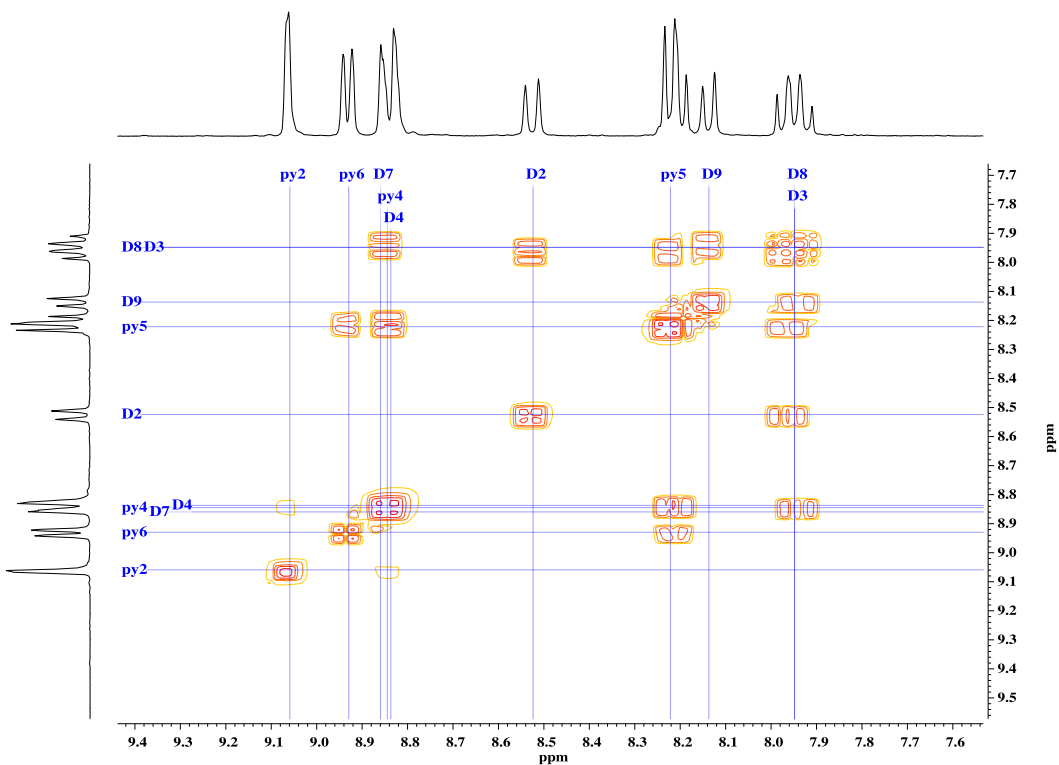


Figura A2.41. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L2b.

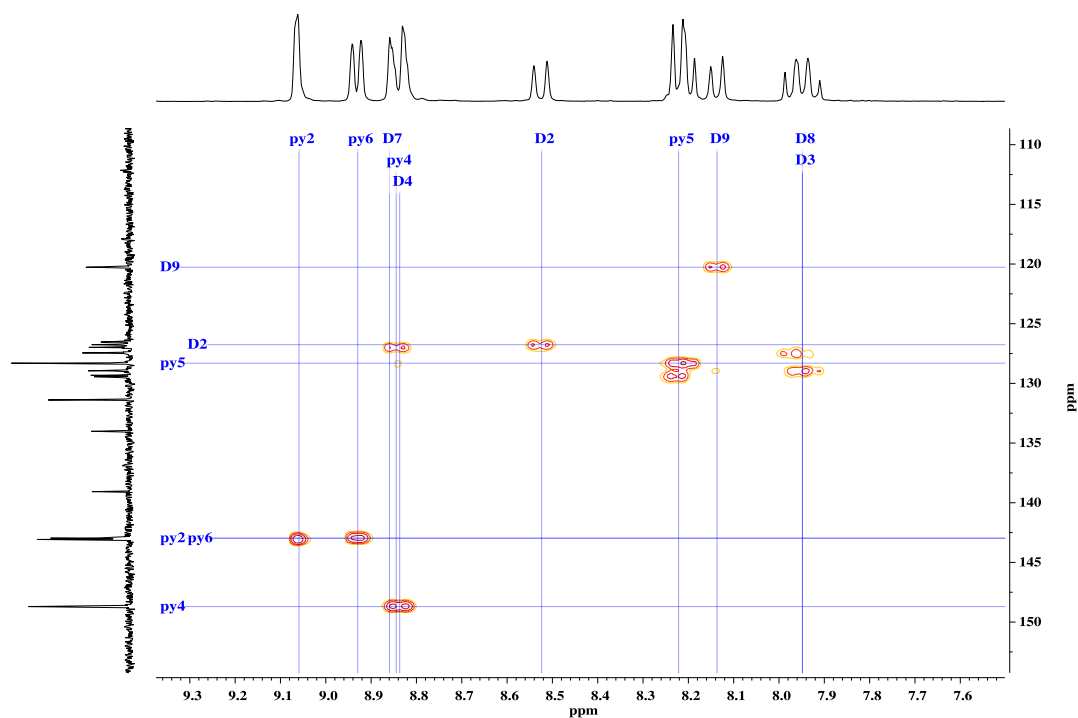


Figura A2.42. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de **L2b**.

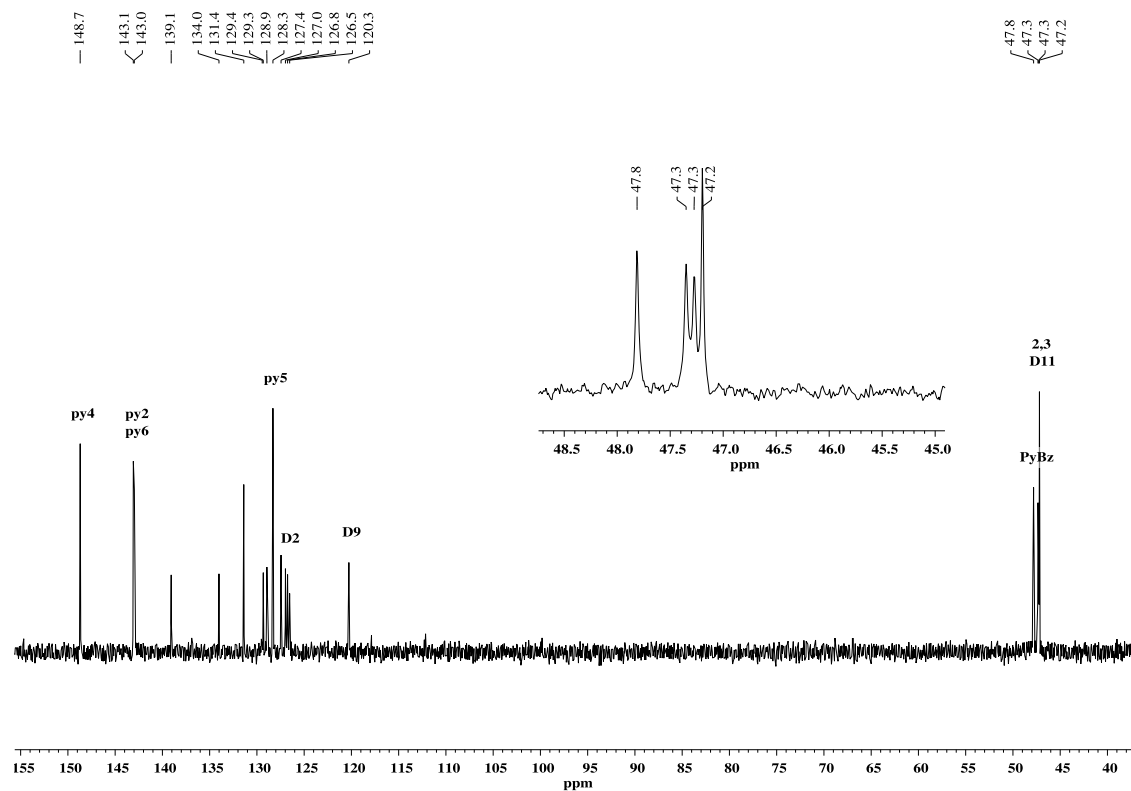


Figura A2.43. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **L2b**.

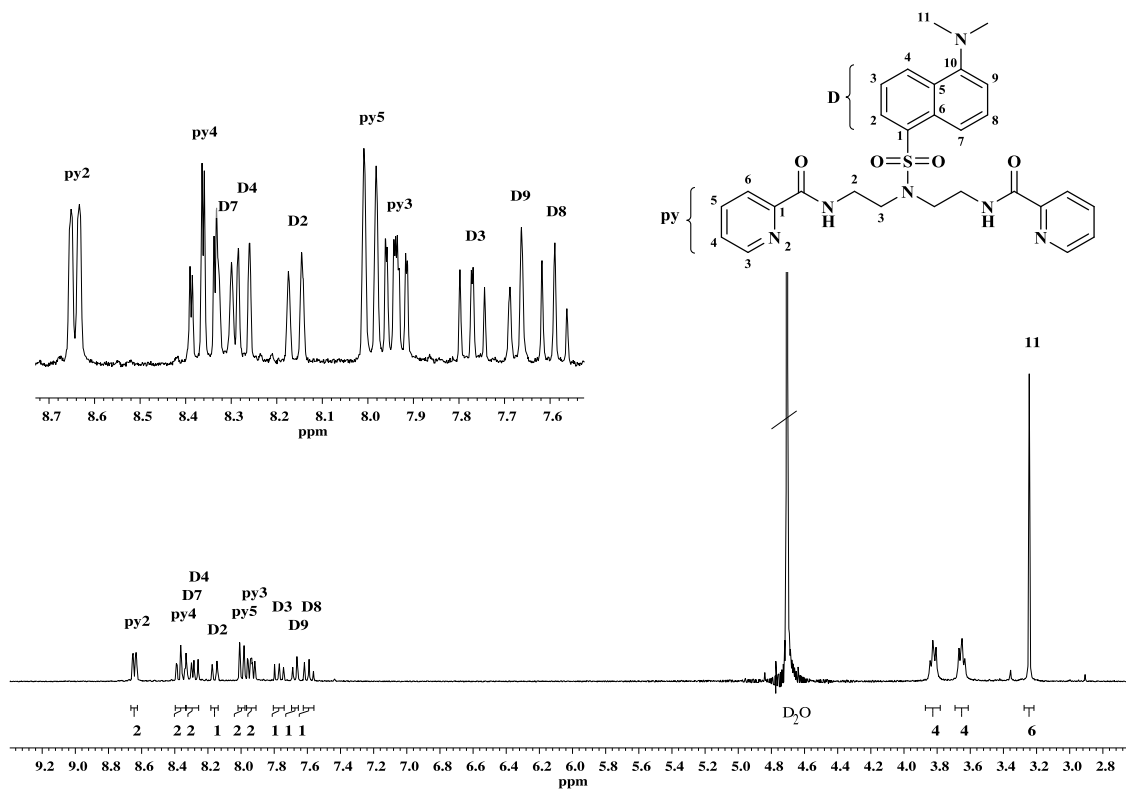


Figura A2.44. Espectro de RMN ^1H del compuesto L2e.

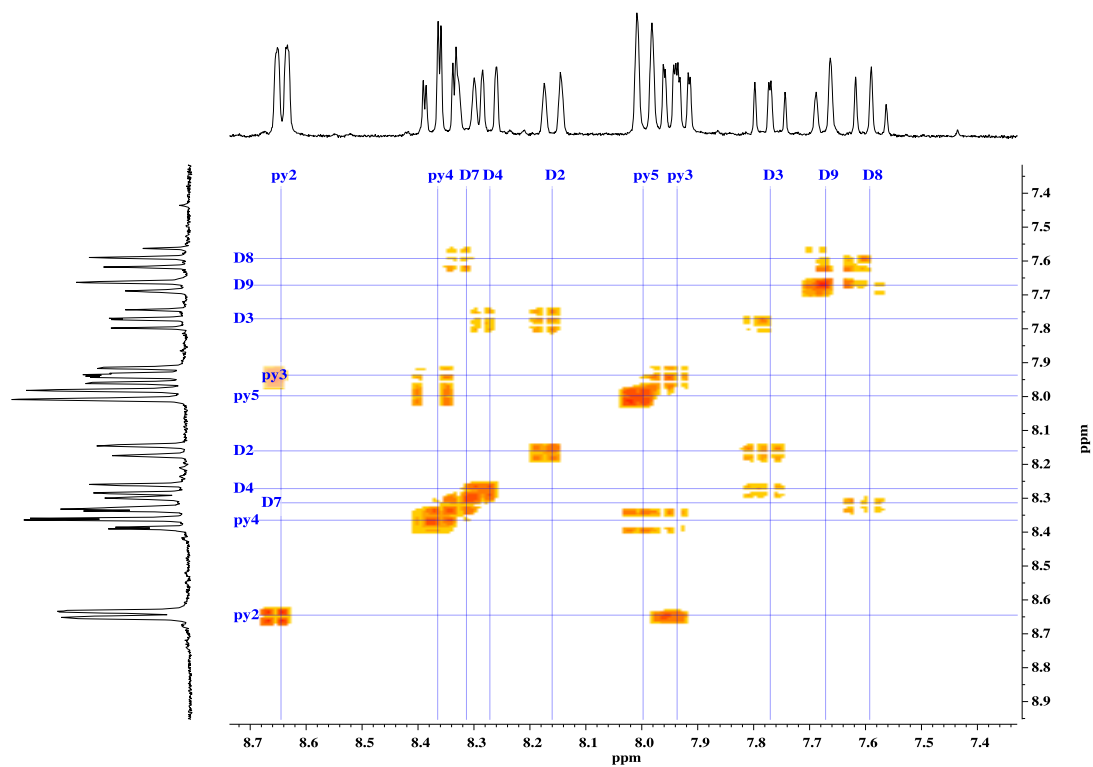


Figura A2.45. Ampliaciones del espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H COSY de L2e.

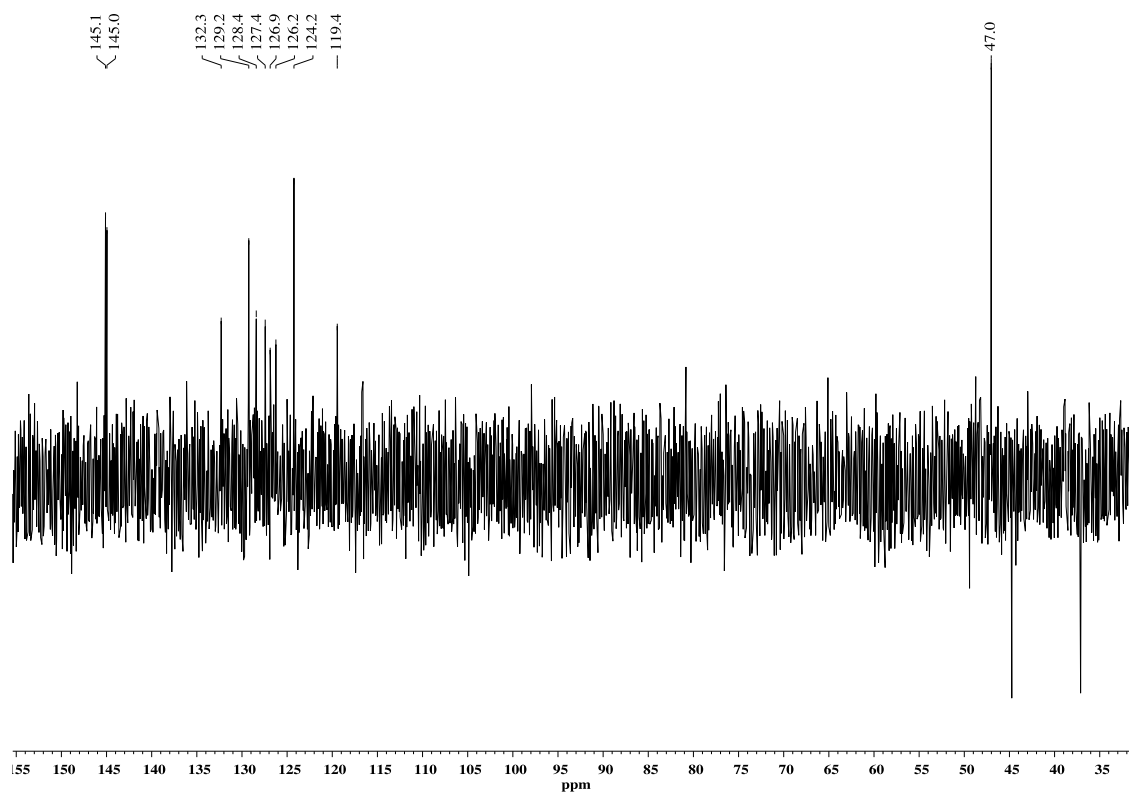


Figura A2.46. Espectro DEPT del compuesto L2e.

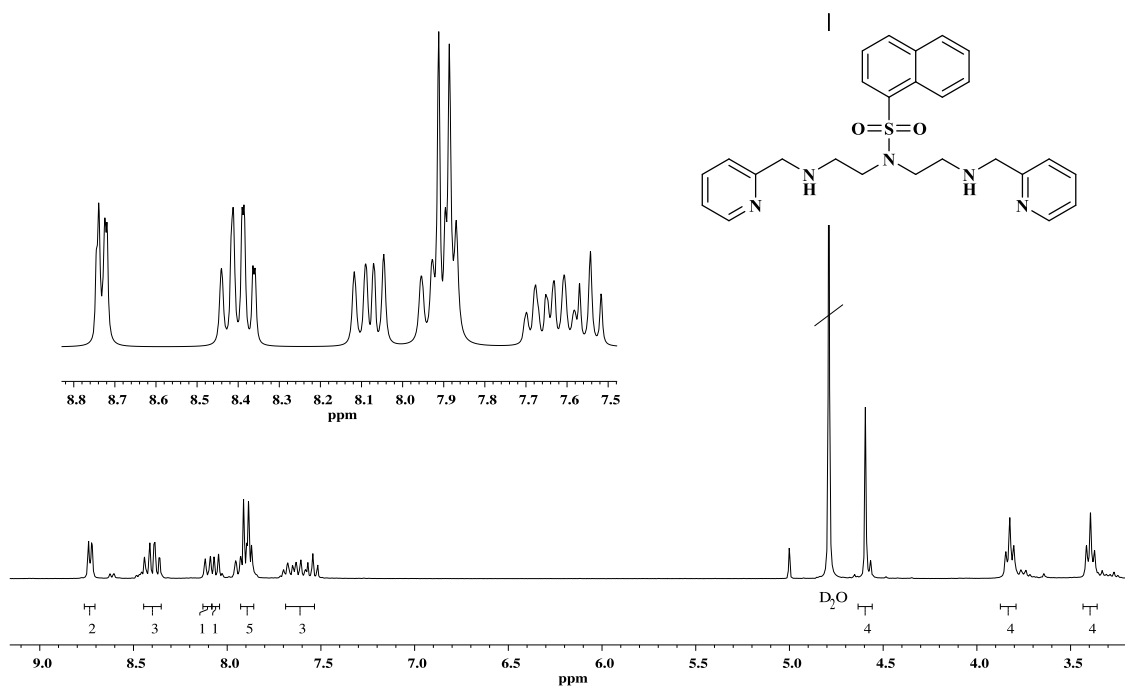


Figura A2.47. Espectro de RMN ^1H del compuesto L3a.

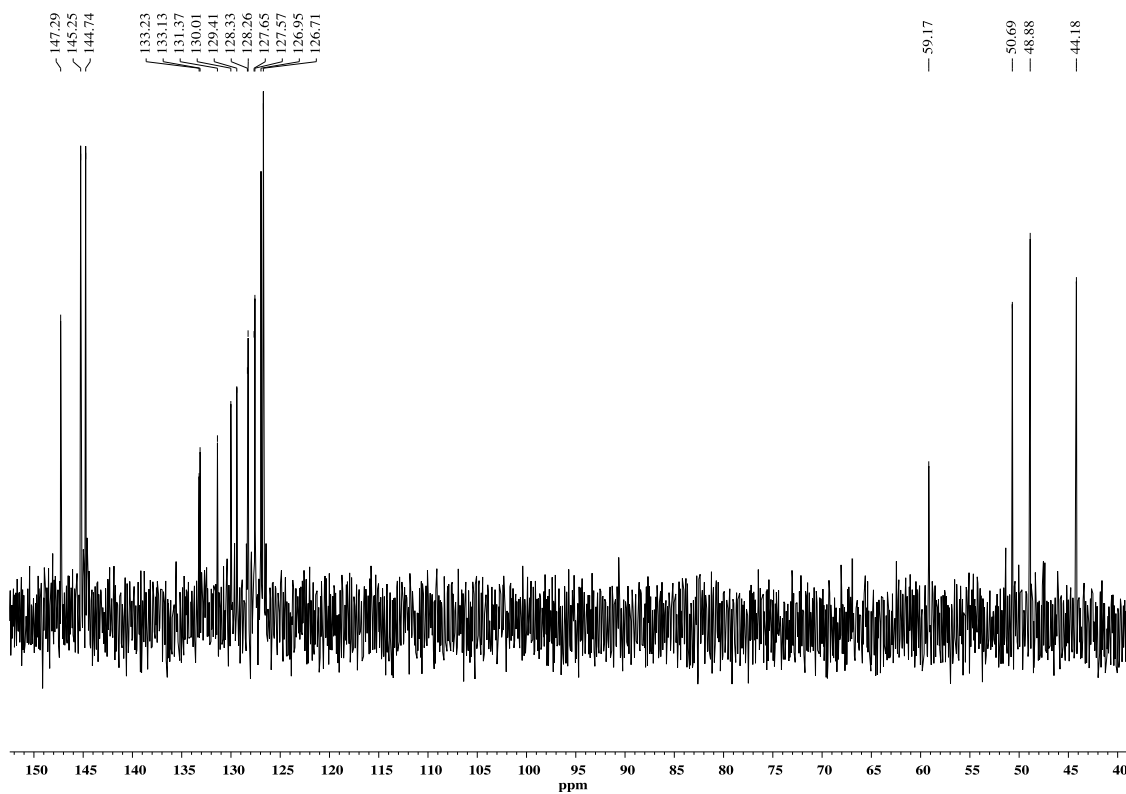


Figura A2.48. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L3a.

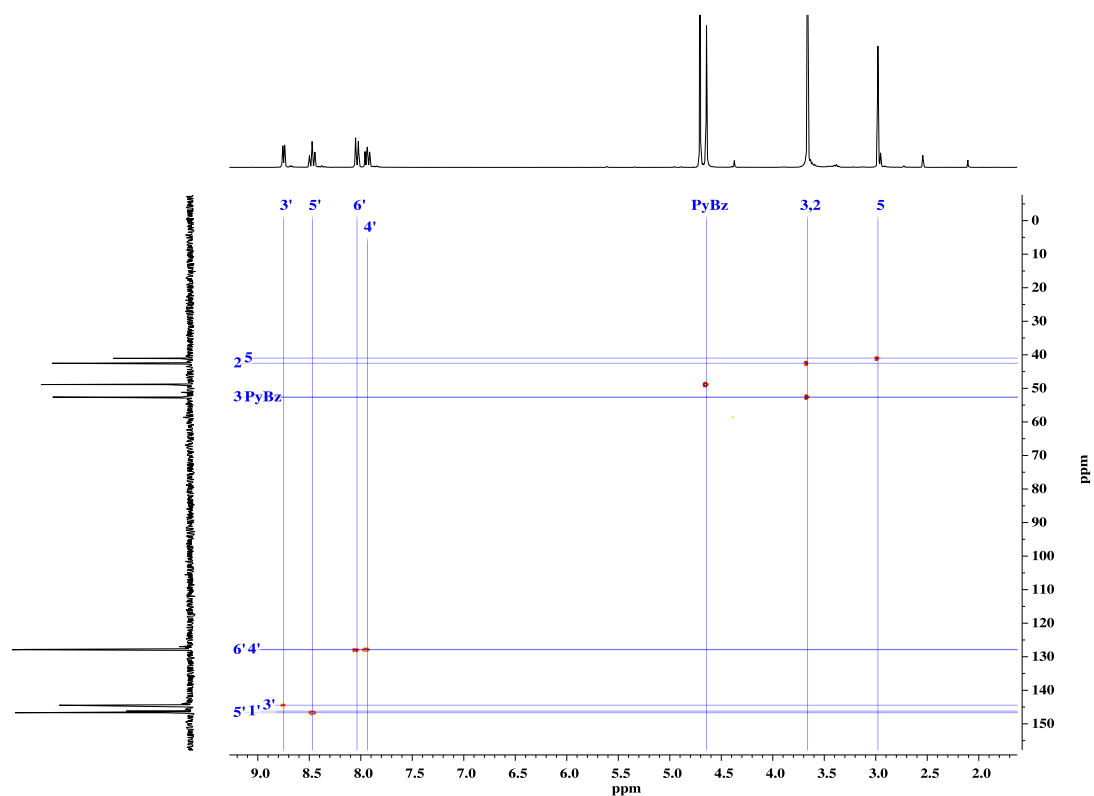


Figura A2.51. Ampliaciones del espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC de L4a.

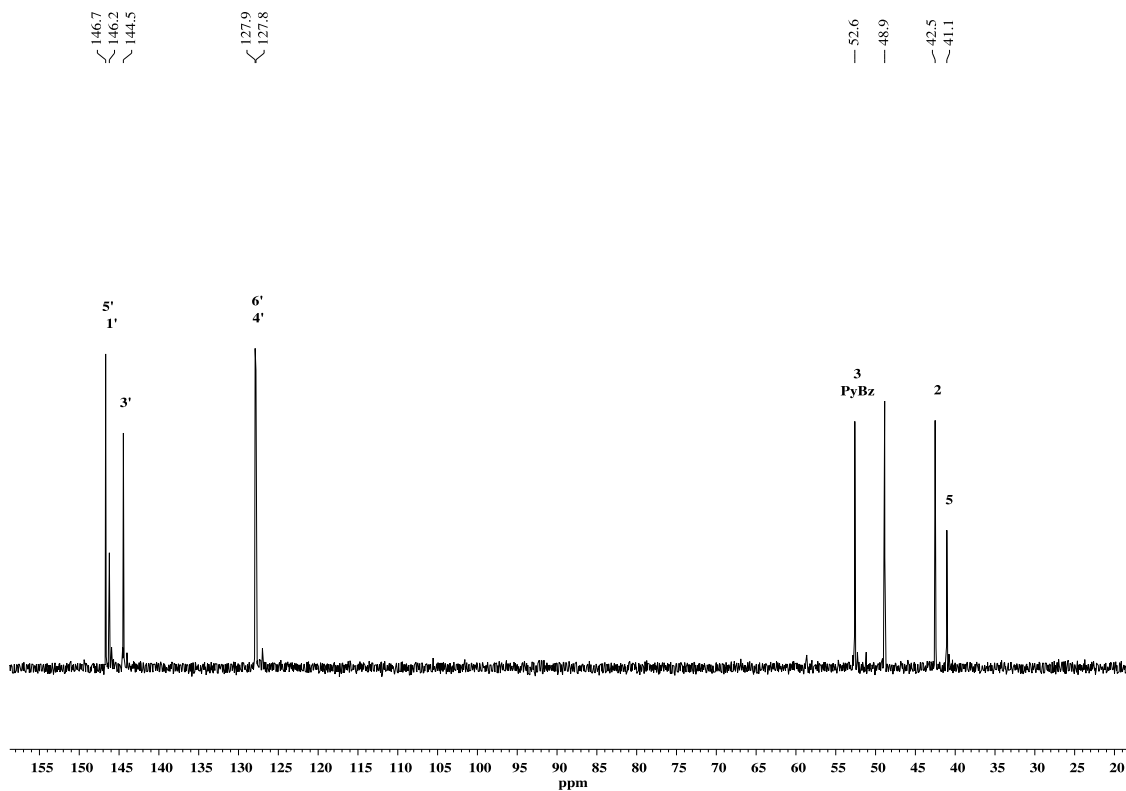


Figura A2.52. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L4a.

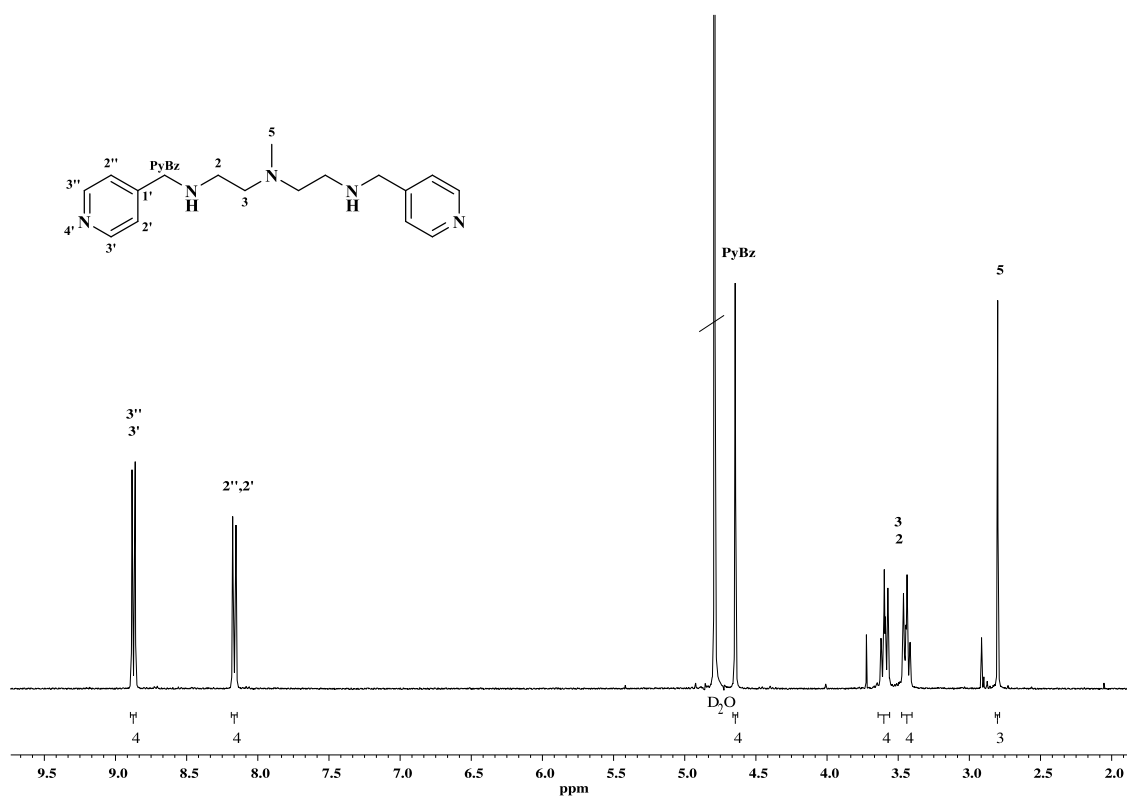


Figura A2.53. Espectro de RMN ^1H del compuesto L4c.

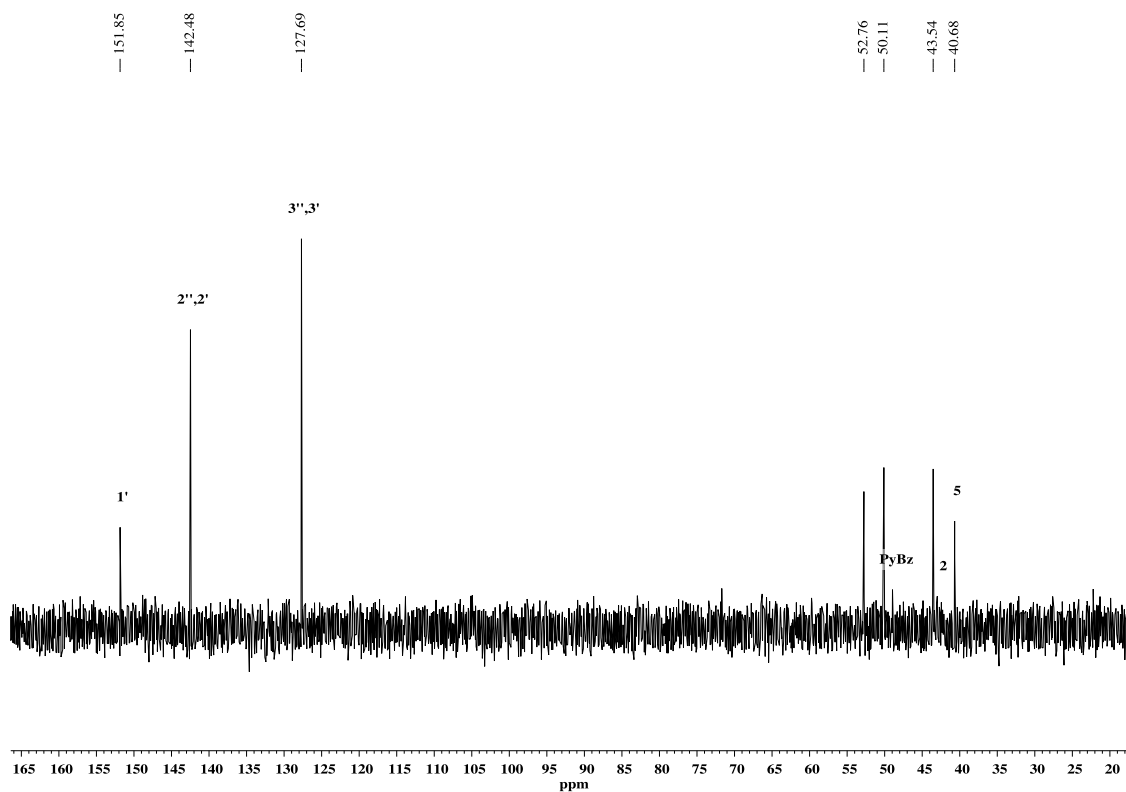


Figura A2.54. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto L4c.

ANEXO-3. PUBLICACIONES



Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities

Pablo Bilbao-Ramos^a, Cristina Galiana-Roselló^b, M. Auxiliadora Dea-Ayuela^{a,b}, Marta González-Alvarez^c, Celeste Vega^d, Miriam Rolón^d, Jorge Pérez-Serrano^e, Francisco Bolás-Fernández^a, M. Eugenia González-Rosende^{b,*}

^a Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, University Complutense of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040-Madrid, Spain

^b Department of Chemistry, Biochemistry and Molecular Biology, University CEU-Cardenal Herrera, Avda. Seminario s/n, 46113-Moncada, Spain

^c Faculty of Pharmacy, University Miguel Hernández of Elche, Ctra. Nacional 332 s/n, 03550-Sant Joan D'Alacant, Spain

^d Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Pai Perez 165 c/ Mariscal Estigarribia, Asunción, Paraguay

^e Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University Alcalá de Henares, Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600, 28871-Alcalá de Henares, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2012

Received in revised form 9 May 2012

Accepted 10 May 2012

Available online 2 June 2012

Keywords:

Leishmania spp.

Trypanosoma cruzi

Electron microscopy

Nuclease activity

Sulfonamides

ABSTRACT

Our aim was to evaluate the *in vitro* efficacy of a series of *N*-benzenesulfonamides of amine substituted aromatic rings, sulfonamides **1–6**, against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. and to compare their trypanocidal and leishmanicidal profile. In order to elucidate the probable mechanism of action, the interaction of selected sulfonamides with pUC18 plasmid DNA was investigated by nuclease activity assays. In addition, the cellular targets of these sulfonamides in treated parasites were also searched by transmission and scanning electron microscopy. The most active compounds 4-nitro-*N*-pyrimidin-2-ylbenzenesulfonamide **1a** and 4-chloro-*N*-5-methyl-thiazol-2-yl-benzenesulfonamide **2d** displayed significant *in vitro* activity against *Leishmania* spp. promastigotes, without toxicity to J774 macrophages. Selected sulfonamides **1a**, 4-nitro-*N*-pyrazin-2-yl-benzenesulfonamide **1n** and **2d** were also active against *Leishmania infantum* intracellular amastigotes. Compounds **1n** and **2d** showed nuclease activity in the presence of copper salt analogous to our previous results with sulfonamide **1a**. Mechanistic data reveal the involvement of a redox process. Evidence for the formation of reactive oxygen species (ROS) responsible for DNA strand scission is provided for sulfonamides **1a**, **1n** and **2d**. Transmission electron microscopic (TEM) analysis of *L. infantum* promastigotes treated with compounds **1a**, **1n** and **2d** shows an overall cellular disorganization effects which are mainly addressed to DNA bearing structures such as the nucleus, mitochondria and kinetoplast. Disruption of double nuclear membrane and loss of cellular integrity along with accumulation of cytoplasmic electrodense bodies were also frequently observed.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Protozoa of the order Kinetoplastida are the causative agents of a number of human and animal diseases including Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) and leishmaniasis (*Leishmania* spp.) [1]. These infections have a large disease burden [2,3]. However, few therapeutic agents are currently available. Moreover, many of them produce adverse side effects, in certain cases with high toxicity, require inconvenient routes of administration, long-term treatments and show low activity in immunosuppressed patients [4–6]. In addition, the widespread development of resistance by some parasite strains such as *T. cruzi* resistant to benznidazole and nifurtimox and *Leishmania* to antimonial compounds constitutes an important health problem [7,8]. Therefore there is an urgent need for the

discovery of new therapeutics displaying antitrypanosomal and leishmanicidal activities [9,10].

It is well-known that the sulfonamide pharmacophore is an important structural core in medicinal chemistry that shows a broad spectrum of pharmacological activities. Several compounds containing the sulfonamide scaffold have been used as antimicrobial drugs [11,12], diuretics [13,14], hypoglycemics [15,16], antithyroid agents [17], antitumor [18–21], antiviral drugs [22–24] and a number of other biological activities. In addition, the antiparasitic activity of several benzenesulfonamides has been reported [25–33]. Thus *in vitro* anti-leishmanial and trypanocidal effects of compounds containing the sulfonamido moiety have been shown [34–44]. However, a limited number have been tested in a murine animal model and neither of them displayed significant *in vivo* activity. In this context, we have previously demonstrated the anti-leishmanial *in vivo* efficacy of 4-nitro-*N*-pyrimidin-2-ylbenzenesulfonamide **1a** and 4-nitro-*N*-pyrazin-2-yl-benzenesulfonamide **1n** against *L. infantum* [45].

Herein our initial work on a series of *N*-substituted benzenesulfonamides **1–6** with antiprotozoal activity against *L. infantum*

* Corresponding author. Tel.: +34 961 369 000; fax: +34 961 395 272.

E-mail address: eugenia@uch.ceu.es (M.E. González-Rosende).

has been extended to four parasites: *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*, ethiological agents responsible for most of the cases of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (CL, MCL) [46], and *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease, the largest parasitic disease burden on the American continent [47] (Table 1). In this study, we report on the *in vitro* activity spectrum of sulfonamides **1–6** against both *Leishmania spp.* promastigote forms and *T. cruzi* epimastigotes. The most interesting compounds were also investigated on intracellular amastigote forms of *L. infantum*.

Nuclease activity studies of selected sulfonamides were carried out to elucidate the probable mechanism of action. In addition, the cellular targets in parasites of these sulfonamides were sought by transmission electron microscopy (TEM) and by scanning electron microscopy (SEM) analysis.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and reagents

Sulfonamides **1–6** were prepared as previously reported by our group [45]. Resazurin sodium salt was obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, USA and stored at 4 °C protected from light. The solution of resazurin

was prepared at 2.5 mM in phosphate buffered saline solution (PBS), pH 7.4, and filtered through 0.22 µm prior use. Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) was dissolved in 0.9% Triton X-100 (pH 7.4). Reference drugs (miltefosine and benznidazole) were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal assays

2.2.1. *In vitro* leishmanicidal assays

2.2.1.1. Parasites and culture procedure. The following species of *Leishmania* were used: an autochthonous isolate of *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN83) obtained from an asymptomatic dog from the Priorat region (Catalonia, Spain), kindly given by Prof. Montserrat Portús (Universidad de Barcelona), *L. braziliensis* 2903, *L. amazonensis* (MHOM/Br/79/Maria) and *Leishmania guyanensis* 141/93, kindly provided by Prof. Alfredo Toraño (Instituto del Salud Carlos III, Madrid). Promastigotes were cultured in Schneider's Insect Medium (Sigma, St. Louis, MO) at 26 °C supplemented with 20% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (Sigma, St. Louis, MO) and 100 U/mL of penicillin plus 100 µg/mL of streptomycin (Sigma, St. Louis, MO) in 25 mL culture flasks.

Table 1
Sulfonamides evaluated against *Leishmania spp.* and *T. cruzi*.

Compound	R	R ₁	R ₂
1a	4-NO ₂ Ph	H	H
1b	2-NO ₂ Ph	H	H
1c	CH ₃	H	H
1d	3-NO ₂ Ph	H	H
1e	Ph	H	H
1f	4-FPh	H	H
1g	4-ClPh	H	H
1h	4-CH ₃ Oph	H	H
1i	4-NO ₂ Ph	CH ₃	CH ₃
1j	4-ClPh	CH ₃	CH ₃
1k	–	–	–
1l	–	–	–
1m	–	–	–
1n	4-NO ₂ Ph	–	–
1o	4-ClPh	–	–
1p	Ph	–	–
2a	4-NO ₂ Ph	H	H
2b	4-ClPh	H	H
2c	4-NO ₂ Ph	CH ₃	H
2d	4-ClPh	CH ₃	H
2e	Ph	CH ₃	H
2f	4-NO ₂ Ph	H	CH ₃
3a	4-NO ₂ Ph	–	–
3b	4-ClPh	–	–
3c	Ph	–	–
4	4-NO ₂ Ph	–	–
5	4-NO ₂ Ph	–	–
6a	4-NO ₂ Ph	–	–
6b	4-ClPh	–	–
6c	Ph	–	–

2.2.1.2. Promastigote susceptibility assay. The assay was performed using a modification of a previous method [45]. Promastigotes (2.5×10^5 parasites/well) were cultured in 96-well plastic plates. Compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). Different dilutions of the compounds (a first screening using 1, 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and then 252, 126, 63, 31.5, 15.7, 7.8, 3.9, and 1.9 μM for active compounds) up to 200 μL final volume were added. The final solvent (DMSO) concentrations never exceeded 0.1% (v/v) with no effect on the parasites proliferation or morphology. After 48 h at 26 °C, 20 μL of 2.5 mM resazurin solution was added and the fluorescence intensity (535 nm-excitation wavelength- and 590 nm-emission wavelength) was determined with a fluorometer Infinite 200 (Tecan i-Control) to calculate growth inhibition rate (%). All tests were carried out in triplicate. Miltefosine was used as reference drug. The efficacy of each compound was estimated by calculating the IC_{50} (concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites) and GI% (growth inhibitory percentage).

2.2.1.3. Amastigote assay. In the amastigote assay, 10^4 J774 cells/well were cultured in 8-well Lab-Tek chambers (Nunc) using a modification of the method described by Méndez et al. (1996) [48]. Briefly, once macrophages were adhered, 10^5 stationary phase *Leishmania* promastigotes/well were added and maintained at 33 °C in 5% CO_2 overnight. Non-internalized promastigotes were eliminated and dilutions of compounds were added for 48 h. Slides were fixed and stained (Giemsa) and the number of amastigotes/100 cells was determined. Cultures were performed at least in triplicate.

2.2.2. In vitro trypanocidal assays

2.2.2.1. Parasites and culture procedure. For *in vitro* studies, the clone CL-B5 of *T. cruzi* was used. The parasites, stably transfected with the *Escherichia coli* β -galactosidase gene (*lacZ*), were kindly provided by Dr. F. Buckner through University Complutense of Madrid (Spain). The epimastigotes were grown at 28 °C in liver infusion tryptose broth (LIT) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL of penicillin plus 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin and harvested during the exponential phase of growth.

2.2.2.2. Epimastigote susceptibility assay. The screening assay was performed in 96-well microplates (Sarstedt, Sarstedt, Inc.) with cultures that had not reached the stationary phase as described [49]. Briefly, epimastigotes were seeded at 1×10^5 per milliliter in 200 μL . The plates were then incubated with the compounds at 28 °C for 72 h, at which time 50 μL of the substrate solution, chlorophenol red beta-D-galactopyranoside (CPRG) was added to give a final concentration of 200 μM . The plates were incubated at 37 °C for an additional 6 h and were then read at 595 nm. Benznidazole was used as reference drug. Each concentration was tested in triplicate. Each experiment was performed twice separately. The efficacy of each compound was estimated by calculating the IC_{50} and GI%.

2.3. Cytotoxicity assay

2.3.1. Cells

J774 murine macrophages were grown in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (30 min at 56 °C), penicillin G (100 U/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). For the experiments, cells in the pre-confluence phase were harvested with trypsin. Cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified environment with 5% CO_2 .

2.3.2. Cytotoxicity assay on macrophages

Cell viability was evaluated using a modification of a colorimetric method described previously [45]. J774 macrophages were seeded (5×10^4 cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 200 μL of RPMI-1640 medium. The cells were allowed to adhere for 24 h at 37 °C in 5% CO_2 , then the medium was replaced by different concentrations of the test compounds in 200 μL of medium, and exposed for another 24 h. Growth controls were also included. To evaluate cell viability, 20 μL of a 2.5 mM resazurin solution was added and the plates were returned to the incubator for another 3 h. The reduction of resazurin was determined by measurement of the fluorescence intensity (535 nm-excitation wavelength and 590 nm-emission wavelength). Each concentration was assayed three times. Medium and controls were used in each test as blanks. Cytotoxicity effect of compounds was defined as the 50% reduction of cell viability of treated culture cells with respect to untreated culture (CC_{50}).

Table 2
Effect of sulfonamides 1–6 on *Leishmania* spp., *T. cruzi* and J774 macrophages.^{a,b,c}

Compd	<i>L. infantum</i> ^d		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. guyanensis</i>		<i>L. amazonensis</i>		<i>T. cruzi</i>		J774
	GI (%)	IC_{50} (μM)	GI (%)	IC_{50} (μM)	GI (%)	IC_{50} (μM)	GI (%)	IC_{50} (μM)	GI (%)	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)
1a	92.7	76.4	94	48.8	99	46.4	98	68.6	87.1	156.1	>256
1i	72.7	223.1	81.9	247.5	67	ND	31	ND	39.7	ND	>256
1j	71.5	216	79.6	223.3	81	110	87	214.6	ND	ND	>256
1n	90.8	66.2	84.3	61.5	94	84.2	30	ND	84.7	76.14	>256
2a	58.6	ND	81.1	93.5	87	169	54	ND	32.6	ND	>256
2b	65.0	175.1	73.2	139.4	87	169.2	62	ND	ND	ND	>256
2d	71	29.1	81	1.5	63	33.2	74.2	5	51	ND	>256
2e	84.4	112.9	91.9	147.5	91	108.4	41	ND	31.8	ND	>256
4	53	ND	73	ND	84	83.4	83	163.6	79	58.3	>256
5	98	61.3	89	80.8	94	139.6	97.9	66.7	58	ND	132.9
6a	91.9	3.14	84.4	55.9	76	39	90	11.4	100	35.6	61
6b	96	6.8	82	22	96	1.9	100	18	90.2	76.1	94
6c	45.3	ND	73.1	ND	57	ND	53	ND	61.5	ND	ND
M	93	7.2	95	3.1	98	18.2	98	9.6	—	—	135.9
B	—	—	—	—	—	—	—	—	90.3	54.7	>256

^a ND, not determined.

^b GI (%), growth inhibitory percentage; IC_{50} , concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites; CC_{50} , concentration of the compound that produced a 50% reduction of cell viability of treated culture cells with respect to untreated culture.

^c M: miltefosine, B: benznidazole.

^d Data for *L. infantum* published in Ref. [45].

2.4. Nuclease activity: pUC18 DNA cleavage

Reactions were undertaken by mixing 7 μL of 0.1 M cacodylate buffer (pH 6.0), 1 μL of pUC18 (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 6 μL of a solution of the tested compound at increasing concentrations to obtain final concentrations of 30 μM and 60 μM and 6 μL of ascorbic acid in cacodylate buffer. The mixtures were allowed to stand for 60 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. After that, 3 μL of a loading buffer solution consisting of 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol and 30% glycerol was added. Then, the solution was subjected to electrophoresis on a 0.8% agarose gel in 0.5 \times TBE buffer (0.045 M Tris, 0.045 M boric acid and 1 mM EDTA) containing 2 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ of a solution of ethidium bromide (10 mg/mL) at 80 V for about 2 h. The gel was photographed on a capturing gel printer plus TDI.

To test for the presence of reactive oxygen species (ROS) generated during strand scission, reactive oxygen intermediate scavengers were added alternatively to the reaction mixtures. These scavengers were DMSO (1 M), *tert*-butyl alcohol (1 M), 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (100 mM), tiron (10 mM) and SOD (superoxide dismutase, 15 units). Assays in presence of the minor groove binder distamycin (8 μM), the major groove binder methyl green (2.5 μL of a 0.01 mg/mL solution) or the stabilizer of CuI forms (neocuproine 1 mM) were also performed. Samples were treated as described above.

2.5. Transmission and scanning electron microscopy

Promastigotes of *L. infantum* previously treated for 48 h with compounds **1a**, **1n** and **2d** at corresponding concentrations (IC_{90} 52, 100, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively) and at a density of 1×10^6 cells/mL in a Schneider's medium, were centrifuged at 2500 g for 5 min, washed two times in Milloning buffer 0.1 M supplied with 0.54% glucose (pH 7.2) and then, for both scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy the pellet were fixed with 2.5% glutaraldehyde in Milloning buffer 0.1 M (pH 7.2) for 90 min at 26 $^{\circ}\text{C}$. Pellets were centrifuged at 2500 g and separated for SEM and TEM following the technique as described [50,51]. Briefly, for SEM the pellets were fully dehydrated in a graded ethanol and acetone series, dried in a Polaron Critical Point Dryer, mounted on stubs coated with Au-Pd alloy (500 \AA thickness) and viewed in a Zeiss DSM-950 digital scanning microscope at 20 kV. For TEM the Milloning buffer was eliminated and promastigotes were embedded in agar 2%, then blocks of agar were post-fixed for 1.5 h with 1% OsO_4 , rinsed in distilled water and then dehydrated in a graded acetone series. After full dehydration, agar blocks were embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate (1%) and Reynolds's lead citrate, finally they were examined in an EM-10 Zeiss microscope at 80 kV.

2.6. Statistics

All data for each experiment were analyzed by the ANOVA one way and Tukey's HSD test. Statistical significance was considered when p was ≤ 0.05 . The efficacy against parasite (IC_{50}) and cytotoxicity effect (CC_{50}) of compounds were determined from Probit analysis using SPSS v15.0 software.

3. Results and discussion

3.1. Anti-leishmanial and trypanocidal effects

Previous results from our group showed that a series of sulfonamides **1–6** (Table 1) presented an interesting anti-leishmanial profile against *L. infantum*, including derivatives **1a** and **1n** that displayed significant *in vivo* activity. In the present work, the *in vitro* anti-leishmanial activities of compounds **1–6** have been also investigated against cultured promastigotes of *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and *L. amazonensis*, using a standard assay [45]. Compounds **1–6** were also evaluated against *T. cruzi*

epimastigotes. The inhibition of *T. cruzi* epimastigote proliferation was determined against *T. cruzi* laboratory strain (clone CL-B5) cultured under standard conditions, according to a literature protocol [49]. Reduction of epimastigote growth rate was established after 72 h treatment in comparison with benznidazole. Viability of the cells was determined by a fluorometric method with resazurin previously described [45]. Table 2 shows the leishmanicidal and trypanocidal activities as well as the cytotoxicity on J774 macrophages of sulfonamides **1–6** that presented interesting anti-protozoal activity. We can observe that compounds **1a**, **2d**, **5**, **6a** and **6b** displayed significant *in vitro* activities against the promastigote form of all the investigated *Leishmania* species. Moreover, in the case of compounds **1a** and **2d**, the leishmanicidal activity was associated with a lack of toxicity to murine macrophages ($\text{CC}_{50} > 256\ \mu\text{M}$).

This study also pointed out to differences among *Leishmania* species and *T. cruzi*. When we compared the activity spectrum of the active and non cytotoxic sulfonamides **1a**, **1n**, **2d** and **4**, by using the statistical method Tukey's HSD test, we could notice that overall, *L. braziliensis* was the most sensible species to this series of sulfonamides ($p < 0.05$).

Moreover, the compounds exhibited different behaviors against *Leishmania* species and *Trypanosoma*. For example, compound **1n** was active against all *Leishmania* species, except for *L. amazonensis*, whereas compound **4** was only moderately active against *L. guyanensis* and *L. amazonensis* ($p < 0.05$). It is interesting to note that none of the tested sulfonamides **1–6** displayed activity exclusively against *T. cruzi* epimastigotes. Only compounds **1n** and **4** effectively inhibited the growth of *T. cruzi* parasites ($p < 0.05$). Apparently, the presence of the pharmacophoric group sulfonamide enhances the anti-leishmanial activity more significantly than the anti-*T. cruzi* effect. It is noteworthy that compounds **1n** and **4** possess the *p*-nitrobenzene moiety, similar to nifurtimox (a nitrofurans) and benznidazole (a nitroimidazole), the marketed drugs against Chagas disease, therefore highlighting the importance of the nitro group for the trypanocidal activity (Fig. 1).

In order to assess the anti-amastigote activity an assay was developed where the macrophage-like murine cell line J774 was infected with *L. infantum* and subsequently treated with selected sulfonamides **1a**, **1n** and **2d**. In the experiment the *in vitro* activity against intracellular amastigotes was found to be lower than the reference drug miltefosine, with an IC_{50} of 88, 79 and 90 μM for **1a**, **1n** and **2d**, respectively and 21 μM for miltefosine. However, none of the sulfonamides was toxic at any concentration in comparison to the reference drug, showing a better selective index ratio (CC_{50} for cells/ IC_{50} for parasite) than miltefosine, whose toxicity was 135.9 μM .

3.2. Nuclease activity

In a preliminary study carried out by us, it demonstrated the nuclease activity of the sulfonamido pyrimidine derivative **1a** in the presence of Cu(II) [45]. In the present work, we have investigated the nuclease activity of the sulfonamido pyrazine derivative **1n** and sulfonamido sulfathiazolyl derivative **2d**. Moreover, studies on sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** to determine the reactive species responsible for DNA damage have been also carried out.

The activity of compounds **1n** and **2d** as chemical nucleases was studied using supercoiled pUC18 DNA in cacodylate buffer (pH = 6.0).

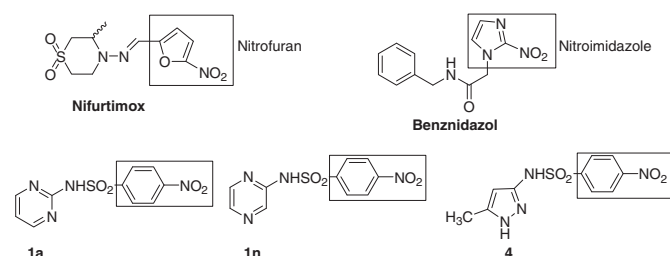


Fig. 1. Nitroderivatives with trypanocidal activities.

DNA cleavage is controlled by relaxation of supercoiled circular form of pUC18 into nicked circular form and linear forms. When circular plasmid DNA is submitted to electrophoresis, the fastest migration is observed for the supercoiled form (Form I). If one strand is cleaved, the supercoils will relax to produce a slower-moving open circular form (Form II). If both strands are cleaved, a linear form (Form III) will be generated that migrates at an intermediate speed.

An inspection of Fig. 2 shows that sulfonamides **1n** and **2d** do not present ability to damage plasmid DNA at the assayed concentrations. Nevertheless, considering that we have previously shown the nuclease activity of sulfonamide **1a** in the presence of Cu(II), further assays were carried out to evaluate the ability to cleave pUC18 plasmid DNA by copper(II)–ligand (1:1) mixtures of sulfonamides **1n** and **2d**. The nuclease activity by the copper(II)–ligand mixtures of sulfonamides **1n** and **2d** was examined at 15 μM or 45 μM and compared with that of the Cu(II) chloride in the presence of the reducing agent ascorbate (50-fold excess relative copper(II) concentration) (Fig. 3).

As shown in Fig. 3, Cu(II)–ligand **1n** (1:1) mixture at 15 μM was able to cleave a fraction of supercoiled DNA into circular and linear forms (lane 5). At the concentration of 45 μM a complete degradation of supercoiled form to yield circular and linear forms was observed (lane 6). The nuclease activity showed by Cu(II)–ligand **2d** (1:1) was a bit lower. When the Cu(II)–ligand **2d** (1:1) mixture concentration was 15 μM , a little quantity of supercoiled DNA is cleaved into circular form (lane 7). With a concentration of 45 μM , DNA cleavage increases and the three DNA forms coexist (lane 8). The activity of both mixtures **1n** and **2d** was higher than that of copper(II) salt at the same conditions (compare lanes 6 and 8 with lane 4). Taking into consideration that sulfonamides **1n** and **2d** do not exhibit nuclease activity alone and Cu(II)–**1n** (1:1) and Cu(II)–**2d** (1:1) mixtures were able to cleave DNA, it is evident that Cu(II) does contribute to the DNA cleavage process. As a consequence, compounds **1n** and **2d** can be considered as nuclease agents in the presence of copper(II) and ascorbic acid, analogous to sulfonamide **1a**. Due to Cu(II) and the compounds did not show any nuclease activity by themselves at the experimental conditions, the DNA cleavage produced by the mixtures may arise from the complexation of Cu(II) with the compounds. It is well known that Cu(II) complexes can act as chemical nucleases.

Transition metal ions such as copper(II) are present at low levels in biological systems and these conditions can be found easily inside the cell. Therefore, the behavior of compounds **1a**, **1n** and **2d** is probably due to the involvement of a redox process in the presence of the metal transition Cu(II), which produces the generation of active oxygen species that are directly responsible for the DNA cleavage reaction [52]. Transition metal complexes utilize the redox properties of the metal and dioxygen (O_2). This is the first step to the activation of a cascade of reactions that produces the generation of reactive oxygen species (hydroxyl, superoxide and singlet oxygen-like species) which then cleave the DNA [52]. Subsequently, studies to identify the reactive oxygen species (ROS) that mediate the DNA strand scission of copper(II)–ligand (1:1) mixtures of sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** were carried out. We investigated the formation of three activated oxygen intermediates: hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and superoxide radical ($\text{O}^{\cdot-}_2$) by monitoring the quenching of DNA



Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA treated with compounds **1n**, **2d** and ascorbic acid. Incubation time 60 min (37 °C). 1: λ DNA/EcoRI + HindIII Marker; 2: pUC18 plasmid; 3: control (pUC18 + ascorbic acid); 4: **1n** 30 μM ; 5: **1n** 60 μM ; 6: **2d** 30 μM ; 7: **2d** 60 μM .

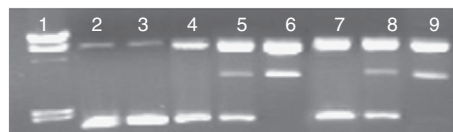


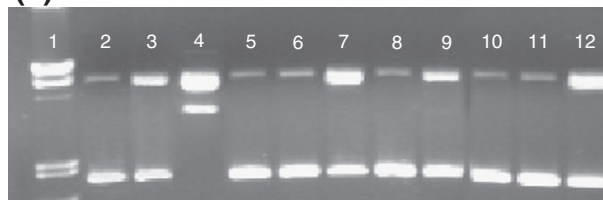
Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA treated with the mixture of copper chloride and compounds **1n**, **2d** and 50 fold-excess of ascorbate. Incubation time: 60 min (37 °C). 1: λ DNA/EcoRI + HindIII Marker; 2: control; 3: pUC18 + ascorbate; 4: CuCl_2 45 μM ; 5: **1n** 15 μM ; 6: **1n** 45 μM ; 7: **2d** 15 μM ; 8: **2d** 45 μM ; 9: $\text{Cu}(\text{phen})_2$ 15 μM .

cleavage in the presence of ROS scavengers in solution. Fig. 4 shows the influence of the radical scavengers on the DNA cleavage of the copper(II)–ligand (1:1) mixtures of **1a** (Fig. 4a), **1n** (Fig. 4b) and **2d** (Fig. 4c).

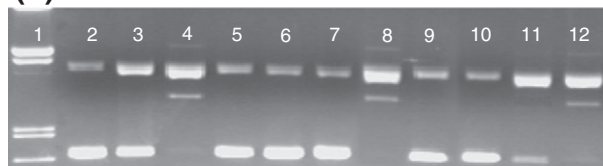
It can be found that the hydroxyl radical scavengers, DMSO and *tert*-butyl alcohol added to the mixtures inhibit the DNA cleavage indicating the formation of hydroxyl radical as one of the reactive species (lanes 5 and 6 in Fig. 4). The involvement of singlet oxygen-like species can be deduced from the inhibition of the DNA scission in presence of 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (lanes 7, Fig. 4). Tiron, a typical scavenger of superoxide radical ($\text{O}^{\cdot-}_2$), inhibits DNA damage produced by the mixtures suggesting that superoxide radical is involved into the DNA cleavage (lanes 9, Fig. 4).

It is interesting to note the different behavior shown by copper(II)–**1a** (1:1) or copper(II)–**2d** (1:1) mixtures with respect to copper(II)–**1n** (1:1) mixture by the addition of the superoxide-scavenging enzyme, superoxide dismutase (SOD) (lane 8, Fig. 4). A significant inhibition of the DNA cleavage was observed in the case of the copper(II)–**1a** (1:1) and copper(II)–**2d** (1:1) mixtures, indicating that superoxide radical ($\text{O}^{\cdot-}_2$) is one of the ROS responsible for DNA breakage. However, SOD addition did not have any apparent effect on the DNA cleavage mediated by copper(II)–**1n** (1:1) mixture [53]. This result possibly could explain the different behavior of the

(a) Sulfonamide **1a**



(b) Sulfonamide **1n**



(c) Sulfonamide **2d**



Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA treated with 45 μM of compounds **1a** (a), **1n** (b) and **2d** (c) in the presence of ascorbate acid and potential inhibitor agents. Incubation time 1 h (37 °C). Lane 1: λ DNA/EcoRI + HindIII Marker; lane 2: supercoiled DNA (control); lane 3: pUC18 + ascorbate; lane 4: compound; lane 5: compound + DMSO (1 M); lane 6: compound + *tert*-butyl alcohol (1 M); lane 7: compound + 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (100 mM); lane 8: compound + SOD (15 units); lane 9: compound + tiron (0.4 M); lane 10: compound + neocuproine (1 mM); lane 11: compound + distamycin (8 μM); lane 12: compound + methyl green (0.00125 mg/mL).

sulfonamide **1n** against *L. amazonensis* in comparison to sulfonamides **1a** and **2d** (Table 2).

Reoxidation of Cu(I) to Cu(II) is known to generate superoxide radicals. To investigate the involvement of Cu(I) in the DNA damage, the quenching of DNA cleavage was studied in the presence of neocuproine, a Cu(I)-specific chelating agent that forms strong complexes with Cu(I). The addition of neocuproine does inhibit DNA cleavage produced by the three mixtures (lane 10, Fig. 4). Therefore, the suppression of DNA cleavage by the addition of the specific Cu(I) chelator neocuproine suggests the implication of Cu(I) in DNA damage.

To determine the DNA groove selectivity of copper(II)–ligand **1a** (1:1), copper(II)–ligand **1n** (1:1) and copper(II)–ligand **2d** (1:1) mixtures, control experiments have been performed using minor groove binder distamycin and major groove binder methyl green. The results indicate that the addition of distamycin or methyl green significantly

decreases the breakage of DNA strands produced by copper(II)–ligand **1a** (1:1) and copper(II)–ligand **2d** (1:1) mixtures, however, the cleavage produced by copper(II)–ligand **1n** (1:1) mixture is only inhibited in the presence of distamycin, but not by methyl green. As a first approach, it could be inferred from these results that compound **1n** might prefer minor groove binding and sulfonamides **1a** and **2d** could bind to DNA via the minor and major grooves. These results could again help to support the different behavior of the sulfonamide **1n** against *L. amazonensis* in comparison to sulfonamides **1a** and **2d**.

As regard to the mechanistic pathway involved in the DNA cleavage reaction, our results suggest that the first step could be the interaction of copper(II)–ligand (1:1) mixtures of sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** with DNA through the minor and/or major groove. The second step of the proposed mechanism consists on the reduction of copper(II) complex to copper(I) complex through the reaction with the reducing

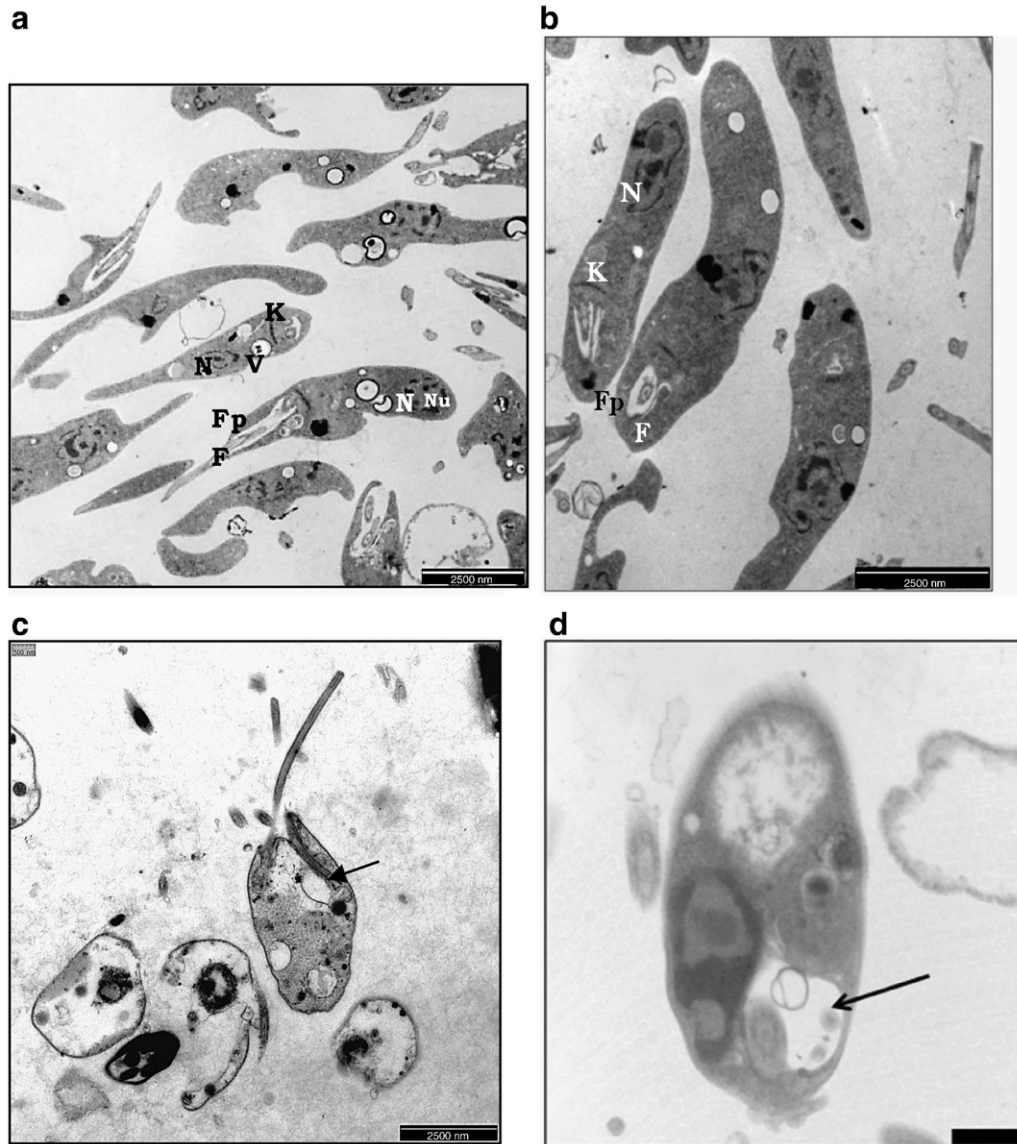


Fig. 5. Ultrastructural alterations on *L. infantum* promastigotes, induced by treatment with sulfonamides **1a**, **1n** and **2d**. (a, b) General view of untreated promastigotes which present a normal ultrastructure of organelles such as nucleus (N) with its nucleolus (Nu), kinetoplast (K) as a prolongation of mitochondria (M), flagellar pocket (Fp), flagella (F) and vacuoles (V). (c, d) Parasite treated with compound **1a** showing cellular membrane damage and drastic alterations in nucleus, mitochondria and kinetoplast together with severe changes in the flagellar pocket (black arrow). (e, f) After treatment with compound **1n**, it is possible to observe severe cellular disorganization with marked mitochondrial and kinetoplasmic degradation together with an increased number of acidocalcisomes (white arrow). Some parasites exhibited signs of abnormal developmental effects such as the presence of two or three flagella (black arrow). (g, h) Parasites treated with compound **2d** presented drastic internal disorganization with the appearance of lamellar residues (white arrow) and electrodense bodies (black arrow).

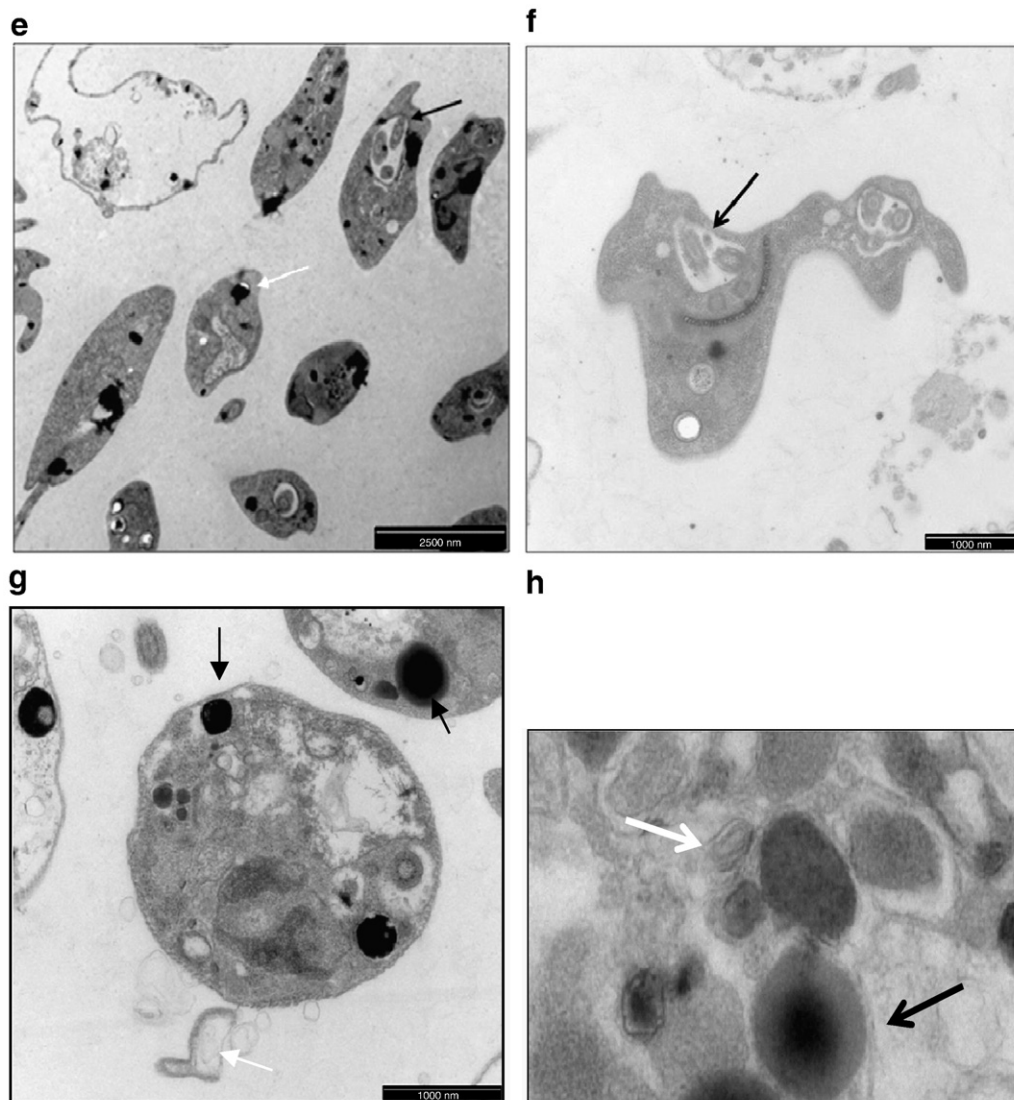


Fig. 5 (continued).

agent ascorbate. This proposal is possible into the parasitic cells because both, copper(II) ions and other metal ions capable to catalyze the redox reaction such as Fe(III) or Mn(VII), and reducing agents (as ascorbate, glutathione, polyphenols, tocopherols and so on) are present in biological systems. Once copper(I) complex would be formed a metal-catalyzed reaction could activate a cascade of reactions that eventually would generate the reactive oxygen species $\text{OH}\cdot$, $\text{O}\cdot^-$, and $^1\text{O}_2$ [54]. These species would be responsible for initiating the DNA strand scission chemistry [55].

Therefore, our findings provide evidence that the oxidative cleavage is probably produced by formation of redox active Cu(I) complexes with DNA, with subsequent generation of reactive oxygen species that produce DNA scission.

3.3. Ultrastructural effects

TEM analyses of untreated and treated promastigotes of *L. infantum* log phase were performed to evidence the morphological changes and alterations caused by sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** (Fig. 5). Untreated *L. infantum* promastigotes showed a classical ultrastructure of kinetoplastids. A nucleus (N) with its nucleolus (Nu) and the characteristic microtubules (Mt), the kinetoplast (K) appearing as a prolongation of the mitochondria (M), a flagellar pocket (FP), flagella (F) and

vacuoles (V) (Fig. 5a, b). In contrast *L. infantum* promastigotes treated with sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** displayed different degrees of damage. Whereas compounds **1a** and **1n** apparently produced significant alterations mainly addressed to the nucleus, mitochondria and kinetoplast, in the case of compound **2d** a generalized cytoplasmic disorganization was observed as well as damage on kinetoplast, the mitochondria and nucleus. As shown in Fig. 5c and d compound **1a** produced marked disruption effects on mitochondria, kinetoplast and flagellar pocket. Double nuclear membrane was not visible with loss of some cytoplasmic inclusions and cellular border. Moreover, several empty vacuoles and conspicuous electron-dense particles were observed. Treatment with compound **1n** (Fig. 5e and f) also caused severe cellular disorganization with notorious changes in cytoplasmic organelles, such as an intense mitochondrial swelling with loss of matrix material and alteration in kinetoplasts. In addition, disruption of nuclear membrane and chromatin was observed. Other modifications included lipid droplets and significant increases in the number of acidocalcisomes. Interestingly some parasites exhibited signs of abnormal development like the presence of two or three flagella suggesting a possible effect of the compound on cytokinesis. Moreover, high accumulation of electron-dense bodies in the cytoplasm was often observed. Ultrastructural analysis of the treated parasites with compound **2d** revealed general intracytoplasmic and nuclear disorganization together with the appearance of lamellar (cell

Table 3Summary of damage on *L. infantum* promastigotes observed by transmission electron microscopy, after 48-h exposure to compounds **1a**, **1n** and **2d**.

Structure	Damage (%) ^{a,b}			
	1a	1n	2d	Untreated
Nucleus	17	56	79	11
Nuclear membrane	38	38	75	14
Kinetoplast	44	36	60	0
Plasmatic membrane	33	50	30	15
Flagellum	0	67	100	0
Flagellar pocket	71	75	0	0
Mitochondrion	78	80	33	18

^a For each compound, 50 parasites were analyzed.^b Damage frequency: 0%= no damage; 100% maximum damage.

membrane residues) and electrodense bodies (Fig. 5g, h). A summary of the damage observed by TEM on *L. infantum* promastigotes is shown in Table 3, expressed as percentage.

Regarding SEM analysis, untreated parasites displayed normal morphology and surface topology whereas promastigotes treated with sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** showed dramatic changes in their structure. Parasites treated with compound **1a** were bizarrely shaped cells, whereas those treated with compound **1n** showed a retracted plasmatic membrane. Parasites treated with derivative **2d** displayed a pronounced shrinkage of the cell body (Fig. 6).

4. Conclusions

Thirty sulfonamides previously investigated as anti-*L. infantum* compounds were *in vitro* tested against promastigotes of three *Leishmania* species (*L. braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. guyanensis*), and twenty three of them were also tested on epimastigotes of *T. cruzi*. Selected sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** were also investigated against intracellular *L. infantum* amastigotes. Our findings show that the efficacy of compound **1a**, previously seen in visceral leishmaniasis in a murine model caused by *L. infantum*, extends to *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and

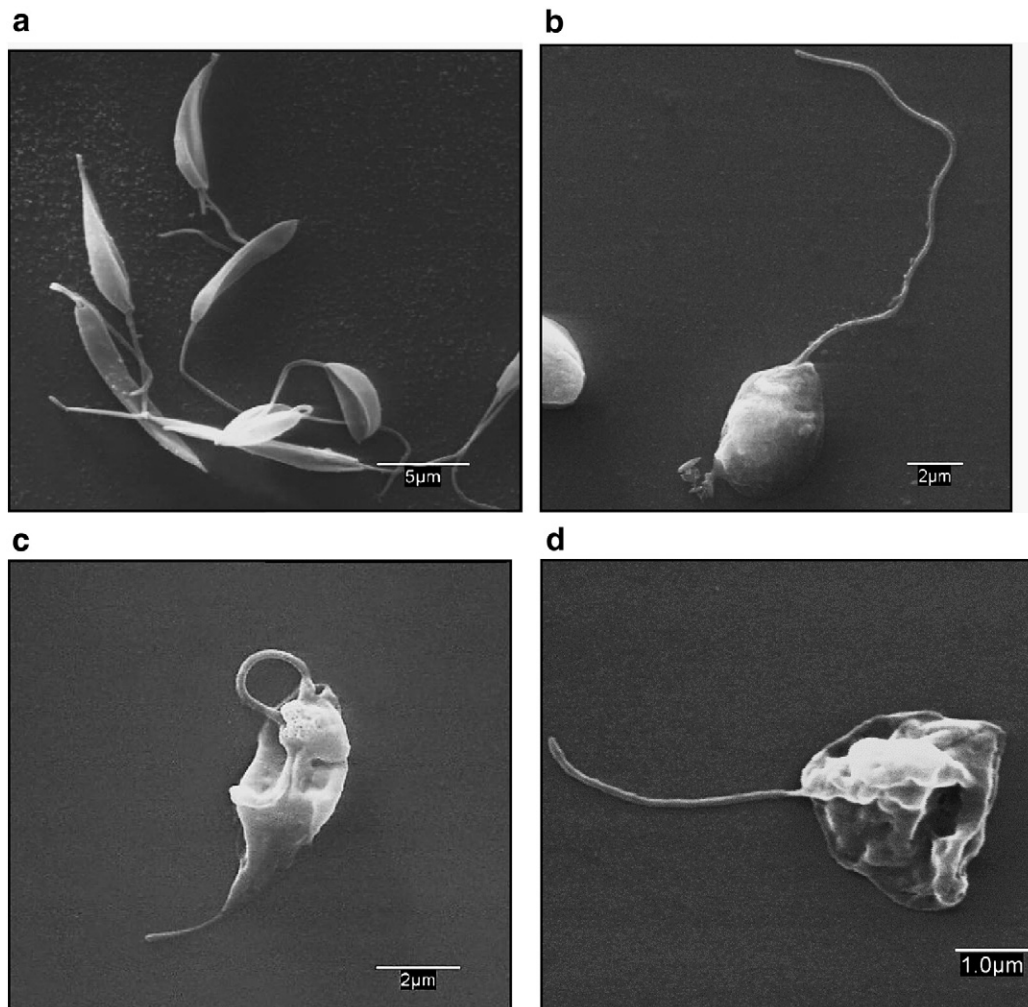


Fig. 6. Scanning electron microscope image of *L. infantum* promastigotes. (a) Control. (b) Parasite treated with compound **1a**. (c) Treated with compound **1n**. (d) Treated with compound **2d**.

L. amazonensis. These results reveal that sulfonamide **1a** is a promising compound as prototype for treating leishmaniasis, as it affects species of *Leishmania* responsible of different clinical manifestations. This study also pointed out to differences between the *Leishmania* species.

Nuclease activity studies carried out on the interaction of sulfonamides **1a**, **1n** and **2d** with plasmid DNA showed an oxidative cleavage probably produced by formation of redox active metal complexes that generate ROS responsible for DNA scission. In addition, electron microscopy analysis showed ultrastructural effects mainly addressed to DNA bearing structures such as nucleus, mitochondria and kinetoplast. Taken together the results from nuclease assays and from electron microscopy studies, it can be considered that DNA is likely to be the main target. Nevertheless it cannot be discarded that the observed morphological changes could precede the DNA degradation as an effect of the sulfonamides on parasite-specific molecular machineries or uptake.

In summary, our data provide further information regarding the activity of sulfonamides **1–6** upon *T. cruzi* and *Leishmania* spp. which should aid future design and synthesis of agents that could be used for antiprotozoal therapy. *In vivo* and *in vitro* preformulation studies to provide the basis for the clinical development are going on.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselleria de Sanitat-Generalitat Valenciana (Projects AP-116/09, AP158/10), the University CEU-Cardenal Herrera (Project PRCEU-UCH09-19) and Spanish Agency for International Cooperation and Development (AECID) A-024457/09. P. Bilbao is thankful to the MAEC-AECID for a PhD fellowship. The authors also wish to thank to UAH Microscopy Facility.

References

- Nussbaum K, Honek J, Cadmus CM, Efferth T. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. *Current Medicinal Chemistry* 2010;17:1594–617.
- <http://www.who.int/topics/en> 30 Dec 2011, date last accessed.
- <http://www.dndi.org> 30 Dec 2011, date last accessed.
- Graebin CS, Uchoa FD, Bernardes LSC, Campo VL, Carvalho I, Eifler-Lima VL. Antiprotozoal agents: an overview. *Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry* 2009;8:345–66.
- Croft SL. Kinetoplastida new therapeutic strategies. *Parasite* 2008;15:522–7.
- Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Andrews PC, Junk PC, Kedzierska K. *Leishmaniasis*: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Current Medicinal Chemistry* 2009;16:599–614.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2006;19:111–26.
- Filardi LS, Brenner Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1987;81:755–9.
- Richard JV, Werbovetz KA. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Current Opinion in Chemical Biology* 2010;14:447–55.
- Cerecetto H, González M. Synthetic medicinal chemistry in Chagas' disease: compounds at the final stage of "hit-to-lead" phase. *Pharmaceuticals* 2010;3:810–38.
- Argyropoulou I, Geronikaki A, Vicini P, Zani F. Synthesis and biological evaluation of sulfonamide thiazole and benzothiazole derivatives as antimicrobial agents. *Arxiv* 2009;6:89–102.
- Mitscher LA, Lemke TL, Gentry EJ. Antibiotics and antimicrobial agents. In: Lemke TL, Williams DA, editors. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2008. p. 1028–83.
- Vullo D, Innocenti A, Supuran CT. Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory activity: toward novel applications for sulfonamide drugs. In: Supuran CT, Winum J-Y, editors. *Drug design of zinc-enzyme inhibitors*. New Jersey: John Wiley and Sons; 2009. p. 155–70.
- Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2000;10:575–600.
- Navarrete-Vazquez G, Paoli P, León-Rivera I, Villalobos-Molina R, Medina-Franco JL, Ortiz-Andrade R, Estrada-Soto S, Camini G, Diaz-Coutiño D, Gallardo-Ortiz I, Martínez-Mayorga K, Moreno-Díaz H. Synthesis, *in vitro* and computational studies of protein tyrosine phosphatase 1B inhibition of a small library of 2-arylsulfonamido-benzothiazoles with antihyperglycemic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009;17:3332–41.
- Selam JL. Pharmacokinetics of hypoglycemic sulfonamides: Ozidia, a new concept. *Diabetes & Metabolism* 1997;23:39–43.
- Thornber CW. Isosterism and molecular modification in drug design. *Chemical Society Reviews* 1979;8:563–80.
- Ghorab M, Ragab A, Hamed MM. Design, synthesis and anticancer evaluation of novel tetrahydroquinoline derivatives containing sulfonamide moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009;44:4211–7.
- Hu L, Li Z, Jiang JD, Boykin DW. Novel diaryl or heterocyclic sulfonamides as anti-mitotic agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2008;8:739–45.
- Rostom SAF. Synthesis and *in vitro* antitumor evaluation of some indeno [1,2-c] pyrazol(in)es substituted with sulfonamide, sulfonylurea(-thiourea) pharmacophores, and some derived thiazole ring systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006;14:6475–85.
- Supuran CT, Casini A, Mastrolorenzo A, Scozzafava A. COX-2 selective inhibitors, carbonic anhydrase inhibition and anticancer properties of sulfonamides belonging to this class of pharmacological agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2004;4:625–32.
- Wolfe C, Hicks C. Profile of darunavir in the management of treatment-experienced HIV patient. *HIV/AIDS: Research and Palliative Care* 2009;1:13–21.
- Stranix BR, Lavallée JF, Sevigny G, Yelle J, Perron V, LeBerre N, Herbart D, Wu JJ. Lysine sulfonamides as novel HIV-protease inhibitors: *N*-acyl aromatic α -amino acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006;16:3459–62.
- Supuran CT, Innocenti A, Mastrolorenzo A, Scozzafava A. Antiviral sulfonamide derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2004;4:189–200.
- Martyn DC, Cortese JF, Tyndall E, Dick J, Mazitschek R, Munoz B, Clardy J. Antiplasmodial activity of piperazine sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010;20:218–21.
- Hernández-Núñez E, Tlahuext H, Moo-Puc R, Torres-Gómez H, Reyes-Martínez R, Cedillo-Rivera R, Nava-Zuazo C, Navarrete-Vazquez G. Synthesis and *in vitro* trichomonocidal, giardicidal and amebicidal activity of *N*-acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1*H*-imidazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009;44:2975–84.
- Ekoue-Kovi K, Yearick K, Iwaniuk DP, Natarajan JK, Alumasa J, de Dios AC, Roeppe PD, Wolf C. Synthesis and antimalarial activity of new 4-amino-7-chloroquinolyl amides, sulfonamides, ureas and thioureas. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009;17:270–83.
- Parai MK, Panda G, Srivastava K, Puri SK. Design, synthesis and antimalarial activity of benzene and isoquinoline sulfonamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008;18:776–8.
- Krungkrai J, Krungkrai SR, Supuran CT. Malarial parasite carbonic anhydrase and its inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2007;7:909–17.
- Domínguez JN, León C, Rodríguez J, Gamboa de Domínguez N, Gut J, Ph Rosental. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. *Il Farmaco* 2005;60:307–11.
- Norose K, Aosai F, Mun HS, Yano A. Effects of sulfamethoxazole on murine ocular toxoplasmosis in interferon- γ knockout mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47:265–71.
- Greif G, Harder A, Heberkorn A. Chemotherapeutic approaches to protozoa: Coccidia—current level of knowledge and outlook. *Parasitology Research* 2001;87:973–5.
- van der Ven AJ, de Ven EM, Schoondermark-van, Camps W, Melchers WJ, Koopmans PP, van der Meer JW, Galama JM. Anti-*Toxoplasma* effect of pyrimethamine, trimethoprim and sulfonamides alone and in combination: implications for therapy. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1996;38:75–80.
- Pagliero RJ, Lusvardi S, Pierini AB, Brun R, Mazzieri MR. Synthesis, stereochemical characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010;18:142–50.
- Goodarzi M, da Cunha EF, Freitas MP, Ramalho TC. QSAR and docking studies of novel antileishmanial diaryl sulfides and sulfonamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010;45:4879–89.
- da Silva LE, de Sousa PT, Jr Maciel EN, Korting-Nunes R, Eger I, Steindel M, Andrade-Rebello R. *In vitro* antiprotozoal evaluation of zinc and copper complexes based on sulfonamides containing 8-aminoquinoline ligands. *Letters in Drug Design & Discovery* 2010;7:679–85.
- Souza AM, Castro HC, Brito MA, Andrighetti-Fröner CR, Magalhaes U, Oliveira KN, Gaspar-Silva D, Pacheco LK, Joussef AC, Steindel M, Simoes CM, Santos DO, Alburquerque MG, Rodrigues CR, Nunes RJ. *Leishmania amazonensis* growth inhibitors: biological and theoretical features of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives. *Current Microbiology* 2009;59:374–9.
- Khan KM, Khan MZ, Taha M, Maharvi GM, Saify ZS, Parveen S, Choudhary MI. Leishmanicidal potential of *N*-substituted morpholine derivatives: synthesis and structure-activity relationships. *Natural Product Research* 2009;23:479–84.
- Altenkämper M, Bechem B, Perruchon J, Heinrich S, Madel A, Ortman R, Dahse HM, Freunsch E, Wang Y, Rath J, Stich A, Hitzler M, Chiba P, Lanzer M, Schlitzer M. Antimalarial and antitrypanosomal activity of a series of amide and sulfonamide derivatives of a 2,5-diaminobenzophenone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009;17:7690–7.
- da Silva LE, Joussef AC, Pacheco LK, da Silva DG, Steindel M, Rebello RA, Schmidt B. Synthesis and *in vitro* evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007;15:7553–60.
- Ajibade PA, Kolawole GA, Brien PO. Metal complexes of 4-amino-*N*-(2-pyrimidinyl) benzene sulfonamide: synthesis, characterization and antiprotozoal studies. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry* 2007;37:653–9.
- George TG, Endeshaw MM, Morgan RE, Mahasenan KV, Delfin DA, Mukherjee MS, Yakovich AJ, Fotie J, Li C, Werbovetz KA. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 3,5-substituted-N1-phenyl-N4, N4-di-n-butylsulfanilamides as antikinetoplastid antimicrotubule agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007;15:6071–9.

- [43] Bhattacharya G, Herman J, Delfin DA, Salem MM, Barszcz T, Mollet M, Riccio G, Brun R, Werbovetz KA. Synthesis and antitubulin activity of N^1 - and N^4 -substituted 3,5-dinitro sulfanilamides against African trypanosomes and *Leishmania*. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004;47:1823–32.
- [44] Chibale K, Haupt H, Kendrick H, Yardley V, Saravanamuthu A, Fairlamb AH, Croft SL. Antiprotozoal and cytotoxicity evaluation of sulfonamide and urea analogues of quinacrine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001;11:2655–7.
- [45] Dea-Ayuela MA, Castillo E, González-Álvarez M, Vega C, Rolón M, Bolás-Fernández F, Borrás J, González-Rosende ME. *In vivo* and *in vitro* anti-leishmanial activities of 4-nitro-*N*-pyrimidin-2-ylbenzenesulfonamide and N^2 -(4-nitrophenyl)- N^1 -propylglycinamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009;17:7449–56.
- [46] Ameen M. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2010;11:557–69.
- [47] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> 30 Dec 2011, date last accessed.
- [48] Méndez S, Nell M, Alunda JM. *Leishmania infantum*: infection of macrophages *in vitro* with promastigotes. *International Journal of Parasitology* 1996;26:619–22.
- [49] Vega C, Rolón M, Martínez-Fernández AR, Escario JA, Gómez-Barrio A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. *Parasitology Research* 2005;95:296–8.
- [50] Pérez-Serrano J, Grosman C, Urrea-París MA, Denegri G, Casado N, Rodríguez-Caabeiro F. Depolarization of the tegument precedes morphological alterations in *Echinococcus granulosus* protoscolexes incubated with ivermectin. *Parasitology Research* 2001;87:804–7.
- [51] Muelas-Serrano S, Pérez-Serrano J, Gómez-Barrio A, Arán VJ, Rodríguez-Caabeiro F. Ultrastructural alterations induced by nifurtimox and another nitro derivative on epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 2002;88:97–101.
- [52] Drevsek P, Zupancic T, Pihlar B, Jerala R, Kolitsch U, Plaper A, Turel I. Mixed-valence Cu(II)/Cu(I) complex of quinolone ciprofloxacin isolated by a hydrothermal reaction in the presence of L-histidine: comparison of biological activities of various copper-ciprofloxacin compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2005;99:432–42.
- [53] González-Álvarez M, Alzuet G, Borrás J, Pitié M, Meunier B. DNA cleavage studies of mononuclear and dinuclear copper(II) complexes with benzothiazolesulfonamide ligands. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 2003;8:644–52.
- [54] Kehrer JP. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149:43–50.
- [55] Sigman DS. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion. *Accounts of Chemical Research* 1986;19:180–6.

In Vitro and in Vivo Antileishmanial and Trypanocidal Studies of New *N*-Benzene- and *N*-Naphthalenesulfonamide Derivatives

Cristina Galiana-Roselló,^{†,||} Pablo Bilbao-Ramos,[‡] M. Auxiliadora Dea-Ayuela,^{†,‡} Miriam Rolón,[§] Celeste Vega,[§] Francisco Bolás-Fernández,[‡] Enrique García-España,^{||} Jorge Alfonso,[§] Cathia Coronel,[§] and M. Eugenia González-Rosende^{*,†}

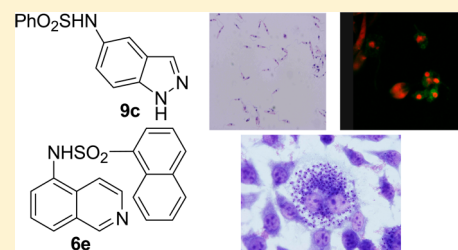
[†]Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU Cardenal Herrera, Edificio Seminario s/n, 46113-Moncada, Valencia, Spain

[‡]Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040-Madrid, Spain

[§]Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Pai Perez 265 c/Mariscal Estigarribia, 1541-Asunción, Paraguay

^{||}Departamento de Química Inorgánica, ICMOL, Universitat de València, C/Catedrático José Beltrán 2, 46980-Paterna, Spain

ABSTRACT: We report in vivo and in vitro antileishmanial and trypanocidal activities of a new series of *N*-substituted benzene and naphthalenesulfonamides 1–15. Compounds 1–15 were screened in vitro against *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis*, and *Trypanosoma cruzi*. Sulfonamides 6e, 10b, and 10d displayed remarkable activity and selectivity toward *T. cruzi* epimastigotes and amastigotes. 6e showed significant trypanocidal activity on parasitemia in a murine model of acute Chagas disease. Moreover, 6e, 8c, 9c, 12c, and 14d displayed interesting IC₅₀ values against *Leishmania* spp promastigotes as well as *L. amazonensis* and *L. infantum* amastigotes. 9c showed excellent in vivo activity (up to 97% inhibition of the parasite growth) in a short-term treatment murine model for acute infection by *L. infantum*. In addition, the effect of compounds 9c and 14d on tubulin as potential target was assessed by confocal microscopy analysis applied to *L. infantum* promastigotes.



INTRODUCTION

Protozoa of the order Kinetoplastida are the causative agents of a number of human and animal diseases including Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) and leishmaniasis (*Leishmania* spp.).¹ According to the World Health Organization, leishmaniasis is an uncontrolled tropical disease with high morbidity and mortality rates in Africa, Asia, and the Americas.² Current chemotherapy is based on pentavalent antimonials, such as sodium stibogluconate and meglumine antimoniate. Both drugs only exist in their parenteral forms and need to be used under medical supervision. Now, second-line compounds are being used, including pentamidine and amphotericin B. A new antileishmanial, miltefosine, has been used in India and currently is undergoing clinical trials in other countries. However, current drugs for leishmaniasis are toxic, expensive, and cause several adverse effects.³ Moreover, the development of drug resistance, especially in HIV–*Leishmania* coinfecting patients, has also worsened the problem.⁴

Human American trypanosomiasis or Chagas disease, mostly found in the American continent, is also an important cause of mortality and morbidity in the region.⁵ At present, the only therapeutic agents of value against Chagas disease are benznidazole and nifurtimox. Nevertheless, both drugs suppress parasitemia and are efficacious exclusively during the early stages of infection. Moreover, limitations such as the long treatment period (30, 60, or 90 days), toxicity, extreme side

effects, and regional variations in efficacy due to naturally resistant *T. cruzi* strains cause a high rate of patient noncompliance.⁶

In spite of the social and economic importance of leishmaniasis and Chagas disease, efforts directed toward the discovery of new drugs against them remain undeveloped.⁷ Therefore, there is an urgent need for the discovery of new therapeutics displaying antitrypanosomal and leishmanicidal activities.

Sulfonamide pharmacophore is an important structural core in medicinal chemistry. In the literature, sulfonamides with different pharmacological profiles, such as antimicrobial,⁸ diuretic,⁹ hypoglycaemic,¹⁰ antithyroid,¹¹ antitumoral,¹² and antiviral¹³ activities, are described. In addition, the antiparasitic efficacy of several benzenesulfonamides has also been reported.¹⁴ Thus, in vitro antileishmanial and trypanocidal effects of compounds containing the sulfonamide moiety have been shown.¹⁵ However, a limited number have been tested in murine animal models, and neither of them displayed significant in vivo activity. In this context, we have previously shown the in vivo activity of *p*-nitrobenzenesulfonamides against *Leishmania infantum*.¹⁶ This result prompted us to synthesize and in vitro evaluate novel sulfonamides for

Received: April 24, 2013

Published: October 23, 2013

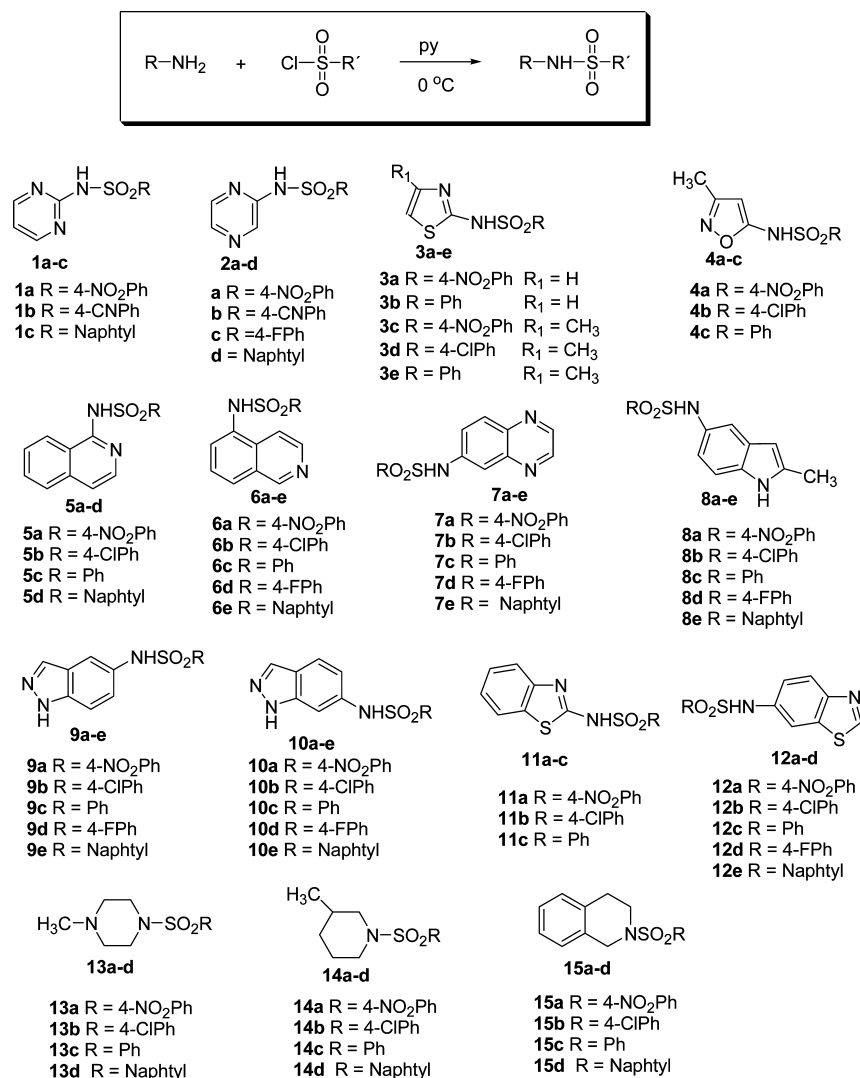


Figure 1. Synthetic reaction and structures of sulfonamide derivatives 1–15.

antiprotozoal activity against *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, the etiological agents of most cases of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, and against *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Encouraged by our recent results,¹⁷ we report here in vivo and in vitro trypanocidal and leishmanicidal studies on more than 60 aromatic sulfonamide derivatives (three of them previously described). In order to investigate a potential mechanism of action, the antitubulin effect of the most promising sulfonamides was assessed by using immunofluorescence confocal microscopy. In addition, a structure–activity relationship (SAR) analysis will be discussed.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. Previous research from our group showed that *N-p*-nitrobenzenesulfonamides of 2-amine-substituted pyrimidine and pyrazine rings, sulfonamides **1a** and **2a**, displayed an interesting in vivo activity against *L. infantum*, as their administration (5 mg/kg/day for 10 days, injected ip route) led to a clear-cut parasite burden reduction (nearly 99%).¹⁶ To develop alternative structures to parent compounds **1a** and **2a**, our design approach was based on the combination of diverse monocyclic and bicyclic amines with different naphthalene and

benzenesulfonyl chlorides, to afford sulfonamides **1–15** (Figure 1). Compounds **1–15** were prepared in moderate to high yields (40–99%) by the reaction of the appropriate amines with the corresponding arylsulfonyl chlorides in anhydrous pyridine at 0 °C. The synthesis of the target compounds followed the procedure described by us for this type of derivative.¹⁶ NMR and HRMS spectral data were used to provide complete structural characterization of sulfonamides **1–15**.

BIOLOGICAL ACTIVITY

In Vitro Activity against *Leishmania* spp. and *T. cruzi*.

Sulfonamides **1–15** were tested for antiprotozoal activity against four different *Leishmania* species (*L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. amazonensis*) and *T. cruzi*, as well as for cytotoxicity against J774 macrophages and NCTC929 fibroblasts, following established procedures (see Experimental Section). Table 1 presents sulfonamide derivatives shown to be active in vitro against *Leishmania* spp. and *T. cruzi* extracellular forms (promastigotes and epimastigotes, respectively). As can be seen in Table 1, compounds **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** displayed promising IC₅₀ values against *T. cruzi* epimastigotes with a moderate–good selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀) on fibroblasts of >4.7, >1.9, >9.9, and >196.9,

Table 1. Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Sulfonamides 1–15 on Extracellular Forms (*Leishmania* promastigotes and *T. cruzi* epimastigotes) and Cytotoxicity on J774 Macrophages and NCTC929 Fibroblasts

	parasites IC ₅₀ ^b (μM)					cell lines CC ₅₀ ^b (μM)	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>	macrophages J774	fibroblasts NCTC929
1a ^f	76.4	48.8	46.4	68.6	156.1	NC ^e	ND ^d
2a ^f	66.2	61.5	84.2	NA ^a	76.1	NC	317
5a	39.5	42.5	24.6	27	136.3	41.3	ND
5b	51.4	37	4.3	82.8	NA	NC	ND
5c	NA	162.1	93.5	93.5	ND	NC	ND
6b	21	29.8	22.6	8.4	ND	60.8	ND
6e	20.3	23	15.8	24.5	97.6	NC	187
7a	81.7	60.8	101.4	197.7	NA	NC	ND
7b	51.5	80.9	25.9	46.2	ND	23.8	ND
7d	33.4	13.4	29.8	14.2	ND	43.9	ND
8a	35.2	16.8	19.6	15.8	ND	132	ND
8b	12.4	23	10.4	18.2	ND	194.8	ND
8c	23.4	29	20.9	15.4	NA	NC	ND
8d	34.5	42.7	116.6	12.5	ND	40.4	ND
8e	11.9	11.6	13.6	7.4	ND	24.6	ND
9a ^f	61.3	80.8	139.6	66.7	ND	132.9	ND
9c	37.3	40.3	47.9	38.7	NA	NC	ND
9d	65.4	86.6	101.9	115.7	NA	NC	ND
9e	37.3	39.7	52.8	37.7	ND	30	ND
10a	43.3	21.7	48.1	60.3	NA	NC	ND
10b	43.5	35.6	46.1	59.1	25.9	NC	211
10d	94.8	88.8	96.3	107.9	1.3	NC	223
12a	85.5	31	53.7	89.6	NA	NC	ND
12c	18.4	30.6	23.7	82.6	NA	NC	ND
14c	112.4	115.3	54.3	40.9	NA	NC	ND
14d	6.7	9.9	7.2	24.6	NA	NC	ND
15d	NA	NA	NA	NA	113.7	NC	>310
M ^c	17.6	7.6	44.6	34.1		135.9	ND
B ^c					54.7	NC	>194

^aNA, nonactive at tested concentrations. ^bIC₅₀, concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites; CC₅₀, concentration of the compound that produced a 50% reduction of cell viability in treated culture cells with respect to untreated ones. ^cM, miltefosine; B, benznidazole. ^dND, not determined. ^eNC (noncytotoxic), CC ≥ 300 μM. ^fData published in ref 17.

respectively. Moreover, compounds **10b** and **10d** exhibited higher activity than the reference drug benznidazole: **10b** (IC₅₀ = 25.9 μM), **10d** (IC₅₀ = 1.3 μM), and benznidazole (IC₅₀ = 54.7 μM) ($p < 0.05$ and 0.01 , respectively).

As outlined in Table 1, from the antiparasitic screening against cultured promastigotes of *Leishmania* spp., 12 compounds (**1a**, **2a**, **5b**, **6e**, **8c**, **9c**, **9d**, **10a**, **10b**, **12a**, **12c**, and **14d**) displayed activity at the micromolar level, without cytotoxicity on J774 macrophage cells (CC₅₀ ≥ 300 μM). Whereas sulfonamides **1a**, **2a**, **5b**, **9d**, and **12a** showed lower activity compared to the standard drug miltefosine, used as reference ($p < 0.05$), compounds **6e**, **8c**, **9c**, **10a**, **10b**, **12c**, and **14d** showed IC₅₀ values close to that of miltefosine ($p = 1.00$), the sulfonamides **6e**, **8c**, **9c**, **12c** and **14d** being the most active compounds. Although their potency against some *Leishmania* species was lower when compared to that of miltefosine, overall our compounds showed better selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀), resulting in promising therapeutic utility.

It is interesting to note that sulfonamide **2a** was active against all *Leishmania* species except for *L. amazonensis*, whereas compound **5b** exhibited a higher activity against *L. guyanensis* promastigotes (IC₅₀ = 4.3 μM) in comparison to those of *L. infantum* (IC₅₀ = 51.4 μM), *L. braziliensis* (IC₅₀ = 37 μM), and *L. amazonensis* (IC₅₀ = 82.8 μM). These results pointed toward

different susceptibility among *Leishmania* species to these compounds.

Sulfonamides **6e**, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d**, the most potent compounds in the antipromastigote assay (selectivity index ranging from >10.4 to >16.2 for **6a**, from >8.8 to >16.6 for **8c**, from >5.3 to >6.9 for **9c**, from >3.1 to >13.9 for **12c**, and from >10.4 to >38.2 for **14d**, among the species), could be good candidates for subsequent investigations against the clinically relevant *Leishmania* amastigote forms. Consequently, these sulfonamides were tested against *L. amazonensis* and *L. infantum* amastigotes. The antileishmanial activity of these derivatives decreased against the intracellular forms, in comparison to extracellular forms, except for **9c**, **12c**, and **14d** on *L. amazonensis*, where a higher profile against amastigotes than promastigotes was shown. Likewise, compounds **2a**, **6e**, **10b**, and **10d**, with activity against *T. cruzi* epimastigotes, were assayed in an in vitro model of intracellular *T. cruzi* amastigotes. Of the five compounds tested, sulfonamides **6e**, **10b**, and **10d** showed higher activity than the reference compound benznidazole (Table 2).

In Vivo Activity against *L. infantum*. Supported by the in vitro leishmanicidal efficacy, sulfonamides **6e**, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d** were also evaluated in vivo in a murine model of acute infection by *L. infantum*. The compounds were assayed at concentrations of 5 mg/kg, administered daily by the

Table 2. In Vitro Activity of Sulfonamides on *L. amazonensis*, *L. infantum*, and *T. cruzi* Intracellular Forms (amastigotes)

compd	intracellular amastigotes IC ₅₀ ^a (μM)		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>
2a	NA ^c	NA	223.7
6e	23.0	42.9	141.15
8c	47.3	64.1	NA
9c	83.2	30.8	NA
10b	NA	NA	12.35
10d	NA	NA	28.5
12c	39.2	77.5	NA
14d	7.1	18.0	NA
M ^b	23.7	20.9	
B ^b			192.1

^aIC₅₀, concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites. ^bM: miltefosine, B: benznidazole. ^cNA, nonactive at tested concentrations

intraperitoneal route up to a total of five doses, using a method previously described.¹⁶ In a subsequent study, an additional dose of 10 mg/kg/day of compound 9c was also tested. The results are summarized in Table 3.

Table 3. In Vivo Antileishmanial Effect of Sulfonamides 6e, 8c, 9c, 12c, and 14d against *L. infantum*

compd	percentage reduction (mean ± SD) ^a	
	spleen	liver
6e	NS ^b	NS
8c	NS	NS
9c (5 mg/kg dose)	55.50 ± 18.53*	78.90 ± 37.10*
9c (10 mg/kg dose)	96.34 ± 3.83**	97.57 ± 2.55**
12c	53.51 ± 67.09	NS
14d	80.17 ± 18.53**	NS

^aReduction of parasite burden in spleens and livers of treated mice in relation to those in the control (untreated) groups expressed as percentage. The standard deviation (SD) was calculated by comparing individual data for each treated animal with the mean value for the control group. ^bNS: No suppression of parasite burden. **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

Two out of the five compounds tested (6e, 8c) did not show any *L. infantum* growth inhibition, suggesting a poor bioavailability. Compound 12c was moderately active against spleen parasites but not against those in the liver, probably due to a rapid biotransformation of the compound in the latter organ. Compound 14d was totally inactive against liver parasites as well; however, it exhibited high leishmanicidal activity against spleen forms (80.17 ± 18.53% reduction regarding controls). Unfortunately, the administration of 14d was followed by the appearance of clear signs of hyperactivity together with local skin irritation. The sulfonamide 9c was the only compound that displayed good activity against both spleen and liver parasite forms with marked increase at 10 mg/kg dose (96.34 ± 3.83% and 97.57 ± 2.55% reduction, respectively, regarding untreated controls). No evident signs of toxicity, such as gross weight loss or hair loss, were observed in any of the animals at the end of the assay, strongly suggesting that 9c is well-tolerated by the infected mice. Therefore, sulfonamide 9c can be seen as a promising prototype compound for treating leishmaniasis.

In Vivo Anti-*T. cruzi* Activity. Taking into consideration the in vitro anti-*T. cruzi* activity of compounds 2a, 6e, 10b, and 10d, in vivo assays in a murine model of acute infection by *T. cruzi* were performed, as previously described.^{18–20} Sulfonamides 2a, 6e, 10b, and 10d were administered intraperitoneally (10 mg/kg/day) for 5 days. A group of untreated mice was also included as control.

The in vivo results are shown in Table 4. Overall, the isoquinolyl derivative 6e exhibited the highest antiparasitic

Table 4. Percentage Reduction of *T. cruzi* Parasitemia in BALB/c Mice Treated after Three and Five Doses of Compounds 2a, 6e, 10b, and 10d

compd	percentage reduction (mean ± SD)	
	8 dpi ^a (three doses ^b)	10 dpi ^a (five doses ^b)
2a	14 ± 7	57 ± 24
6e	72 ± 20	60 ± 9
10b	−10 ± 25	14 ± 15
10d	−50 ± 20	44 ± 19

^adpi: days postinfection. ^b10 mg/kg/day ip.

activity with 72% and 60% reduction of parasitemia, after the administration of three and five doses, respectively. The *p*-nitrobenzene pyrazin-2-yl derivative 2a was less active than 6e, with 14% and 57% reduction in parasitemia. The remaining compounds (sulfonamides 10b and 10d) were not active, and even an increase in parasitemia was observed after three doses. Nevertheless, when five doses of both compounds were given a reduction of 14% and 44% was recorded.

As outlined in Figure 2, the sulfonamide 6e showed the lowest parasitemia levels after three and five doses (Figure 2A). Moreover, the percentage of survival in treated mice with this compound was higher than for untreated controls (Figure 2B). In the case of sulfonamide 2a, the survival rate in treated mice remained always lower than that recorded for the controls. Unfortunately, compounds 10b and 10d, which had displayed the best in vitro IC₅₀ values (Tables 1 and 2), showed a poor in vivo activity as assessed in reduction of parasitemia (Figure 2A) as well as and survival rates (Figure 2B).

These findings encourage supplementary investigations on sulfonamide 6e as a potential new trypanocidal drug. Assays with higher dosing in frequency and/or drug quantity should be advisable.

■ CONFOCAL MICROSCOPY

In the literature, it has been reported that sulfonamides possess selective antimicrotubule activity against kinetoplastids.^{21,22} Consequently, immunofluorescence studies with confocal microscopy, using specific antibodies against β-tubulin, were carried out to evaluate the effect of sulfonamides 9c and 14d on the tubulin distribution profile in *L. infantum* promastigotes.

Confocal microscopic analysis clearly showed the effects of sulfonamide derivatives 9c and 14d on *L. infantum* promastigotes after in vitro incubation for 24 and 48 h, in comparison to untreated controls. As shown in untreated promastigotes (Figure 3, A1–A6), antitubulin antibody is homogeneously bound alongside cell cytoskeleton. This pattern is visibly altered after 24 h incubation with compound 14d, where an irregular binding pattern of the antibody onto parasite cytoskeleton was observed (Figure 3, B1–B3). This disorganizing effect was even more dramatic after 48 h, involving also the

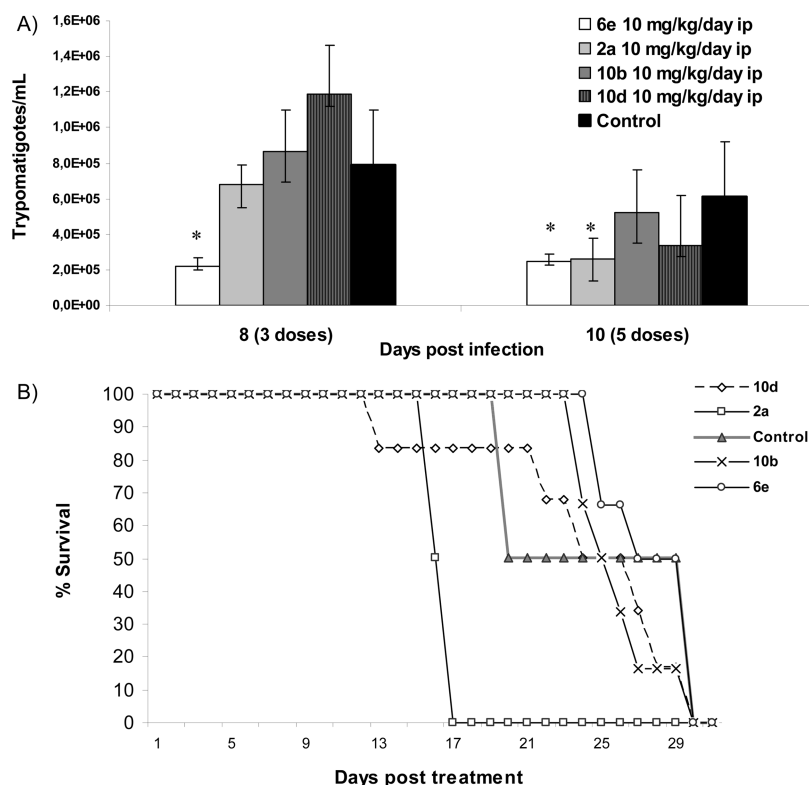


Figure 2. Survival of *T. cruzi* infected mice. (A) Parasitemia levels during the acute infection period in BALB/c mice infected with 10^4 bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi*. Mice were treated with **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** for 5 days consecutively (5–10 postinfection). Parasitemia was determined by counting the number of trypomastigotes in $5 \mu\text{L}$ of fresh blood collected from the tail (means \pm SEMs). $*p < 0.05$. Bar (left to right): **6e**, **2a**, **10b**, **10d**, and control. (B) Percentage of mouse survival in the control and sulfonamides **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** treatment.

DNA (Figure 3, B4–B6). As shown with propidium iodide staining, the kinetoplast DNA (kDNA) is missing and the nuclei appear to be undergoing apoptosis (Figure 3, B5). Immunofluorescence images of *Leishmania* promastigotes treated with sulfonamide **9c** show a marked disorganizing effect on microtubules after 48 h of contact (Figure 3, section C1 and C4 as compared to A1 and A4). However, in contrast to compound **14d**, no evident changes on nuclear and kinetoplastid DNA were evidenced (Figure 3, C5–C6). Therefore, cytoskeleton β -tubulin appears to be exclusively targeted by compound **9c**, whereas neither nuclear nor kinetoplastid DNA seem to be altered for this compound.

Microtubules are vital for cell shape, form, motility, growth differentiation, and survival/infectivity of Kinetoplastid parasites.^{23,24} In this context, recent research has shown the antitubulin activity of sulfonamide-containing compounds,^{25,26} analogously to our results.

Structure–Activity Relationship Studies and in Silico Pharmacokinetic Evaluation. A structure–activity relationship (SAR) analysis was carried out to establish structural features for the antiprotozoal efficacy. Regarding to the relationships between the structure of the *N*-substituent on the sulfonamide moiety and the detected antiparasitic properties, it seems that the nature of the heterocyclic scaffold is important for the activity. None of the amino monocyclic aromatic derivatives (compounds **1b**, **1c**, **2b–d**, **3a–e**, and **4a–c**) showed an improvement in potency over the hit compounds **1a** and **2a** (data not shown). However, analogues where the monocyclic rings of compounds **1–4** were replaced by bicyclic heteroaromatic rings (compounds **5–12**) showed overall an increase in potency, suggesting the requirement of a benzo-

fused aromatic substructure for optimal effect. Thus, among the benzo-fused heteroaromatic series, the best in vitro activities against *Leishmania* spp. and *T. cruzi*, without toxicity on mammalian cells, were achieved by an isoquinoline (**6e**), an indole (**8c**), indazoles (**9c**, **10b**, **10d**), and a benzothiazole (**12c**). On the other hand, when ring systems containing saturated heterocycles, such as compounds **13–15**, were considered, only the naphthyl-substituted derivative 3-methylpiperidine **14d** exhibited excellent in vitro leishmanicidal efficacy. Therefore, the presence of the naphthyl substituent on the sulfonamide group seems useful for enhancing the antiprotozoal activity.

In addition, we also aim to test the influence of the substituents in the *para*-position of the benzenesulfonyl moiety. In relation to the leishmanicidal efficacy, the most active compounds against *Leishmania* amastigotes without cytotoxicity were the nonsubstituted sulfonamides **6e**, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d**, whereas the addition of an electron-withdrawing substituent did not increase the antileishmanial properties. On the other hand, the in vitro trypanocidal screening revealed the halogenated *p*-chloro- and *p*-fluorobenzenesulfonamides **10b** and **10d** as potent anti-*T. cruzi* compounds, with IC_{50} values lower than for the reference drug benznidazol.

Surprisingly, the presence of the nitro group on the benzenesulfonamide moiety did not confer good antiprotozoal activities, as might be expected taking into account our previous results.¹⁶ This fact indicates different mechanisms of action for the studied compounds, suggesting a different target. Probably, a combination of the electronic distribution, the size, and the lipophilicity of the compounds could explain the differences in the antiparasitic activity.

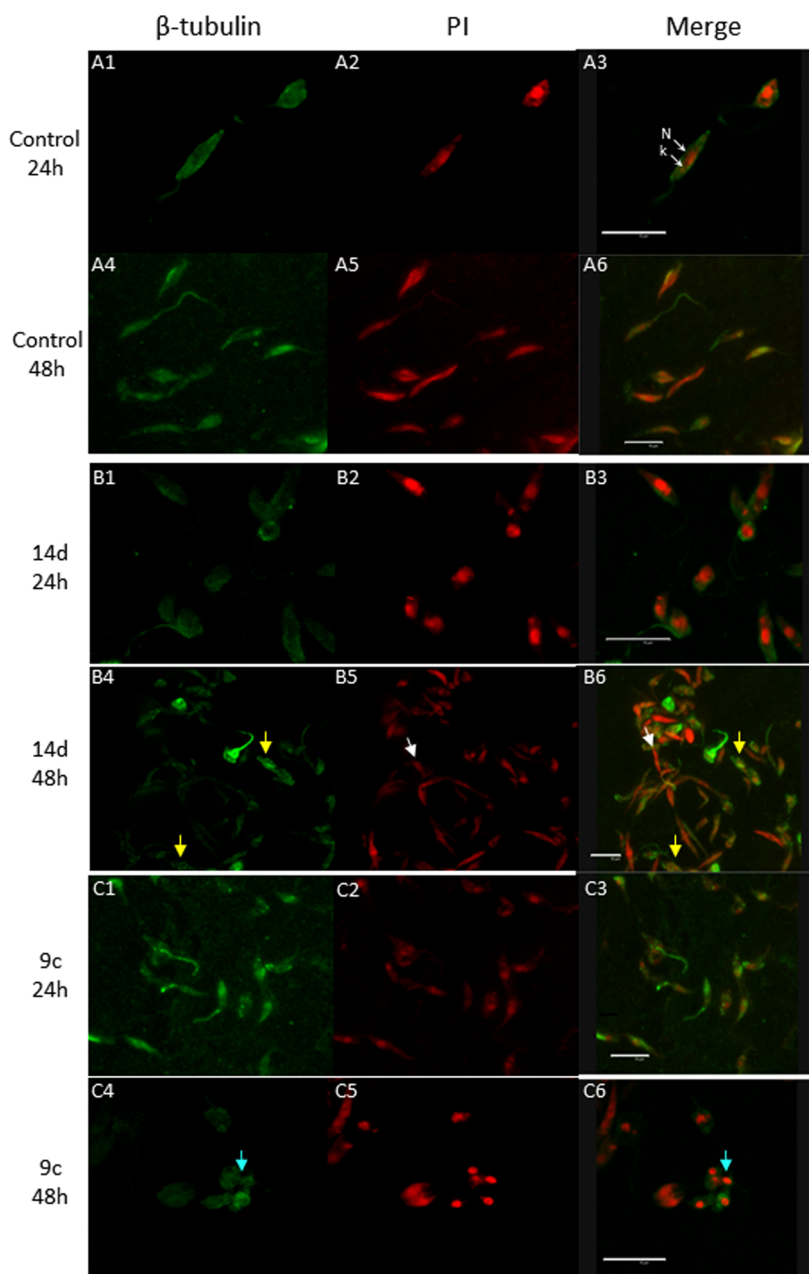


Figure 3. The effect of compounds **9c** and **14d** on tubulin in log-phase promastigotes: Section A shows untreated promastigotes after 24 h (A1–A3) and 48 h (A4–A6) incubation, section B are promastigotes after treatment with **14d** for 24 h (B1–B3) and 48 h (B4–B6), and section C shows promastigotes treated with **9c** for 24 h (C1–C3) and 48 h (C4–C6). Panels A1, A4, B1, B4, C1, and C4 show anti- β -tubulin green fluorescence; panels A2, A5, B2, B5, C2, and C5 show propidium iodide staining; and panels A3, A6, B3, B6, C3, and C6 are the merged images. Scale bar represents 10 μm . In Figure A3, K indicates kinetoplastid and N, the nucleus. Yellow arrows indicate irregular tubulin accumulation in parasite cytoskeleton, white arrows mark nuclear and kinetoplastid DNA alterations, and blue arrows show a marked disorganizing effect on microtubules.

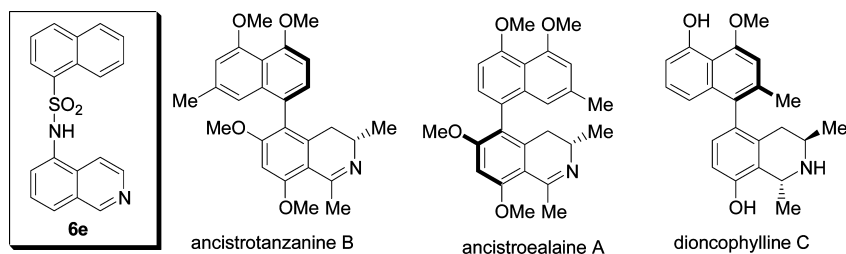


Figure 4. Naphthylisoquinoline alkaloids ancistrotanzanine B, ancistroealaine A, and dioncophylline C and the structurally related analog sulfonamide **6e**.

Remarkably, when sulfonamides were screened for in vivo activity against *T. cruzi*, quite good activity was found for compound **6e**, a simplified analog of dioncophyline C, ancistrotanzanine B, and its atropisomer ancistroalaine A, a natural naphthylisoquinoline alkaloids with known activities against various tropical diseases, such as malaria, leishmaniasis, and Chagas disease.²⁷ In compound **6e**, instead of the naphthyl group at the 5-position bearing three substituents, as found in the natural naphthylisoquinoline alkaloids dioncophyline C, ancistrotanzanine B, and ancistroalaine A, a naphthyl moiety without substituents is coupled with the isoquinoline ring, through an additional sulfonamide bridge between the naphthalene and the isoquinoline portions. Moreover, the isoquinoline portion is significantly simplified by the fact that it is now devoid of the two methyl groups at C-1 and C-3, thus avoiding the existence of any of the stereogenic centers present in the natural alkaloids (Figure 4).

Finally, compounds **6e** and **9c**, the most in vivo antiprotozoal active sulfonamides, were also submitted to an in silico pharmacokinetic properties evaluation.²⁸

Since good absorption is necessary for oral administration, we analyzed the number of free rotatable bonds (n-ROTB) and Lipinski's "rule of five" for both derivatives. Lipinski descriptors describe the molecular properties for drug pharmacokinetics in the human body, especially for oral absorption. The rule states that the most "druglike" molecules present $\text{clogP} \leq 5$, molecular weight ≤ 500 , number of hydrogen bond acceptors ≤ 10 , and hydrogen bond donors ≤ 5 . Compounds **6e** and **9c**, analogously to other antileishmanial and antimalarial sulfonamides,^{15c} showed excellent n-ROTB values (≤ 10) and fulfilled the Lipinski rule of five, an important characteristic for future drug development. In addition, ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) properties were calculated using admetSAR (<http://www.admetexp.org/>), a freely accessible Web-based application.^{28b} The predicted data for BBB (blood–brain barrier) penetration, HIA (human intestinal absorption), and Caco-2 cell permeability are positive for **6e**. In the case of compound **9c**, although permeability is negative, it has a moderate probability value. In the case of metabolism, various cytochrome P450 (CYP) were evaluated. In terms of toxicity, it was found that both compounds may not show mutagenic toxicity with respect to the AMES test and carcinogen effect. Lipinski data and the predicted data of some ADMET properties of compounds **6e** and **9c** are summarized in Table 5.

CONCLUSION

In summary, we have reported the design, synthesis, and antiparasitic activity of a small library of readily available new *N*-substituted benzene and naphthalenesulfonamide derivatives **1–15**.

Compounds **6e**, **8c**, **9c**, **12c**, and **14d** demonstrated potent inhibition on the promastigote form of four *Leishmania* species (*L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. amazonensis*). They were also active on the amastigote form of *L. amazonensis* and *L. infantum*. Finally, in vivo antileishmanial screening and computational studies revealed the indazolyl derivative **9c** as a good candidate for preformulation studies and clinical development.

Compounds **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** displayed remarkable activity toward *T. cruzi* epimastigotes. Studies in vivo on these sulfonamides indicated that **6e** showed a substantial reduction in parasitemia levels in a murine model of acute Chagas disease.

Table 5. Oral Bioavailability, Molecular Properties, and Predicted ADMET Properties of Compounds **6e** and **9c**^a

	6e		9c	
	result	probability (%)	result	probability (%)
Absorption				
BBB	+	96.80	+	97.33
HIA	+	99.55	+	100.00
Caco-2	+	70.12	–	51.36
Metabolism				
CYP450 2C9 substrate	NS	75.39	NS	76.15
CYP450 2D6 substrate	NS	81.45	NS	80.95
CYP450 3A4 substrate	NS	66.10	NS	65.93
CYP450 1A2 inhibitor	I	90.43	I	89.57
CYP450 2C9 inhibitor	I	61.63	I	54.59
CYP450 2D6 inhibitor	I	55.60	NI	60.41
CYP450 2C19 inhibitor	I	77.96	I	78.52
CYP450 3A4 inhibitor	NI	53.44	NI	58.57
Toxicity				
AMES toxicity	–	85.79	–	73.95
carcinogens	–	88.98	–	82.38
n-ROTB (≤ 10)	2		2	
Lipinski Molecular Descriptors				
HBA (≤ 10)	4		5	
HBD (≤ 5)	1		2	
clogP (≤ 5)	3.40 ± 0.76		1.97 ± 0.78	
MW (≤ 500)	334.39		273.31	

^aBBB, blood–brain barrier; HIA, human intestinal absorption; I, inhibitor; NI, noninhibitor; NS, nonsubstrate; n-ROTB, number of rotatable bonds; HBA, number of hydrogen bond acceptors; HBD, number of hydrogen bond donors; clogP, logarithm of compound partition coefficient between *n*-octanol and water; MW, molecular weight.

Moreover, **6e** showed excellent in silico Lipinski and n-ROTB values. Therefore, **6e** is a promising anti-*T. cruzi* candidate, and further clinical investigation could be useful in the development of new antichagasic drugs.

In this work, we demonstrate the antinuclear and/or antitubulin effects on *L. infantum* promastigotes of compounds **9c** and **14d**, by confocal microscopy analysis. Thus, our previous findings on the mode of action of leishmanicidal sulfonamides have been extended by using alternative molecular tools and, at the same time, opening new windows toward the precise characterization of the mechanism of action of these compounds.

In conclusion, the *N*-isoquinolin-5-yl-1-naphthalenesulfonamide (**6e**) and *N*-(1*H*-indazol-5-yl)benzenesulfonamide (**9c**) represent an important class of simple and readily obtainable compounds with promising in vivo activity against *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites and interesting in silico ADME properties. Both sulfonamides might be useful lead scaffolds in the development of new antiprotozoals, and therefore, they merit further pharmacological exploration.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry. General. All reagents were purchased from Aldrich and used without purification. All experiments were made under nitrogen atmosphere. Melting points were determined with a Kofler hot-stage apparatus and are uncorrected. Column chromatography was performed using silica gel (Merck 60, 70–230 mesh). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AC-300 instrument. Chemical shifts (δ values) and coupling constants (J values) are given in parts per million and hertz, respectively. HRMS were obtained using a VG Autospec TRIO 1000 instrument. The ionization mode used in mass spectra was electron impact (EI), fast atom bombardment (FAB), or time-of-flight mass spectrometry (TOFMS). Elemental analysis was performed by the Servicio de Espectroscopía Atómica, Molecular y Óptica, Universitat de València-SCSIE (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental), València, Spain. The purity of the compounds ($\geq 95\%$) and molecular mass were confirmed by elemental microanalysis and HRMS. The analytical results for C, H, and N were within ± 0.4 of the theoretical values. Compounds **1a**, **2a**, **3a**, **3c**, and **9a** were synthesized as previously described.¹⁶

General Procedure for the Synthesis of Sulfonamides 1–15. To an ice-cooled solution of the amine (20 mmol) in pyridine (8 mL) was slowly added the corresponding sulfonyl chloride (30 mmol) in pyridine (6 mL). The mixture was stirred at 0 °C for 2 h and allowed to reach room temperature. Water was added (100 mL) and the solid was collected and recrystallized from MeOH:CH₂Cl₂.

4-Cyano-N-pyrimidin-2-ylbenzenesulfonamide (1b). Yield 40%; mp 132–133 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.05 (t, J = 5, 1H), 8.06 (d, J = 8.7, 2H), 8.11 (d, J = 8.7, 2H), 8.50 (d, J = 5, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 115.4 (CH), 118.1 (C), 126.8 (CN), 128.5 (CH), 133.4 (CH), 145.4 (C), 156.8 (C), 158.6 (CH); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₁H₆N₄O₂S 261.0446, found 261.0450.

N-Pyrimidin-2-yl-1-naphthalenesulfonamide (1c). Yield 40%; mp 199–202 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.93 (t, J = 5, 1H), 7.67 (m, 3H), 8.05 (d, J = 7.5, 1H), 8.22 (d, J = 8, 1H), 8.40 (m, 3H), 8.77 (d, J = 8, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 115.7 (CH), 124.6 (CH), 124.7 (CH), 127.1 (CH), 127.8 (C), 128.4 (CH), 129.3 (CH), 131.4 (CH), 133.9 (C), 134.6 (CH), 135.3 (C), 157.2 (C), 158.6 (CH); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₄H₁₂N₃O₂S 286.0650, found 286.0647.

4-Cyano-N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamide (2b). Yield 20%; mp 107–110 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 8.08 (d, J = 8.3, 2H), 8.10 (d, J = 8.3, 2H), 8.15 (d, J = 2.7, 1H), 8.21 (d, J = 2.7, 1H), 8.35 (s, 1H); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₁H₆N₄O₂S 261.0446, found 261.0446.

4-Fluoro-N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamide (2c). Yield 52%; mp 212–215 °C (lit.²⁹ mp 180–181 °C); ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.42 (t, J = 9, 2H), 8.03 (dd, J = 5.3, J = 9, 2H), 8.22 (dd, J = 1.3, J = 2.6, 1H), 8.23 (d, J = 2.6, 1H), 8.36 (d, J = 1.3, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 116.6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 18, CH), 130.7 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 6, CH), 135.3 (CH), 136.6 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 18, C), 139.3 (CH), 142.4 (CH), 148.3 (C), 165.0 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 250, C).

N-Pyrazin-2-yl-1-naphthalenesulfonamide (2d). Yield 99%; mp 207–210 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.70 (m, 3H), 8.09 (m, 3H), 8.25 (d, J = 8.2, 1H), 8.33 (d, J = 1.3, 1H), 8.4 (dd, J = 1.1, J = 7.4, 1H), 8.7 (d, J = 8.2, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 124.3 (CH), 124.9 (CH), 127.3 (CH), 127.6 (C), 128.7 (CH), 129.5 (CH), 131.0 (CH), 134.0 (C), 134.7 (CH), 134.8 (C), 135.1 (CH), 138.8 (CH), 142.2 (CH), 148.4 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₄H₁₂N₃O₂S 286.0650, found 286.0648.

N-Thiazol-2-ylbenzenesulfonamide (3b). Yield 57%; mp 167–170 °C (lit.³⁰ mp 171.5–172.5 °C); ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.83 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.52 (m, 3H), 7.80 (m, 2H), 12.76 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 108.6 (CH), 124.8 (CH), 126.1 (CH), 129.3 (CH), 132.4 (CH), 142.7 (C), 169.3 (C).

4-Chloro-N-(4-methylthiazol-2-yl)benzenesulfonamide (3d). Yield 50%; mp 106–108 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.06 (s, 3H), 6.33 (s, 1H), 7.58 (d, J = 8.7, 2H), 7.76 (d, J = 8.7, 2H);

HRMS (EI⁺) m/z calcd for C₁₀H₉ClN₂O₂S₂ 287.9793, found 287.9794.

N-(4-Methylthiazol-2-yl)benzenesulfonamide (3e). Yield 30%; mp 152–153 °C (lit.³¹ mp 161–162 °C); ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.15 (s, 3H), 6.46 (s, 1H), 7.61 (m, 3H), 7.86 (dd, J = 1.7, J = 8.3, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.7 (CH₃), 102.6 (CH), 116.4 (C), 126.1 (CH), 129.2 (CH), 132.2 (CH), 135.0 (C), 168.0 (C).

N-(3-Methylisoxazol-5-yl)-4-nitrobenzenesulfonamide (4a). Yield 54%; mp 148–153 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.03 (s, 3H), 5.49 (s, 1H), 8.04 (d, J = 9.1, 2H), 8.35 (d, J = 9.1, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.8 (CH₃), 86.9 (CH), 124.8 (CH), 128.3 (CH), 147.5 (C), 149.7 (C), 160.8 (C), 165.2 (C); HRMS (EI⁺) m/z calcd for C₁₀H₉N₃O₅S 283.0262, found 283.0264.

4-Chloro-N-(3-methylisoxazol-5-yl)benzenesulfonamide (4b). Yield 45%; mp 158–160 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.29 (s, 3H), 6.14 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.8, 2H), 7.86 (d, J = 8.8, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.4 (CH₃), 95.8 (CH), 129.0 (CH), 129.9 (CH), 138.6 (C), 138.7 (C), 157.6 (C), 170.9 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₀H₁₀ClN₂O₃S 273.0101, found 273.0105.

N-(3-Methylisoxazol-5-yl)benzenesulfonamide (4c). Yield 80%; mp 146–152 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 1.95 (s, 3H), 5.74 (s, 1H), 7.60 (t, J = 7.6), 7.70 (d, J = 7.6, 1H), 7.86 (d, J = 7.6, 2H).

N-Isoquinolin-1-yl-4-nitrobenzenesulfonamide (5a). Yield 54%; mp 195–200 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.24 (d, J = 6.2, 1H), 7.65 (d, J = 6.8, 1H), 7.80 (m, 1H), 7.87 (d, J = 8, 2H), 7.95 (m, 2H), 8.20 (d, J = 8, 2H), 8.54 (d, J = 8.3, 1H), 8.95 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.7 (CH), 117.9 (C), 123.7 (CH), 124.8 (CH), 125.8 (CH), 127.2 (CH), 128.0 (CH), 129.0 (CH), 135.1 (CH), 137.3 (C), 147.7 (C), 154.3 (C), 154.4 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₅H₁₂N₃O₄S 330.0549, found 330.0547. Anal. Calcd for C₁₅H₁₁N₃O₄(H₂O)_{0.6}: C, 52.97; H, 3.61; N, 12.35; S, 9.43. Found: C, 52.85; H, 3.89; N, 12.37; S, 9.11.

4-Chloro-N-isoquinolin-1-ylbenzenesulfonamide (5b). Yield 60%; mp 183–188 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.1 (d, J = 7, 1H), 7.60 (m, 4H), 7.80 (m, 2H), 7.98 (d, J = 8.6, 2H), 8.26 (d, J = 8.3, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 110.9 (CH), 124.2 (C), 127.1 (CH), 127.2 (CH), 128.1 (CH), 128.5 (CH), 128.7 (CH), 129.5 (CH), 134.2 (CH), 137.2 (C), 142.4 (C), 148.0 (C), 152.8 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₅H₁₂ClN₂O₂S 319.0308, found 319.0313.

N-Isoquinolin-1-ylbenzenesulfonamide (5c). Yield 51%; mp 174–176 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.07 (d, J = 7, 1H), 7.57 (m, 5H), 7.80 (m, 2H), 7.98 (dd, J = 1.6, J = 8.1, 2H), 8.38 (d, J = 8.3, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 110.5 (CH), 124.3 (C), 126.1 (CH), 127.1 (CH), 127.2 (CH), 128.4 (CH), 129.4 (CH \times 2), 132.4 (CH), 134.1 (CH), 137.1 (C), 148.0 (C), 152.8 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₅H₁₃N₂O₂S 285.0698, found 285.0693. Anal. Calcd for C₁₅H₁₂N₂O₂S: C, 63.36; H, 4.25; N, 9.85; S, 11.28. Found: C, 63.15; H, 4.13; N, 9.72; S, 11.08.

N-Isoquinolin-1-yl-1-naphthalenesulfonamide (5d). Yield 87%; mp 255–258 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.23 (d, J = 7, 1H), 7.44–7.50 (m, 3H), 7.67 (d, J = 7, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.89 (d, J = 8.3, 2H), 7.97 (m, 3H), 8.54 (d, J = 8.3, 1H), 8.85 (d, J = 8.5, 1H), 8.99 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.7 (CH), 117.9 (C), 124.7 (CH), 124.8 (CH), 125.8 (CH), 126.0 (CH), 126.1 (CH), 127.9 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 129.0 (CH), 129.3 (C), 129.9 (CH), 133.9 (C), 135.1 (CH), 137.3 (C), 144.0 (C), 154.2 (C); HRMS (ES⁺) m/z [M + H] calcd for C₁₉H₁₅N₂O₂S 335.0854, found 335.0848.

N-Isoquinolin-5-yl-4-nitrobenzenesulfonamide (6a). Yield 36%; mp 265–268 °C (lit.³² mp 270 °C); ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.35 (dd, J = 1.2, J = 7.5, 1H), 7.78 (m, 2H), 8.26 (d, J = 8.9, 2H), 8.59 (d, J = 8.9, 2H), 8.62 (d, J = 6.7, 1H), 8.65 (d, J = 6.7, 1H), 9.76 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 116.9 (CH), 117.4 (CH), 120.7 (CH), 123.7 (CH), 126.7 (C), 127.7 (CH), 128.4 (C), 129.4 (C), 132.2 (CH), 145.1 (C), 147.4 (CH), 150.0 (C), 154.6 (CH).

4-Chloro-N-isoquinolin-5-ylbenzenesulfonamide (6b). Yield 84%; mp 205–207 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.58 (m, 3H), 7.66 (m, 3H), 7.99 (d, J = 6, 1H), 8.12 (d, J = 8.2, 1H), 8.51 (d, J = 6, 1H), 9.46 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 117.4 (CH), 127.7 (CH), 128.6 (CH), 128.9 (C), 129.0 (CH), 129.1 (CH), 129.8 (CH), 132.0 (C), 133.0 (C), 138.3 (C), 138.5 (C), 140.4 (CH), 151.6 (CH); HRMS (ES^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ 319.0308, found 319.0301. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}(\text{H}_2\text{O})_{0.3}$: C, 55.57; H, 3.61; N, 8.64; S, 9.89. Found: C, 55.24; H, 3.48; N, 8.79; S, 10.27.

N-Isoquinolin-5-ylbenzenesulfonamide (6c). Yield 40%; mp 198–200 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.42 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.68 (m, 2H), 7.80 (dd, J = 3, J = 8.8, 2H), 7.97 (d, J = 8, 1H), 8.39 (d, J = 6, 1H), 9.26 (s, 1H), 10.44 (bs, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 116.0 (CH), 127.0 (CH), 127.6 (CH), 128.7 (CH), 129.2 (C), 129.6 (CH), 130.1 (CH), 131.9 (C), 133.3 (CH), 135.5 (C), 140.0 (C), 143.2 (CH), 152.8 (CH); HRMS (ES^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 285.0698, found 285.0697.

4-Fluoro-N-isoquinolin-5-ylbenzenesulfonamide (6d). Yield 95%; mp 233–237 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.35 (t, J = 8.7, 2H), 7.46 (d, J = 8, 1H), 7.61 (t, J = 8, 1H), 7.72 (dd, J = 5.2, J = 8.7, 2H), 7.80 (d, J = 6, 1H), 8.00 (d, J = 8, 1H), 8.43 (d, J = 6, 1H), 9.28 (s, 1H), 10.49 (bs, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 115.9 (CH), 116.8 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 22.5, CH), 126.8 (CH), 127.6 (CH), 127.7 (CH), 129.2 (C), 130.1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 9.75, CH), 131.8 (C), 132.0 (C), 136.2 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 3.0, C), 143.3 (CH), 152.8 (CH), 164.7 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 250.5, C); HRMS (TOF^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ 303.0598, found 303.0605.

N-Isoquinolin-5-yl-1-naphthalenesulfonamide (6e). Yield 81%; mp 196–200 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.43 (dd, J = 1.1, J = 7.5, 1H), 7.52 (m, 2H), 7.62 (m, 2H), 7.72 (d, J = 6.5, 1H), 7.90 (d, J = 8, 1H), 8.02 (d, J = 6.5, 1H), 8.04 (d, J = 8, 1H), 8.20 (d, J = 8.3, 1H), 8.24 (dd, J = 1.1, J = 7.5, 1H), 8.78 (d, J = 8.3, 1H), 9.20 (s, 1H), 10.79 (bs, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 124.8 (CH), 126.3 (CH), 126.5 (CH), 127.3 (CH), 127.6 (CH), 128.0 (C), 128.4 (CH), 128.8 (CH), 129.4 (CH), 129.8 (CH), 129.9 (CH), 131.6 (C), 131.9 (C), 132.7 (C), 134.1 (C), 134.8 (CH), 134.9 (C), 143.0 (CH), 152.7 (CH); HRMS (ES^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: 335.0854, found 335.0862. Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 68.24; H, 4.22; N, 8.38; S, 9.59. Found: C, 68.54; H, 4.00; N, 8.72; S, 9.34.

4-Nitro-N-quinoxalin-6-ylbenzenesulfonamide (7a). Yield 98%; mp 251–254 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.64 (dd, J = 2.4, J = 9, 1H); 7.72 (d, J = 2.4, 1H); 8.01 (d, J = 9, 1H); 8.11 (d, J = 9, 2H); 8.37 (d, J = 9, 2H); 8.58 (bs, 1H, NH); 8.81 (d, J = 1.9, 1H); 8.85 (d, J = 1.9, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 116.2 (CH), 124.0 (CH), 125.2 (CH), 128.7 (CH), 131.0 (CH), 138.9 (C), 139.8 (C), 143.0 (C), 144.8 (C), 145.1 (CH), 146.7 (CH), 150.4 (C); HRMS (ES^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ 331.0501, found 331.0506. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$: C, 50.90; H, 3.05; N, 16.96; S, 9.71. Found: C, 51.02; H, 3.31; N, 17.31; S, 9.53.

4-Chloro-N-quinoxalin-6-ylbenzenesulfonamide (7b). Yield 99%; mp 190–192 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.66 (m, 4H), 7.85 (d, J = 9, 2H), 8.01 (d, J = 9, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 11.2 (bs, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 115.7 (CH), 123.9 (CH), 129.0 (CH), 130.1 (CH), 130.9 (CH), 138.3 (C), 138.6 (C), 139.4 (C), 139.0 (C), 143.0 (C), 144.9 (CH), 146.6 (CH); HRMS (ES^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$ 320.0261, found 320.0264. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 52.58; H, 3.15; N, 13.14; S, 10.03. Found: C, 52.63; H, 3.27; N, 13.10; S, 10.04.

N-Quinoxalin-6-ylbenzenesulfonamide (7c). Yield 46%; mp 195–200 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.57 (m, 3H), 7.62 (dd, J = 2.4, J = 9, 1H), 7.68 (d, J = 2.4, 1H), 7.87 (dd, J = 1.7, J = 7.5, 2H), 7.94 (d, J = 9, 1H), 8.6 (bs, 1H, NH); 8.78 (d, J = 1.8, 1H), 8.83 (d, J = 1.8, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 115.3 (CH), 123.8 (CH), 127.1 (CH), 129.9 (CH), 130.7 (CH), 133.7 (CH), 139.5 (C), 139.7 (C), 143.0 (C), 144.7 (CH), 146.6 (CH), 150.0 (C); HRMS (ES^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 286.0650, found 286.0647.

4-Fluoro-N-quinoxalin-6-ylbenzenesulfonamide (7d). Yield 78%; mp 186–190 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.41 (t, J = 8.8, 2H), 7.63 (dd, J = 2.3, J = 9, 1H), 7.70 (d, J = 2.3, 1H), 7.94 (dd, J = 5.1, J = 8.8, 2H), 8.01 (d, J = 9, 1H), 8.80 (d, J = 1.7, 1H), 8.84 (d, J = 1.7, 1H), 11.1 (bs, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 115.6 (CH), 117.1 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 23.25, CH), 123.9 (CH), 130.2 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 9.75, CH), 130.8 (CH), 135.8 (C), 139.5 (C), 139.6 (C), 143.0 (C), 144.8 (CH), 146.6 (CH), 164.8 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 251.25, C); HRMS (TOF^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$ 304.0551, found 304.0661. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 55.44; H, 3.32; N, 13.85; S, 10.57. Found: C, 55.58; H, 3.69; N, 13.96; S, 10.22.

N-Quinoxalin-6-yl-1-naphthalenesulfonamide (7e). Yield 99%; mp 115–119 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 7.38 (m, 1H), 7.65 (m, 4H), 7.78 (td, J = 1.5, J = 7, 1H), 7.92 (d, J = 9, 1H), 8.06 (d, J = 8.3, 1H), 8.21 (d, J = 8.3, 1H), 8.40 (dd, J = 1.3, J = 7.5; 1H), 8.58 (bs, 1H, NH), 8.73 (d, J = 2, 1H), 8.78 (d, J = 2, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 114.1 (CH), 123.0 (CH), 124.3 (CH), 124.9 (CH), 127.5 (CH), 127.6 (C), 128.8 (CH), 129.6 (CH), 130.7 (CH), 134.0 (C), 134.1 (C), 135.3 (CH), 139.2 (C), 139.4 (C), 143.0 (C), 144.5 (CH), 146.5 (CH), 149.9 (CH); HRMS (ES^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 336.0807, found 336.0805.

N-(2-Methyl-1H-indol-5-yl)-4-nitrobenzenesulfonamide (8a). Yield 94%; mp 184–186 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 2.31 (s, 3H), 6.02 (s, 1H), 6.69 (dd, J = 2, J = 8.5, 1H), 7.08 (m, 2H), 7.88 (d, J = 9, 2H), 8.32 (d, J = 9, 2H), 10.08 (bs, 1H, NH), 10.91 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 13.7 (CH₃), 99.6 (CH), 111.1 (CH), 114.0 (CH), 116.7 (CH), 124.7 (CH), 128.0 (C), 128.7 (CH), 129.0 (C), 134.4 (C), 137.3 (C), 145.5 (C), 149.9 (C); HRMS (EI^+) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 331.0626, found 331.0623. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: C, 54.37; H, 3.95; N, 12.68; S, 9.68. Found: C, 54.52; H, 4.21; N, 12.35; S, 9.47.

4-Chloro-N-(2-methyl-1H-indol-5-yl)benzenesulfonamide (8b). Yield 87%; mp 188–190 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 2.39 (s, 3H), 6.20 (s, 1H), 6.95 (dd, J = 2, J = 8.7, 1H), 7.06 (d, J = 2, 1H), 7.15 (d, J = 8.7, 1H), 7.55 (d, J = 8.8, 2H), 7.60 (d, J = 8.8, 2H), 9.8 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 13.7 (CH₃), 99.5 (CH), 111.0 (CH), 113.7 (CH), 116.5 (CH), 128.6 (C), 129.0 (CH), 129.5 (CH), 134.3 (2C), 137.1 (C), 137.7 (C), 138.9 (C). HRMS (TOF^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ 321.0459, found 321.0459. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}(\text{H}_2\text{O})_{0.4}$: C, 54.93; H, 4.24; N, 8.54; S, 9.78. Found: C, 54.70; H, 3.94; N, 8.78; S, 9.51.

N-(2-Methyl-1H-indol-5-yl)benzenesulfonamide (8c). Yield 84%; mp: 182–184 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 2.31 (s, 3H), 6.00 (s, 1H), 6.71 (dd, J = 2, J = 8.5, 1H), 7.06 (d, J = 8.5, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.47 (m, 3H), 7.65 (d, J = 7.2, 2H), 9.72 (s, 1H, NH), 10.85 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 13.7 (CH₃), 99.5 (CH), 110.9 (CH), 113.4 (CH), 116.4 (CH), 124.3 (C), 127.0 (CH), 128.9 (C), 129.3 (CH), 132.7 (CH), 134.2 (C), 137.0 (C), 140.1 (C); HRMS (ES^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 287.0854, found 287.0844. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 61.94; H, 5.02; N, 9.63; S, 11.02. Found: C, 62.22; H, 4.89; N, 9.23; S, 10.66.

4-Fluoro-N-(2-methyl-1H-indol-5-yl)benzenesulfonamide (8d). Yield 92%; mp 155–157 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 2.50 (s, 3H), 6.01 (s, 1H), 6.67 (dd, J = 2, J = 8.7, 1H), 7.06 (d, J = 2, 1H), 7.09 (d, J = 8.7, 1H), 7.33 (t, J = 8.8, 2H), 7.68 (dd, J = 5.1, J = 8.8, 2H), 9.74 (s, 1H, NH), 10.86 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 13.7 (CH₃), 99.5 (CH), 111.0 (CH), 113.7 (CH), 116.3 (CH), 116.6 (CH), 124.5 (C), 128.7 (C), 130.1 (CH), 134.3 (C), 136.3 (C), 137.1 (C), 162 (d, $J_{\text{C-F}}$ = 260, C); HRMS (ES^+) m/z [M + H] calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}$ 305.0760, found 305.0766. Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}(\text{H}_2\text{O})_{0.3}$: C, 58.16; H, 4.42; N, 9.04; S, 10.35. Found: C, 58.10; H, 4.34; N, 9.16; S, 10.22.

2-Methyl-1H-indol-5-yl-1-naphthalenesulfonamide (8e). Yield 44%; mp 198–190 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 2.27 (s, 3H), 5.92 (s, 1H), 6.59 (dd, J = 2, J = 8.7, 1H), 6.99 (m, 2H), 7.50 (t, J = 8.1, 1H), 7.66 (td, J = 1.3, J = 7, 1H), 7.71 (td, J = 1.5, J = 7, 1H), 8.04 (m, 2H), 8.13 (d, J = 8.1, 1H), 8.80 (d, J = 8.7, 1H), 10.10 (s, 1H, NH), 10.78 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ = 13.7 (CH₃), 99.4 (CH), 110.9 (CH), 112.8 (CH), 115.9 (CH), 124.7

(CH), 125.0 (CH), 127.1 (CH), 128.0 (C), 128.2 (CH), 128.7 (C), 128.9 (C), 129.3 (CH), 130.0 (CH), 134.0 (C), 134.2 (CH), 135.2 (C), 137.0 (C), 145.7 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₉H₁₇N₂O₂S 337.1011, found 337.1013. Anal. Calcd for C₁₉H₁₆N₂O₂S: C, 67.83; H, 4.79; N, 8.33; S, 9.53. Found: C, 67.96; H, 5.12; N, 8.15; S, 9.32.

4-Chloro-N-(1H-indazol-5-yl)benzenesulfonamide (9b).³³ Yield 20%; mp 171–173 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.79 (m, 4H), 7.25 (dd, *J* = 0.9, *J* = 8.8, 2H), 7.73 (s, 2H), 12.57 (bs, 1H, NH), 13.06 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 100.9 (CH), 110.6 (CH), 118.5 (CH), 124.2 (C), 129.0 (CH), 129.6 (CH), 131.7 (CH), 135.0 (C), 137.9 (C), 138.6 (C), 142.4 (C).

N-(1H-Indazol-5-yl)benzenesulfonamide (9c). Yield 78%; mp 166–168 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.10 (dd, *J* = 2, *J* = 9, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.51 (m, 3H), 7.69 (dd, *J* = 1.7, *J* = 7, 2H), 7.99 (s, 1H), 10.07 (s, 1H, NH), 13.02 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.0 (CH), 113.2 (CH), 122.6 (CH), 123.1 (C), 127.0 (CH), 129.4 (CH), 130.5 (C), 133.0 (CH), 133.8 (CH), 138.0 (C), 139.7 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₂N₂O₂S 274.0650, found 274.0645. Anal. Calcd for C₁₃H₁₁N₃O₂S: C, 57.13; H, 4.06; N, 15.37; S, 11.73. Found: C, 57.28; H, 4.33; N, 15.09; S, 11.65.

4-Fluoro-N-(1H-indazol-5-yl)benzenesulfonamide (9d). Yield 89%; mp 214–218 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.06 (dd, *J* = 2, *J* = 9, 1H), 7.32 (td, *J* = 2, *J* = 8.8, 2H), 7.41 (d, *J* = 2, 1H), 7.42 (d, *J* = 9, 1H), 7.73 (dd, *J* = 5.3, *J* = 8.8, 2H), 7.99 (s, 1H), 10.0 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.1 (CH), 113.6 (CH), 116.5 (d, *J*_{C-F} = 18, CH), 122.8 (CH), 123.2 (C), 130.0 (d, *J*_{C-F} = 6, CH), 130.3 (C), 133.8 (CH), 136.0 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 138.1 (C), 164.5 (d, *J*_{C-F} = 250, C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₁FN₃O₂S 292.0556, found 292.0559. Anal. Calcd for C₁₃H₁₀FN₃O₂S: C, 53.60; H, 3.46; N, 14.42; S, 11.01. Found: C, 53.61; H, 3.30; N, 14.49; S, 10.63.

N-(1H-Indazol-5-yl)naphthalene-1-sulfonamide (9e). Yield 91%; mp 196–199 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.98 (dd, *J* = 2, *J* = 9, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.53 (t, *J* = 7.8, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.91 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.8, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.3, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.4, 1H), 8.77 (d, *J* = 8.4, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 111.1 (CH), 112.3 (CH), 121.9 (CH), 123.1 (C), 124.7 (CH), 124.8 (CH), 127.3 (CH), 127.9 (C), 128.4 (CH), 129.4 (CH), 130.1 (CH), 130.3 (C), 133.7 (CH), 134.0 (C), 134.5 (CH), 134.8 (C), 137.8 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₇H₁₄N₃O₂S 324.0801, found 324.0808. Anal. Calcd for C₁₇H₁₃N₃O₂S: C, 63.14; H, 4.05; N, 12.99; S, 9.92. Found: C, 63.30; H, 4.39; N, 13.20; S, 9.53.

N-(1H-Indazol-6-yl)-4-nitrobenzenesulfonamide (10a). Yield 65%; mp 185–188 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.9 (dd, *J* = 1.7, *J* = 8.7, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.95 (s, 1H), 8.0 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.35 (d, *J* = 8.8, 2H), 10.72 (bs, 1H, NH), 12.91 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 101.3 (CH), 115.5 (CH), 120.6 (C), 121.9 (CH), 125.0 (CH), 128.6 (CH), 133.8 (CH), 135.5 (C), 140.4 (C), 145.2 (C), 150.2 (C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₁N₄O₄S 319.0496, found 319.0486.

4-Chloro-N-(1H-indazol-6-yl)benzenesulfonamide (10b). Yield 95%; mp 187–191 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.89 (dd, *J* = 1.7, *J* = 8.7, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.62 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.95 (s, 1H), 10.48 (bs, 1H, NH), 12.90 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 100.9 (CH), 115.4 (CH), 120.4 (C), 121.7 (CH), 128.9 (CH), 129.8 (CH), 133.8 (CH), 136.0 (C), 138.2 (C), 138.6 (C), 140.4 (C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₀ClN₃O₂S 308.0255, found 308.0251. Anal. Calcd for C₁₃H₁₀ClN₃O₂S: C, 50.73; H, 3.27; N, 13.65; S, 10.42. Found: C, 50.49; H, 3.01; N, 13.31; S, 10.10.

N-(1H-Indazol-6-yl)benzenesulfonamide (10c). Yield 93%; mp 180–184 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.91 (dd, *J* = 2, *J* = 8.6, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.53 (m, 3H), 7.60 (d, *J* = 8.6, 1H), 7.78 (dd, *J* = 8.1, *J* = 1.5, 2H), 7.94 (s, 1H), 10.43 (bs, 1H, NH), 12.87 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 100.4 (CH), 115.2 (CH), 120.2 (C), 121.6 (CH), 127.0 (CH), 129.6 (CH), 133.3 (CH), 133.8 (CH), 136.4 (C), 139.8 (C), 140.5 (C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₂N₃O₂S 274.0645, found 274.0645. Anal. Calcd for

C₁₃H₁₁N₃O₂S: C, 56.02; H, 4.19; N, 15.08; S, 11.50. Found: C, 56.01; H, 4.46; N, 14.80; S, 11.52.

4-Fluoro-N-(1H-indazol-6-yl)benzenesulfonamide (10d). Yield 96%; mp 159–162 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.88 (dd, *J* = 1.8, *J* = 8.7, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.37 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.81 (dd, *J* = 5.2, *J* = 8.8, 2H), 7.95 (s, 1H), 10.44 (s, NH), 12.89 (s, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 100.7 (CH), 115.3 (CH), 116.8 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 120.3 (C), 121.7 (CH), 130.0 (d, *J*_{C-F} = 7.5, CH), 130.3 (C), 133.9 (CH), 136.0 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 140.4 (C), 164.5 (d, *J*_{C-F} = 247.5, C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₁FN₃O₂S 292.0551, found 292.0549. Anal. Calcd for C₁₃H₁₀FN₃O₂S(H₂O)_{0.4}: C, 52.31; H, 3.65; N, 14.08; S, 10.74. Found: C, 52.11; H, 3.24; N, 13.72; S, 11.00.

N-(1H-Indazol-6-yl)naphthalene-1-sulfonamide (10e). Yield 75%; mp 207–210 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 6.88 (dd, *J* = 1.7, *J* = 8.7, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.7, 1H), 7.59 (t, *J* = 7.8, 1H), 7.65 (dd, *J* = 7.2, *J* = 7.7, 1H), 7.75 (ddd, *J* = 1.3, *J* = 6.8, *J* = 8.5, 1H), 7.88 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.5, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.6, 1H), 8.78 (d, *J* = 8.7, 1H), 10.80 (s, 1H, NH), 12.77 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 99.3 (CH), 114.5 (CH), 120.3 (C), 121.6 (CH), 124.6 (CH), 124.8 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (C), 128.6 (CH), 129.5 (CH), 130.2 (CH), 133.7 (CH), 134.1 (C), 134.6 (C), 134.8 (CH), 136.1 (C), 140.4 (C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₇H₁₄N₃O₂S 324.0801, found 324.0798.

N-Benzothiazol-2-yl-4-nitrobenzenesulfonamide (11a).³⁴ Yield 67%; mp 244–247 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.32 (td, *J* = 2, *J* = 8.1, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 9, 2H), 7.89 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.20 (d, *J* = 9, 2H), 9.50 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 114.8 (CH), 123.3 (CH), 123.7 (CH), 124.5 (CH), 124.7 (C), 127.3 (CH), 127.8 (CH), 140.1 (C), 147.6 (C), 154.5 (C), 169.4 (C).

N-Benzothiazol-2-yl-4-chlorobenzenesulfonamide (11b).³⁵ Yield 47%; mp 212–216 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.28 (td, *J* = 1.5, *J* = 7.9, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.88 (dd, *J* = 0.4, *J* = 7.9, 1H), 9.38 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 115.1 (CH), 123.2 (CH), 124.2 (CH), 125.2 (C), 127.6 (CH), 127.8 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (C), 133.3 (C), 140.1 (C), 147.6 (C), 169.2 (C).

N-Benzothiazol-2-ylbenzenesulfonamide (11c). Yield 87%; mp 262–267 °C (lit.³⁶ mp 288–289); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.20 (td, *J* = 1.5, *J* = 7.9, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.6 (m, 3H), 7.75 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.88 (dd, *J* = 0.4, *J* = 7.9, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 113.2 (CH), 123.1 (CH), 124.1 (CH), 125.1 (C), 126.1 (CH), 127.6 (CH), 129.5 (CH), 132.8 (CH), 136.5 (C), 142.3 (C), 167.4 (C).

N-Benzothiazol-6-yl-4-nitrobenzenesulfonamide (12a). Yield 99%; mp 242–247 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.26 (dd, *J* = 2, *J* = 8.7, 1H), 7.91 (d, *J* = 2, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.7, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.8, 2H), 8.35 (d, *J* = 8.8, 2H), 9.28 (s, 1H), 10.86 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 114.5 (CH), 120.7 (CH), 124.0 (CH), 125.1 (CH), 128.7 (CH), 134.9 (C), 136.5 (C), 145.0 (C), 150.2 (C), 150.7 (C), 156.4 (CH); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₁₀N₃O₄S₂ 336.0113, found 336.0110. Anal. Calcd for C₁₃H₉N₃O₄S₂: C, 46.56; H, 2.70; N, 12.53; S, 19.12. Found: C, 46.81; H, 2.75; N, 12.82; S, 18.76.

N-Benzothiazol-6-yl-4-chlorobenzenesulfonamide (12b). Yield 88%; mp 221–223 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.24 (dd, *J* = 2, *J* = 8.8, 1H), 7.61 (d, *J* = 6.8, 2H), 7.77 (d, *J* = 6.8, 2H), 7.88 (d, *J* = 2, 1H), 7.96 (d, *J* = 8.8, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.60 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 114.0 (CH), 120.4 (CH), 123.9 (CH), 129.0 (CH), 129.8 (CH), 134.9 (C), 135.3 (C), 138.3 (C), 138.4 (C), 150.5 (C), 156.1 (CH); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₃H₉ClN₃O₂S₂ 324.9872, found 324.9879.

N-Benzothiazol-6-ylbenzenesulfonamide (12c). Yield 96%; mp 204–208 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.26 (dd, *J* = 2, *J* = 8.8, 1H), 7.56 (m, 3H), 7.79 (d, *J* = 7, 2H), 7.87 (d, *J* = 2, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.8, 1H), 9.25 (s, 1H), 10.55 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 113.5 (CH), 120.1 (CH), 123.8 (CH), 127.0 (CH), 129.7 (CH), 133.4 (CH), 134.9 (C), 135.7 (C), 139.6 (C), 150.3 (C), 155.9 (CH); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for

C₁₃H₁₁N₂O₂S₂ 291.0262, found 291.0260. Anal. Calcd for C₁₃H₁₀N₂O₂S₂: C, 53.77; H, 3.47; N, 9.65; S, 22.09. Found: C, 53.77; H, 2.96; N, 9.49; S, 22.45.

N-Benzothiazol-6-yl-4-fluorobenzenesulfonamide (12d). Yield 97%; mp 231–233 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.25 (dd, *J* = 2.1, *J* = 8.8, 1H), 7.37 (t, *J* = 8.8, 2H), 7.84 (dd, *J* = 5.3, *J* = 8.8, 2H), 7.88 (d, *J* = 2.1, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.8, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.60 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 113.8 (CH), 116.8 (d, *J*_{C-F} = 22.5, CH), 120.4 (CH), 123.8 (CH), 130.1 (d, *J*_{C-F} = 9.75, CH), 134.9 (C), 135.6 (C), 136.0 (d, *J*_{C-F} = 3, C), 150.4 (C), 156.0 (CH), 164.7 (d, *J*_{C-F} = 255, C).

N-(Benzothiazol-6-yl)naphthalene-1-sulfonamide (12e). Yield 98.5%; mp 201–203 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.19 (dd, *J* = 2, *J* = 8, 1H), 7.73 (m, 5 H), 8.06 (d, *J* = 7, 1H), 8.20 (d, *J* = 8, 1H), 8.28 (dd, *J* = 1.2, *J* = 7, 1H), 8.78 (d, *J* = 8, 1H), 9.20 (s, 1H), 10.96 (bs, NH); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 112.3 (CH), 119.2 (CH), 123.7 (CH), 124.6 (CH), 124.8 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (C), 128.6 (CH), 129.5 (CH), 130.4 (CH), 134.1 (C), 134.5 (C), 134.8 (C), 134.9 (CH), 135.6 (C), 149.9 (C), 155.6 (CH); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₇H₁₃N₂O₂S₂ 341.0413, found 341.0422.

1-Methyl-4-(4-nitrobenzenesulfonyl)piperazine (13a). Yield 42%; mp 159–160 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.14 (s, 3H), 2.36 (t, *J* = 4.7, 4H), 2.97 (t, *J* = 4.7, 4H), 8.00 (d, *J* = 9, 2H), 8.45 (d, *J* = 9, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 45.6 (CH₃), 46.0 (CH₂), 53.8 (CH₂), 125.1 (CH), 129.4 (CH), 141.1 (C), 150.4 (C).

4-Chloro-4-methylpiperazin-1-ylbenzenesulfonamide (13b). Yield 49%; mp 109–100 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.26 (s, 3H), 2.53 (m, 4H), 2.95 (m, 4H), 7.75 (m, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 45.0 (CH₃), 45.6 (2 × CH₂), 53.5 (2 × CH₂), 129.8 (CH), 130 (CH), 134.1 (C), 138.7 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₁H₁₆ClN₂O₂S 275.0621, found 275.0621.

4-Methylpiperazin-1-ylbenzenesulfonamide (13c). Yield 60%; mp 130–134 °C (lit.³⁷ mp 129–130 °C); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.14 (s, 3H), 2.36 (t, *J* = 5, 4H), 2.88 (t, *J* = 5, 4H), 7.70 (m, 5H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 45.5 (CH₃), 46.0 (2 × CH₂), 53.8 (2 × CH₂), 127.9 (CH), 129.7 (CH), 133.6 (CH), 135.1 (C).

Methyl-4-(naphthalene-1-sulfonyl)piperazine (13d). Yield 99%; mp 121–124 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.06 (s, 3H), 2.26 (m, 4H), 3.06 (m, 4H), 7.69 (m, 3H), 8.13 (dd, *J* = 1.5, *J* = 8.1, 1H), 8.15 (dd, *J* = 1.3, *J* = 7.3, 1H), 8.29 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.66 (d, *J* = 8.5, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 45.5 (2 × CH₂), 45.6 (CH₃), 54.1 (2 × CH₂), 124.9 (CH), 125.0 (CH), 127.3 (CH), 128.5 (CH), 129.4 (CH), 130.6 (CH), 132.3 (C), 134.3 (C), 135.0 (CH); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₅H₁₉N₂O₂S 291.1167, found 291.1169.

3-Methyl-1-(4-nitrobenzenesulfonyl)piperidine (14a). Yield 81%; mp 147–150 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 0.83 (d, *J* = 6.4, 3H), 0.87 (m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.65 (m, 3H), 1.99 (t, *J* = 11, 1H), 2.30 (td, *J* = 2.4, *J* = 11.5, 1H), 3.53 (t, *J* = 10.5, 2H), 8.0 (d, *J* = 9, 2H), 8.44 (d, *J* = 9, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 19.0 (CH₃), 24.5 (CH₂), 30.6 (CH), 31.5 (CH₂), 46.4 (CH₂), 52.8 (CH₂), 125.0 (CH), 129.3 (CH), 141.8 (C), 150.3 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₂H₁₇N₂O₄S: 285.0909, found 285.0902.

1-(4-Chlorobenzenesulfonyl)-3-methylpiperidine (14b). Yield 43.5%; mp 111–113 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 0.83 (d, *J* = 6.4, 3H), 0.85 (m, 1H), 1.44 (m, 1H), 1.62 (m, 3H), 1.91 (t, *J* = 10.5, 1H), 2.21 (td, *J* = 3, *J* = 11.5, 1H), 3.47 (m, 2H), 7.72 (m, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 19.0 (CH₃), 24.4 (CH₂), 30.5 (CH), 31.5 (CH₂), 46.4 (CH₂), 52.9 (CH₂), 129.7 (CH), 129.9 (CH), 134.8 (C), 138.3 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₂H₁₇ClNO₂S 274.0669, found 274.0663.

1-Benzenesulfonyl-3-methylpiperidine (14c). Yield 74%; mp 98–100 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 0.82 (d, *J* = 6.4, 3H + m, 1H), 1.45 (m, 1H), 1.62 (m, 3H), 1.85 (t, *J* = 11, 1H), 2.17 (td, *J* = 3, *J* = 11.5, 1H), 3.5 (m, 2H), 7.71 (m, 5H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 19.1 (CH₃), 24.5 (CH₂), 30.5 (CH), 31.6 (CH₂), 46.5 (CH₂), 53.0 (CH₂), 127.7 (CH), 129.7 (CH), 133.6 (CH), 135.9 (C); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₂H₁₈NO₂S 240.1058, found 240.1061.

Anal. Calcd for C₁₂H₁₇NO₂S: C, 60.22; H, 7.16; N, 5.85; S, 13.40. Found: C, 60.60; H, 7.51; N, 5.66; S, 13.45.

3-Methyl-1-(naphthalene-1-sulfonyl)piperidine (14d). Yield 84%; mp 65–69 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 0.78 (d, *J* = 6.4, 3H), 0.9 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 1.62 (m, 3H), 2.2 (t, *J* = 10.2, 1H), 2.56 (m, 1H), 3.59 (m, 2H), 7.71 (m, 3H), 8.10 (dd, *J* = 1.5, *J* = 8.7, 1H), 8.15 (dd, *J* = 1.1, *J* = 7.5, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.1, 1H), 8.67 (d, *J* = 8.7, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 18.9 (CH₃), 24.7 (CH₂), 30.7 (CH), 31.7 (CH₂), 45.9 (CH₂), 52.4 (CH₂), 125.0 (CH), 125.0 (CH), 127.3 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (C), 129.4 (CH), 130.2 (CH), 133.3 (C), 134.3 (C), 134.7 (CH); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₆H₂₀NO₂S 290.1215, found 290.1212. Anal. Calcd for C₁₆H₁₉NO₂(H₂O)_{0.4}: C, 64.79; H, 6.73; N, 4.72; S, 10.81. Found: C, 65.06; H, 7.02; N, 5.07; S, 10.65.

2-(4-Nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (15a). Yield 45%; mp 171 °C (lit.³⁸ mp 161 °C); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.86 (t, *J* = 6, 2H), 3.40 (t, *J* = 6, 2H), 4.30 (s, 2H), 7.15 (m, 4H), 8.10 (d, *J* = 9, 2H), 8.41 (d, *J* = 9, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 28.2 (CH₂), 43.8 (CH₂), 47.4 (CH₂), 125.0 (CH), 126.5 (CH), 126.7 (CH), 127.1 (CH), 129.1 (CH), 129.3 (CH), 131.7 (C), 133.2 (C), 142.2 (C), 150.4 (C).

2-(4-Chlorobenzenesulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (15b). Yield 99%; mp 154–156 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.85 (t, *J* = 6, 2H), 3.35 (t, *J* = 6, 2H), 4.22 (s, 2H), 7.14 (m, 4H), 7.70 (d, *J* = 8.7, 2H), 7.84 (d, *J* = 8.7, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 28.3 (CH₂), 43.8 (CH₂), 47.5 (CH₂), 126.5 (CH), 126.8 (CH), 127.0 (CH), 129.0 (CH), 129.7 (CH), 129.9 (CH), 131.8 (C), 133.3 (C), 135.3 (C), 138.5 (C); HRMS (TOF⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₅H₁₅ClNO₂S 308.0507, found 308.0504.

2-Benzenesulfonyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (15c). Yield 97%; mp 156–158 °C (lit.³⁹ mp 158–159 °C); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.84 (t, *J* = 5.7, 2H), 3.22 (t, *J* = 5.7, 2H), 4.20 (s, 2H), 7.13 (m, 4H), 7.64 (t, *J* = 7, 2H), 7.69 (d, *J* = 7, 1H), 7.82 (d, *J* = 7, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 28.3 (CH₂), 43.9 (CH₂), 47.6 (CH₂), 126.5 (CH), 126.8 (CH), 127.0 (CH), 127.8 (CH), 129.0 (CH), 129.8 (CH), 131.9 (C), 133.3 (C), 133.6 (CH), 136.3 (C).

2-(Naphthalen-1-sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (15d). Yield 94%; mp 135–137 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 2.81 (t, *J* = 6, 2H), 3.52 (t, *J* = 6, 2H), 4.40 (s, 2H), 7.12 (m, 4H), 7.7 (m, 3H), 8.1 (dd, *J* = 1.3, *J* = 8, 1H), 8.2 (dd, *J* = 1.3, *J* = 7.3, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.3, 1H), 8.65 (d, *J* = 8.3, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 28.5 (CH₂), 43.2 (CH₂), 46.8 (CH₂), 121 (C), 124.8 (CH), 125.0 (CH), 126.4 (CH), 126.7 (CH), 127.0 (CH), 127.3 (CH), 128.3 (C), 128.6 (CH), 129.1 (CH), 129.5 (CH), 130.2 (CH), 132.2 (C), 133.4 (C), 134.3 (C), 134.9 (CH); HRMS (ES⁺) *m/z* [M + H] calcd for C₁₉H₁₈NNaO₂S 346.0872, found 346.0890. Anal. Calcd for C₁₉H₁₇NO₂S: C, 70.56; H, 5.30; N, 4.33; S, 9.91. Found: C, 70.43; H, 5.45; N, 4.34; S, 9.90.

Biological Activity. Drugs and Reagents. Resazurin sodium salt was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and stored at 4 °C protected from light. The solution of resazurin was prepared at 2.5 mM in phosphate-buffered saline solution (PBS), pH 7.4, and filtered through 0.22 μm prior use. Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG; Roche, Indianapolis, IN) was dissolved in 0.9% Triton X-100 (pH 7.4). Reference drugs miltefosine and benznidazole were purchased from Sigma-Aldrich. The stock solution of benznidazole was prepared in sterile distilled water with 3% Tween 80 and before use it was diluted in sterile distilled water for oral administration.

Leishmanicidal Assays. Parasites and Culture Procedure. The following species of *Leishmania* were used: an autochthonous isolate of *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150) obtained from an asymptomatic dog from the Priorat region (Catalunya, Spain), kindly given by Prof. Montserrat Portús (Universitat de Barcelona); *L. braziliensis* 2903, *L. amazonensis* (MHOM/Br/79/Maria), and *L. guyanensis* 141/93 were kindly provided by Prof. Alfredo Torano (Instituto de Salud Carlos III, Madrid). Promastigotes were cultured in Schneider's insect medium (Sigma) at 26 °C supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma) and 100 U/mL of penicillin plus 100 μg/mL of streptomycin (Sigma) in 25 mL culture flasks.

In Vitro Promastigote Susceptibility Assay. The assay was performed following a method previously described.¹⁶ Briefly, log-phase promastigotes (2.5×10^5 parasites/well) were cultured in 96-well plastic plates. Compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and were added at 2-fold serial dilutions up to 200 μ L final volume. The final solvent (DMSO) concentrations never exceeded 0.2% (v/v). After 48 h at 26 °C, 20 μ L of 2.5 mM resazurin solution was added and the fluorescence intensity (535 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength) was determined with a fluorometer Infinite 200 (Tecan i-Control) to calculate growth inhibition (%). All tests were carried out in triplicate. Miltefosine was used as reference drug. The efficacy of each compound was estimated by calculating the IC_{50} (concentration of the compound that produced a 50% reduction in parasites) and GI% (growth inhibitory percentage).

In Vitro Intracellular Amastigote Susceptibility Assay. The assay was carried out as described by Bilbao-Ramos et al.⁴⁰ Briefly, 5×10^4 J774 macrophages and stationary promastigotes in a 1:10 rate were seeded in each well of a microtiter plate, suspended in 200 μ L of culture medium and incubated for 24 h at 33 °C, 5% CO₂ in a humidity chamber. After this first incubation, the temperature was increased up to 37 °C for another 24 h. Thereafter, cells were washed several times in culture medium by centrifugation at 1500g for 5 min in order to remove free noninfective promastigotes. Finally, the supernatant was replaced by 200 μ L/well of culture medium containing 2-fold serial dilutions of the test compounds in a triplicate assay. Following incubation for 48 h at 37 °C, 5% CO₂ in a humidity chamber, the culture medium was replaced by 200 μ L/well of the lysis solution (RPMI-1640 with 0.048% HEPES and 0.006% SDS) and incubated at room temperature for 20 min. Thereafter, the plates were centrifuged at 1500g for 5 min and the lysis solution was replaced by 200 μ L/well of Schneider's insect medium. The culture plates were then incubated at 26 °C for other 3 days to allow transformation of viable amastigotes into promastigotes and proliferation. Afterward, 20 μ L/well of 2.5 mM resazurin was added, and the plates were left for another 3 h incubation. Finally, fluorescence emission was measured as described above.

In Vivo Leishmanicidal Assay. The in vivo assay was performed in BALB/c mice infected with the virulent *L. infantum* strain MCAN/ES/96/BCN150. The infection was carried out under the same conditions as previously described.¹⁶ Briefly, each mouse was infected with 10^7 promastigotes at stationary phase, given by the intracardiac (ic) route following anesthesia with sodium pentobarbital. The splenic and hepatic parasite burdens were estimated by the limiting dilution assay described by Titus et al.,⁴¹ adapted to the conditions of our laboratory.

The therapeutic protocols were carried out as follows: Mice were randomly sorted into eight groups. One group was kept as untreated control. Treatment started on day 21 postinfection and lasted continuously for 5 days. Animals were dosed once daily and the compounds were administered ip at 5 mg/kg in a 0.1 mL final volume of propylene glycol solution. Seven days later, the mice were sacrificed, and the parasitic burden was evaluated. In a subsequent study, a dose of 10 mg/kg/day of compound **9c** was tested according to the previous schedule.

All animal experiments and procedures were approved by the institution's committee on the ethical handling and protection of laboratory animals used for experimental and other scientific purposes.

Trypanocidal Assays. Parasites and Culture Procedure. For in vitro studies, the clone CL-B5 of *T. cruzi* was used. The parasites, stably transfected with the *Escherichia coli* β -galactosidase gene (*lacZ*), were kindly provided by Dr. F. Buckner through the Universidad Complutense de Madrid (Spain). The epimastigotes were grown at 28 °C in liver infusion tryptose broth (LIT) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin, and streptomycin and harvested during the exponential growth phase.

For in vivo assays, bloodstream trypomastigotes of the Y strain were used throughout and were harvested by heart puncture from *T. cruzi*-infected BALB/c mice on the day of peak parasitemia, as described.¹⁸

Epimastigote Susceptibility Assay. The screening assay was performed in 96-well microplates (SARSTEDT) with cultures that had not reached the stationary phase, as described.⁴² Briefly,

epimastigotes were seeded at 1×10^5 per milliliter in 200 μ L. The plates were then incubated with the drugs at 28 °C for 72 h, at which time 50 μ L of the substrate solution CPRG was added to give a final concentration of 200 μ M. The plates were incubated at 37 °C for an additional 6 h and were then read at 595 nm. Benznidazole was used as reference drug. Each concentration was tested in triplicate. Each experiment was performed twice separately. The efficacy of each compound was estimated by calculating the IC_{50} .

In Vitro Intracellular Amastigote Susceptibility Assay. The activity was evaluated by colorimetric method using CPRG.⁴³ NCTC-929 fibroblasts were established in 24-well tissue culture plates at a previously determined optimal concentration of 2.5×10^3 cells/well. NCTC-929-derived trypomastigotes were added to the monolayers at a parasite:cell ratio of 5:1 and incubated for 24 h at 33 °C with 5% CO₂. The infected cells were then washed twice with PBS to remove the extracellular trypomastigotes. The drugs were added in triplicate to give a final volume of 900 μ L/well. The plates were incubated for 7 days at 33 °C. At this time, 100 μ L of CPRG solution (final concentration 400 μ M) in 0.3% Triton X-100 was added. Following 4 h of incubation at 37 °C, the colorimetric reaction was quantified by measuring optical densities (OD) at 595 nm wavelength. The results were expressed as percentages of anti-amastigote activity (%AA) relative to control wells, as follows: %AA = 100 - (OD experimental wells/OD control wells) \times 100. Background controls (only NCTC-929 cells) were subtracted from all values.

In Vivo Trypanocidal Assay. Mice Infection. BALB/c mice (20–24 g) were obtained from the Animal Facility of the Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción (UNA, Paraguay). Mice were housed at a maximum of six per cage and kept in a specific pathogen free (SPF) room at 20–24 °C under a 12/12 h light/dark cycle and provided with sterilized water and chow ad libitum. The animals were allowed to acclimate for 7 days before starting the experiments. Infection was performed by ip injection of 10^4 trypomastigotes.

All animal experiments and procedures were approved by the institution's committee on the ethical handling and protection of laboratory animals used for experimental and other scientific purposes.

Treatment. The in vivo protocol¹⁹ allows the analyses of the effect of drugs on the parasite load using BALB/c female mice infected with 10^4 bloodstream trypomastigotes from the Y strain. Compounds **2a**, **6e**, **10b**, and **10d** were dissolved in DMSO and then freshly diluted with propylene glycol. Animals are treated intraperitoneally (ip) with the compounds at 10 mg/kg/day for 5 days consecutively, with treatment beginning 5 days postinfection (dpi). Only those animals that are positive for parasitemia were used. The following parameters are followed: (i) parasitemia is evaluated microscopically by the Pizzi-Brener method²⁰ at 5, 8, and 10 dpi and (ii) survival is defined as an animal living 30 days after the end of the treatment. Results from each compound tested according to these parameters will be compared to the results achieved following the reference protocol dosing with 100 mg/kg/day benznidazole. The mortality rates were checked daily until 30 dpi and expressed as survival percentage (%S).

Cytotoxicity Assays. Cells. J774 murine macrophages were grown in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (30 min at 56 °C), penicillin G (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL). For the experiments, cells in the preconfluence phase were harvested with trypsin. Cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified environment with 5% CO₂.

Fibroblast NCTC929 were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (50 units/mL penicillin and 50 g/mL streptomycin).

Cytotoxicity Assays on Macrophages and Fibroblasts. The procedure for cell viability measurement was evaluated with resazurin by a colorimetric method described previously.⁴³

For macrophages, J774 cell lines were seeded (5×10^4 cells/well) in 96-well flat-bottom microplates with 100 μ L of RPMI 1640 medium. The cells were allowed to attach for 24 h at 37 °C, 5% CO₂, and the medium was replaced by different concentrations of the drugs in 200 μ L of medium and exposed for another 24 h. Growth controls were

also included. Afterward, a volume of 20 μL the 2.5 mM resazurin solution was added, and plates were returned to the incubator for another 3 h to evaluate cell viability. The reduction of resazurin was determined by the fluorescence intensity (535 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength) as in the promastigotes assay. Each concentration was assayed three times. Medium and drug controls were used in each test as blanks.

For fibroblasts, NCTC clone 929 cells were plated in 96-microtiter plates at 3×10^4 cells per well in 100 μL of growth medium. The cells were grown overnight at 37 °C, 5% CO_2 . Thereafter the medium was removed, and the compounds were added in 200 μL of medium for 24 h. After incubation, 20 μL of 2 mM resazurin solution was added to each well. The plates were incubated for 3 h to allow optimal oxidation–reduction. The plates were read at 570 and 595 nm on a microplate reader.

Cytotoxicity effect of compounds was defined as the 50% reduction of cell viability of treated culture cells with respect to untreated culture (CC_{50}).

Confocal Microscopy. Reagents. Mouse polyclonal anti- β -tubulin antibody was purchased from NeoMarkers (Thermo Scientific), goat anti-rabbit IgG (H+L)–Alexa Fluor 488 dye (Life Technologies) and Fluoroshield with propidium iodide (PI) were from Sigma.

Procedure. Promastigote forms of *L. infantum* in log-phase growth were treated with compounds **9c** and **14d** at concentrations corresponding to the IC_{50} for 24 and 48 h. After incubation, the parasites were washed with PBS containing 0.25 mM MgCl_2 and 0.35 mM CaCl_2 , fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with 0.2% saponin in blocking solution for 20 min (1% bovine serum albumin in PBS containing Mg^{2+} and Ca^{2+}). Thereafter, promastigotes were incubated overnight in a humid chamber with anti- β -tubulin as described by Chavan et al.²⁴ Then, the parasites were washed with PBS containing Ca^{2+} and Mg^{2+} and were stained with the secondary reagent, goat anti-rabbit IgG (H+L)–dye in blocking solution for 1 h at 37 °C. Then, promastigotes were mounted in Fluoroshield with PI. Slides were then observed under a Leica DM IRE2 confocal laser scanning microscope and visualized with a Leica SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH).

Statistics. Data are reported as means of three repeated experiments. The efficacy against parasite (IC_{50}) and the cytotoxicity effect (CC_{50}) of compounds were determined by probit multilinear analysis curves. For in vitro test all data were analyzed by Tukey's HSD-test posthoc, and in vivo assays were analyzed by Mann–Whitney *U* test. Statistical significance was considered at $p \leq 0.05$ using SPSS v20.0 and Microsoft Excel 2007 software.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34 961 369 000. Fax: +34 961 395 272. E-mail: eugenia@uch.ceu.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Conselleria de Sanitat-Generalitat Valenciana (Projects AP158/10 and AP173/11), the Universidad Cardenal Herrera CEU (Projects PRCEU-UCH 19/10 and PRCEU-UCH 36/11), Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación (Project MAEC-AP/038991/11), and the Ministerio de Ciencia e Innovación (CONSOLIDER CSD2010-00065) for financial support. P.B.-R. is a MAEC-AECID predoctoral fellow at the Complutense University of Madrid. C.G.-R. is indebted to the Generalitat Valenciana for a contract. C.V. and M.R. are grateful to PRONII/CONACYT (Programa Nacional de Incentivo a Investigadores/Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), Paraguay.

ABBREVIATIONS USED

AA, anti-amastigote activity; B, benzimidazole; CC_{50} , 50% reduction of cell viability of treated culture cells with respect to untreated culture; CPRG, chlorophenol red- β -D-galactopyranoside; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; dpi, days postinfection; FBS, fetal bovine serum; GI%, growth inhibitory percentage; HIA, human intestinal absorption; I, inhibitor; LIT, liver infusion tryptose; M, miltefosine; kDNA, kinetoplastic DNA; n-ROTB, number of rotatable bonds; NI, noninhibitor; NS, nonsubstrate; PI, propidium iodide; SI, selectivity index; SPF, specific pathogen free.

REFERENCES

- (1) (a) Nussbaum, K.; Honek, J.; Cadmus, C. M. C. v. C.; Efferth, T. Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1594–1617. (b) Graebin, C. S.; Uchoa, F. D.; Bernardes, L. S. C.; Campo, V. L.; Carvalho, I.; Eifler-Lima, V. L. Antiprotozoal Agents: An Overview. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2009**, *8*, 345–366.
- (2) <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (last accessed April 9, 2013)
- (3) (a) <http://www.ndi.org/diseases/vl/current-treatment.html> (last accessed April 9, 2013). (b) Monzote, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *Open Antimicrob. Agents J.* **2009**, *1*, 9–19. (c) Cruz, A. K.; Simões de Toledo, J.; Falade, M.; Terrão, M. C.; Kamchonwongpaisan, S.; Kyle, D. E.; Uthairipibull, C. Current Treatment and Drug Discovery Against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: A Review. *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 178–192. (d) Croft, S. L. Kinetoplastida New Therapeutic Strategies. *Parasite* **2008**, *15*, S22–S27. (e) Kedzierski, L.; Sakhianandeswaren, A.; Curtis, J. M.; Andrews, P. C.; Junk, P. C.; Kedzierska, K. Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 599–614.
- (4) Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111–126.
- (5) (a) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> (last accessed April 9, 2013). (b) Rassi, A., Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. *Lancet* **2010**, *375*, 1388–1402.
- (6) (a) Castillo, E.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F.; Rangel, M.; González-Rosende, M. E. The Kinetoplastid Chemotherapy Revisited: Current Drugs, Recent Advances and Future Perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 4027–4051. (b) Filardi, L. S.; Brener, Z. Susceptibility and Natural Resistance of *Trypanosoma cruzi* Strains to Drugs Used Clinically in Chagas Disease. *Trans. R. Soc. Trop. Hyg.* **1987**, *81*, 755–759.
- (7) (a) Richard, J. V.; Werbovetz, K. A. New Antileishmanial Candidates and Lead Compounds. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 447–455. (b) Cerecetto, H.; González, M. Synthetic Medicinal Chemistry in Chagas' Disease: Compounds at The Final Stage of "Hit-To-Lead" Phase. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 810–838.
- (8) (a) Argyropoulou, I.; Geronikaki, A.; Vicini, P.; Zani, F. Synthesis and Biological Evaluation of Sulfonamide Thiazole and Benzothiazole Derivatives As Antimicrobial Agents. *Arkivoc* **2009**, *6*, 89–102. (b) Mitscher, L. A.; Lemke, T. L.; Gentry, E. J. Antibiotics and Antimicrobial Agents. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*; Lemke, T. L., Williams, D. A., Eds.; Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia, 2008; pp 1028–1083.
- (9) (a) Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. Diuretics with Carbonic Anhydrase Inhibitory Activity: Toward Novel Applications for Sulfonamide Drugs. In *Drug Design of Zinc–Enzyme Inhibitors*; Supuran, C. T., Winum, J.-Y., Eds.; Wiley & Sons, Inc.: New York, 2009; pp 155–170. (b) Supuran, C. T.; Scozzafava, A. Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Therapeutic Potential. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2000**, *10*, 575–600.
- (10) (a) Navarrete-Vazquez, G.; Paoli, P.; León-Rivera, I.; Villalobos-Molina, R.; Medina-Franco, J. L.; Ortiz-Andrade, R.; Estrada-Soto, S.; Camici, G.; Diaz-Coutiño, D.; Gallardo-Ortiz, I.; Martínez-Mayorga,

- K.; Moreno-Díaz, H. Synthesis, in Vitro and Computational Studies of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition of a Small Library of 2-Arylsulfonylaminobenzothiazoles with Antihyperglycemic Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3332–3341. (b) Selam, J. L. Pharmacokinetics of Hypoglycemic Sulfonamides: Ozidia, a New Concept. *Diabetes Metab.* **1997**, *23*, 39–43.
- (11) Thornber, C. W. Isosterism and Molecular Modification in Drug Design. *Chem. Soc. Rev.* **1979**, *8*, 563–580.
- (12) (a) Shah, S. S. A.; Rivera, G.; Ashfaq, M. Recent Advances in Medicinal Chemistry of Sulfonamides. Rational Design as Anti-Tumoral, Anti-Bacterial and Anti-Inflammatory Agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 70–86. (b) Abbassi, N.; Chicha, H.; Rakib, E. M.; Hannioui, A.; Alaoui, M.; Hajjaji, A.; Geffken, D.; Aiello, C.; Gangemi, R.; Rosano, C.; Viale, M. Synthesis, Antiproliferative and Apoptotic Activities of *N*-(6(4)-Indazolyl)-benzenesulfonamide Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *57*, 240–249. (c) Ghorab, M.; Fatma, M.; Ragab, A.; Hamed, M. M. Design, Synthesis and Anticancer Evaluation of Novel Tetrahydroquinoline Derivatives Containing Sulfonamide Moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4211–4217. (d) Hu, L.; Li, Z.; Jiang, J.; Boykin, D. W. Novel Diaryl or Heterocyclic Sulfonamides As Antimitotic Agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 739–745.
- (13) (a) Wolfe, C.; Hicks, C. Profile of Darunavir in the Management of Treatment-Experienced HIV Patients. *HIV/AIDS* **2009**, *1*, 13–21. (b) Stranix, B. R.; Lavallée, J. F.; Seigny, G.; Yelle, J.; Perron, V.; LeBerre, N.; Herbart, D.; Wu, J. J. Lysine Sulfonamides as Novel HIV-Protease Inhibitors: *N*-Acyl Aromatic α -Amino Acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3459–3462. (c) Supuran, C. T.; Innocenti, A.; Mastrolorenzo, A.; Scozzafava, A. Antiviral Sulfonamide Derivatives. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 189–200.
- (14) (a) Martyn, D. C.; Cortese, J. F.; Tyndall, E.; Dick, J.; Mazitschek, R.; Munoz, B.; Clardy, J. Antiplasmodial Activity of Piperazine Sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 218–221. (b) Hernandez-Nunez, E.; Tlahuext, H.; Moo-Puc, R.; Torres-Gomez, H.; Reyes-Martinez, R.; Cedillo-Rivera, R.; Nava-Zuazo, C.; Navarrete-Vazquez, G. Synthesis and in Vitro Trichomonocidal, Giardicidal and Amebicidal Activity of *N*-Acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1*H*-imidazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2975–2984. (c) Ekoue-Kovi, K.; Yearick, K.; Iwaniuk, D. P.; Natarajan, J. K.; Alumasa, J.; de Dios, A. C.; Roepe, P. D.; Wolf, C. Synthesis and Antimalarial Activity of New 4-Amino-7-chloroquinolyl Amides, Sulfonamides, Ureas and Thioureas. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 270–283. (d) Parai, M. K.; Panda, G.; Srivastava, K.; Puri, S. K. Design, Synthesis and Antimalarial Activity of Benzene and Isoquinoline Sulfonamide Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 776–778. (e) Krungkrai, J.; Krungkrai, S. R.; Supuran, C. T. Malarial Parasite Carbonic Anhydrase and Its Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 909–917. (f) Norose, K.; Aosai, F.; Mun, H.-S.; Yano, A. Effects of Sulfamethoxazole on Murine Ocular Toxoplasmosis in Interferon- γ Knockout Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*, 265–271.
- (15) (a) Papadopoulou, M. V.; Bloomer, W. D.; Rosenzweig, H. S.; Chatelain, E.; Kaiser, M.; Wilkinson, S. R.; McKenzie, C.; Ioset, J.-R. Novel 3-Nitro-1*H*-1,2,4-triazole-Based Amides and Sulfonamides as Potential Antitrypanosomal Agents. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5554–5565. (b) Marra, R. K. F.; Bernardino, A. M. R.; Proux, T. A.; Charret, K. S.; Lira, M.-L. F.; Castro, H. C.; Souza, A. M. T.; Oliveira, C. D.; Borges, J. C.; Rodrigues, C. R.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Leon, L. L.; Amaral, V. F. 4-(1*H*-Pyrazol-1-yl)benzenesulfonamide Derivatives: Identifying New Active Antileishmanial Structures for Use against a Neglected Disease. *Molecules* **2012**, *17*, 12961–12973. (c) Barea, C.; Pabón, A.; Castillo, D.; Zimic, M.; Quiliano, M.; Galiano, S.; Pérez-Silanes, S.; Monge, A.; Deharo, E.; Aldana, I. New Salicylamide and Sulfonamide Derivatives of Quinoxaline 1,4-Di-*N*-oxide with Antileishmanial and Antimalarial Activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4498–502. (d) Goodarzi, M.; da Cunha, E. F. F.; Freitas, M. P.; Ramalho, T. C. QSAR and Docking Studies of Novel Antileishmanial Diaryl Sulfides and Sulfonamides. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4879–4889. (e) Pagliero, R. J.; Lusvardi, S.; Pierini, A. B.; Brun, R.; Mazzieri, M. R. Synthesis, Stereoelectronic Characterization and Antiparasitic Activity of New 1-Benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 142–150. (f) da Silva, L. E.; de Sousa, P. T., Jr.; Maciel, E. N.; Nunes, R. K.; Eger, I.; Steindel, M.; Rebelo, R. A. In Vitro Antiprotozoal Evaluation of Zinc and Copper Complexes Based on Sulfonamides Containing 8-Aminoquinoline Ligands. *Letts. Drug Des. Discovery* **2010**, *7*, 679–685. (g) Souza, A. M. T.; Castro, H. C.; Brito, M. A.; Andrighetti-Frohner, C. R.; Magalhaes, U. O.; Oliveira, K. N.; Gaspar-Silva, D.; Pacheco, L. K.; Joussef, A. C.; Steindel, M.; Simoes, C. M. O.; Santos, D. O.; Albuquerque, M. G.; Rodrigues, C. R.; Nunes, R. J. *Leishmania amazonensis* Growth Inhibitors: Biological and Theoretical Features of Sulfonamide 4-Methoxychalcone Derivatives. *Curr. Microbiol.* **2009**, *59*, 374–379. (h) Khan, K. M.; Khan, M. Z.; Taha, M.; Maharvi, G. M.; Saify, Z. S.; Parveen, S.; Choudhary, M. I. Leishmanicidal Potential of *N*-Substituted Morpholine Derivatives: Synthesis and Structure–Activity Relationships. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23*, 479–484. (i) Altenkamper, M.; Bechem, B.; Perruchon, J.; Heinrich, S.; Madel, A.; Ortmann, R.; Dahse, H.-M.; Freunscht, E.; Wang, Y.; Rath, J.; Stich, A.; Hitzler, M.; Chiba, P.; Lanzer, M.; Schlitzer, M. Antimalarial and Antitrypanosomal Activity of a Series of Amide and Sulfonamide Derivatives of a 2,5-Diaminobenzophenone. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7690–7697. (j) Ajibade, P. A.; Kolawole, G. A.; Brien, P. O. Metal Complexes of 4-Amino-*N*-(2-pyrimidinyl)benzene Sulfonamide: Synthesis, Characterization and Antiprotozoal Studies. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Nano-Metal Chem.* **2007**, *37*, 653–659.
- (16) Dea-Ayuela, M. A.; Castillo, E.; González-Álvarez, M.; Vega, C.; Rolon, M.; Bolas-Fernández, F.; Borrás, J.; González-Rosende, M. E. In Vivo and in Vitro Anti-Leishmanial Activities of 4-Nitro-*N*-pyrimidin- and *N*-Pyrizin-2-ylbenzenesulfonamides, and *N*²-(4-Nitrophenyl)-*N*¹-propylglycinamide. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7449–7456.
- (17) Bilbao-Ramos, P.; Galiana-Roselló, C.; Dea-Ayuela, M. A.; González-Álvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Pérez-Serrano, J.; Bolás-Fernández, F.; González-Rosende, M. E. Nuclease Activity and Ultrastructural Effects of New Sulfonamides with Anti-Leishmanial and Trypanocidal Activities. *Parasitol. Int.* **2012**, *61*, 604–613.
- (18) Meirelles, M. N.; de Araújo Jorge, T. C.; de Souza, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with Macrophages in Vitro: Dissociation of the Attachment and Internalization Phases by Low Temperature and Cytochalasin B. *Z. Parasitenkd.* **1982**, *68*, 7–14.
- (19) Romanha, A. J.; Castro, S. L.; Soeiro, M.; de, N.; Lannes-Vieira, J.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; Blum, B.; Olivieri, B.; Zani, C.; Spadafora, C.; Chiari, E.; Chatelain, E.; Chaves, G.; Calzada, J. E.; Bustamante, J. M.; Freitas-Junior, L. H.; Romero, L. I.; Bahia, M. T.; Lotrowska, M.; Soares, M.; Andrade, S. G.; Armstrong, T.; Degraeve, W.; Andrade, Z.; de, A. In Vitro and in Vivo Experimental Models for Drug Screening and Development for Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 233–238.
- (20) Brener, Z. Therapeutic Activity and Criterion of Cure on Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1962**, *4*, 386–396.
- (21) Lama, R.; Sandhu, R.; Zhong, B.; Li, B.; Su, B. Identification of Selective Tubulin Inhibitors as Potential Anti-Trypanosomal Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5508–5516.
- (22) George, T. G.; Endeshaw, M. M.; Morgan, R. E.; Mahasenan, K. V.; Delfin, D. A.; Mukherjee, M. S.; Yakovich, A. J.; Fotie, J.; Li, C.; Werbovetz, K. A. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of 3,5-Substituted-*N*¹-phenyl-*N*⁴,*N*⁴-di-*n*-butylsulfanilamides as Antikinetoplastid Antimicrotubule Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6071–6079.
- (23) Kohl, L.; Gull, K. Molecular Architecture of the Trypanosome Cytoskeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *93*, 1–9.
- (24) Chavan, H. D.; Singh, G.; Dey, C. S. Confocal Microscopic Investigation of Tubulin Distribution and Effect of Paclitaxel on Posttranslationally Modified Tubulins in Sodium Arsenite Resistant *Leishmania donovani*. *Exp. Parasitol.* **2007**, *116*, 320–326.
- (25) Chang, J. Y.; Hsieh, H. P.; Chang, C. Y.; Hsu, K. S.; Chiang, Y. F.; Chen, C. M.; Kuo, C. C.; Liou, J. P. 7-Aroyl-aminoinoline-1-sulfonamides as a Novel Class of Potent Antitubulin Agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6656–6659.

- (26) Yoshimatsu, K.; Yamaguchi, A.; Yoshino, H.; Koyanagi, N.; Kitoh, K. Mechanism of Action of E7010, an Orally Active Sulfonamide Antitumor Agent: Inhibition of Mitosis by Binding to the Colchicine Site of Tubulin. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3208–3213.
- (27) (a) Bringmann, G.; Zhang, G.; Öschlänger, T.; Stich, A.; Wud, J.; Chatterjee, M.; Brun, R. Highly Selective Antiplasmodial Naphthylisoquinoline Alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*. *Phytochemistry* **2013**, *91*, 220–228. (b) Bringmann, G.; Brun, R.; Kaiser, M.; Neumann, S. Synthesis and Antiprotozoal Activities of Simplified Analogs of Naphthylisoquinoline Alkaloids. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 32–42. (c) Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A. Mode of Action of Natural and Synthetic Drugs against *Trypanosoma cruzi* and Their Interaction with the Mammalian Host. *Comp. Biochem. Phys. A* **2007**, *146*, 601–620.
- (28) (a) Calculated by using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V 11.02 (copyright 1994–2012 ACD/Labs). (b) Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Lee, P. W.; Tang, Y. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Evaluating Chemical ADMET Properties. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3099–3105.
- (29) Vigorita, M. G.; Grasso, S.; Zappala, M.; Ottana, R.; Monforte, M. T.; Barbera, R.; Trovato, A. Aminopyrazinyl Derivatives: Synthesis and Evaluation of Antiinflammatory and Related Activities. *Farmaco* **1994**, *49*, 271–276.
- (30) Cejudo, R.; Alzuet, G.; González-Alvarez, M.; García-Giménez, J. L.; Borrás, J.; Liu-González, M. DNA Cleavage Reaction Induced by Dimeric Copper(II) Complexes of *N*-Substituted Thiazole Sulfonamides. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 70–79.
- (31) Sprague, J. M.; Kissinger, L. W. Sulfonamido Derivatives of Thiazoles. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 578–580.
- (32) Hill, A. J.; Hall, G. E. Some Sulfanilamide Derivatives of the Isoquinoline Series. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 666–668.
- (33) Li, X.; Chu, S.; Feher, V. A.; Khalili, M.; Nie, Z.; Margosiak, S.; Nikulin, V.; Levin, J.; Sprankle, K. G.; Tedder, M. E.; Almassy, R.; Appelt, K.; Yager, K. M. Structure-Based Design, Synthesis, And Antimicrobial Activity of Indazole-Derived SAH/MTA Nucleosidase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5663–5673.
- (34) Xu, X.; Weitzberg, M.; Keyes, R. F.; Li, Q.; Wang, R.; Wang, X.; Zhang, X.; Frevert, E. U.; Camp, H. S.; Beutel, B. A.; Sham, H. L.; Gu, Y. G. The Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Selective Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitors Containing 4-(Thiazol-5-yl)but-3-yn-2-amino Motif: Polar Region Modifications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1803–1807.
- (35) Verma, S. M.; Khani, L.; Gunakkunru, A.; Saha, A. Synthesis and Anticonvulsant Activity of Some Heterocyclic Sulfonamides. *J. Inst. Chem. (India)* **2008**, *80*, 8–13.
- (36) Lacova, M.; Nga, N. T.; Halgas, J. Vilsmeier–Haack Reaction of 2-Amino-*X*-benzothiazoles with *N*-Phenylformamide in the Presence of Benzenesulfonyl Chloride. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1988**, *53*, 311–318.
- (37) Jacob, R. M. 1-Alkylsulfonyl-4-alkylpiperazines. US Patent 2507408, 1950.
- (38) Ito, K.; Tanaka, H. Syntheses of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines from *N*-Sulfonylphenethylamines and Aldehydes. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 1732–1739.
- (39) Lukanov, L.; Venkov, A.; Mollov, N. Application of the Intramolecular α -Amidoalkylation Reaction for the Synthesis of 2-(Arylsulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines. *Synthesis* **1987**, 204–206.
- (40) Bilbao-Ramos, P.; Sifontes-Rodríguez, S.; Dea-Ayuela, M. A.; Bolás-Fernández, F. A Fluorometric Method for Evaluation of Pharmacological Activity against Intracellular *Leishmania* Amastigotes. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *89*, 8–11.
- (41) Titus, R. G.; Marchand, M.; Boon, T.; Louis, J. A. A Limiting Dilution Assay for Quantifying *Leishmania major* in Tissues of Infected Mice. *Parasite Immunol.* **1985**, *7*, 545–555.
- (42) Vega, C.; Rolón, M.; Martínez-Fernández, A. R.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A. A New Pharmacological Screening Assay with *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Expressing beta-Galactosidase. *Parasitol. Res.* **2005**, *95*, 296–298.
- (43) Rolón, M.; Seco, E. M.; Vega, C.; Nogal, J. J.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A.; Malpartida, F. Selective Activity of Polyene Macrolides Produced by Genetically Modified Streptomyces on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *28*, 104–109.



N-(2-methyl-indol-1H-5-yl)-1-naphthalenesulfonamide: A novel reversible antimitotic agent inhibiting cancer cell motility



Clara Aceves-Luquero^{a,d}, Cristina Galiana-Roselló^{e,g}, Guillem Ramis^{a,d}, Ruth Villalonga-Planells^c, Enrique García-España^f, Silvia Fernández de Mattos^{a,b,d}, Rafael Peláez^h, José M. Llinares^g, M. Eugenia González-Rosende^{e,1,*}, Priam Villalonga^{a,b,d,1,*}

^a Cancer Cell Biology Laboratory, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Palma, Illes Balears, Spain

^b Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma, Illes Balears, Spain

^c Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, Palma, Illes Balears, Spain

^d Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa), Palma, Illes Balears, Spain

^e Departamento de Farmacia, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Moncada, Valencia, Spain

^f Departamento de Química Inorgánica, ICMoL, Universitat de València, Paterna, Spain

^g Departamento de Química Orgánica, ICMoL, Universitat de València, Paterna, Spain

^h Departamento de Química Farmacéutica, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2016

Accepted 23 June 2016

Available online 25 June 2016

Keywords:

Sulfonamides

Cancer

Mitosis

Tubulin

Cell motility

Apoptosis

ABSTRACT

A series of compounds containing the sulfonamide scaffold were synthesized and screened for their *in vitro* anticancer activity against a representative panel of human cancer cell lines, leading to the identification of N-(2-methyl-1H-indol-5-yl)-1-naphthalenesulfonamide (**8e**) as a compound showing a remarkable activity across the panel, with IC₅₀ values in the nanomolar-to-low micromolar range. Cell cycle distribution analysis revealed that **8e** promoted a severe G2/M arrest, which was followed by cellular senescence as indicated by the detection of senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) in **8e**-treated cells. Prolonged **8e** treatment also led to the onset of apoptosis, in correlation with the detection of increased Caspase 3/7 activities. Despite increasing γ-H2A.X levels, a well-established read-out for DNA double-strand breaks, *in vitro* DNA binding studies with **8e** did not support interaction with DNA. In agreement with this, **8e** failed to activate the cellular DNA damage checkpoint. Importantly, tubulin staining showed that **8e** promoted a severe disorganization of microtubules and mitotic spindle formation was not detected in **8e**-treated cells. Accordingly, **8e** inhibited tubulin polymerization *in vitro* in a dose-dependent manner and was also able to robustly inhibit cancer cell motility. Docking analysis revealed a compatible interaction with the colchicine-binding site of tubulin. Remarkably, these cellular effects were reversible since disruption of treatment resulted in the reorganization of microtubules, cell cycle re-entry and loss of senescent markers. Collectively, our data suggest that this compound may be a promising new anticancer agent capable of both reducing cancer cell growth and motility.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Despite overwhelming advances in cancer research and clinical oncology, which have resulted in higher successful outcomes for a number of malignancies, cancer remains the second leading cause

* Corresponding authors at: Departamento de Farmacia, Universidad CEU Cardenal Herrera, Avda. Seminario s/n, 46113 Moncada, Valencia, Spain (M.E. González-Rosende). Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Edifici Científicotècnic, Ctra. Valldemossa Km 7,5, 07122 Illes Balears, Spain (P. Villalonga).

E-mail addresses: eugenia@uch.ceu.es (M.E. González-Rosende), priam.villalonga@uib.es (P. Villalonga).

¹ Joint senior co-authors.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.06.016>

0006-2952/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

of death in developing as well as developed countries. Moreover, the global cancer burden is growing at an alarming pace, in 2030 alone, 21.3 million new cancer cases and 13.1 million cancer deaths are expected to occur, simply due to the growth and aging of the population [1]. Even though chemotherapy is the mainstay of cancer therapy, the use of available chemotherapeutics is often limited, mainly due to undesirable side effects caused by the lack of selectivity of most antitumoral drugs as well as the constant emergence of drug-resistant and multidrug resistant tumors, which clearly underscores the need of developing alternative chemotherapeutic agents for more effective cancer treatments [2]. In this context, research efforts directed at the development of new anti-mitotic agents is clearly a priority, with the aim to

addressing issues such as enhanced tumor specificity, insensitivity to chemo-resistance and reduced neurotoxicity [3]. Anti-mitotic compounds elicit their antitumor activity by altering tubulin polymerization and thus microtubule dynamics which impairs the correct assembly of the mitotic spindle, leading to mitotic arrest. Among these compounds, tubulin-inhibiting agents binding to the colchicine site on tubulin have been of special interest [4].

Sulfonamides and their derivatives constitute an important class of therapeutic agents that exhibit a broad spectrum of pharmacological profiles, such as antibacterial, diuretic, hypoglycemic, antithyroid, antiviral, antiinflammatory and antiparasitic activities among others [5]. Particularly, compounds belonging to this structural class have also been recently reported to show substantial *in vitro* and *in vivo* anticancer activities and some of them are currently undergoing clinical trials [5d,5e,6]. Interestingly, although these novel chemotypes share a common motif of aromatic/heterocyclic sulfonamides, a variety of mechanisms have been involved in their antitumor action, i.e. disruption of microtubule protein assembly [6,7], carbonic anhydrase inhibition [8], cell cycle arrest [9], NF- κ B transcription factor inhibition [10], Histone Deacetylase inhibition [11], Matrix Metalloproteinases (MMP) inhibition [12], as well as targeting protein kinase-mediated signaling pathways [13], or mitochondrial membrane [14].

It is also well documented that tubulin may constitute a suitable target for antiprotozoal compounds [15]. In this context, we have recently reported benzene and naphthalene sulfonamide derivatives as potent antiparasitic agents targeting β -tubulin of *Leishmania infantum* [16]. Hence, based on our previous results on leishmanicidal tubulin-interacting sulfonamides and the increasing biological importance of sulfonamides in the field of anti-tumoral chemotherapy, the potential antiproliferative activity of our in-house sulfonamide library was evaluated against a large panel of tumor cell lines. In addition, to determine electronic and structural features, we designed and synthesized a new series of sulfonamides (Fig. 1). Here, we describe the identification of *N*-(2-methyl-1*H*-indol-5-yl)-1-naphthalenesulfonamide (compound **8e**) as a sulfonamide with potential anticancer activity and characterize its cellular mechanism of action as a novel, and reversible, tubulin polymerization inhibitor inducing mitotic arrest, senescence and cellular apoptosis. Importantly, we also show that sulfonamide **8e** significantly inhibits cancer cell motility, enhancing the potential interest of this sulfonamide as a novel anticancer compound.

2. Materials and methods

2.1. Chemistry

2.1.1. General

All reagents were purchased from Aldrich and used without purification. All experiments were made under nitrogen atmosphere. Melting points were determined with a Kofler hot-stage apparatus and are uncorrected. Column chromatography was performed using silica gel (Merck 60, 70–230 mesh). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AC-300 instrument. Chemical shifts (δ values) and coupling constants (J values) are given in ppm and Hz respectively. HRMS were obtained using a VG Autospec TRIO 1000 instrument. The ionization mode used in mass spectra was electron impact (EI), fast atom bombardment (FAB) or Time-of-flight mass spectrometry (TOFMS). Elemental analysis was performed by the Servicio de Espectroscopía Atómica, Molecular y Óptica, Universitat de València-SCSIE (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental), València, Spain. The purity of the compounds ($\geq 95\%$) and molecular mass were confirmed by elemental microanalysis and HRMS. The analytical results for C, H, and N were within ± 0.4 of the theoretical values.

2.1.2. Synthesis and characterization

2.1.2.1. General procedure for the synthesis of sulfonamides 1–14. To an ice-cooled solution of the amine (20 mmol) in pyridine (8 mL) was slowly added the corresponding sulfonyl chloride (30 mmol) in pyridine (6 mL). The mixture was stirred at 0 °C for 2 h and allowed to reach room temperature. Water was added (100 mL) and the solid was collected and recrystallized from MeOH:CH₂Cl₂.

Compounds **1–4**, **5b–d**, **6a–c**, and **8a–e**, were synthesized as previously described [16].

2.1.2.2. *N*-(1*H*-Indazol-5-yl)-4-nitrobenzenesulfonamide (5a) [17]. Yield: 73%, mp: 234–236 °C, ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.08 (d, J = 8.8, 1H), 7.44 (m, 2H), 7.93 (d, J = 8.7, 2H), 8.00 (s, 1H), 8.31 (d, J = 8.7, 2H), 10.5 (brs, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 111.2 (CH), 114.1 (CH), 122.9 (CH), 123.2 (C), 124.9 (CH), 128.7 (CH), 129.6 (C), 133.9 (CH), 138.2 (C), 145.1 (C), 150.0 (C), HRMS-EI⁺: m/z calcd for C₁₃H₁₀N₄O₄S: 318.0422, found: 318.0429.

2.1.2.3. *N*-(1*H*-indol-5-yl)-1-naphthalenesulfonamide (7a). Yield 56%, mp: 107–108 °C, ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 6.29 (m, 1H), 6.76 (dd, J = 2, J = 8.6, 1H), 7.18 (d, J = 8.6, 1H), 7.21 (d, J = 2, 1H), 7.26 (t, J = 2.7, 1H), 7.51 (t, J = 7.8, 1H), 7.64 (td, J = 1, J = 8.6, 1H), 7.74 (td, J = 1.4, J = 8.6, 1H), 8.03 (d, J = 7.8, 1H), 8.11 (m, 2H), 8.87 (d, J = 8.6, 1H), 10.22 (s, 1H, NH), 11.01 (s, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 101.4 (CH), 111.9 (CH), 113.6 (CH), 117.0 (CH), 124.7 (CH), 125.0 (CH), 126.6 (CH), 127.2 (CH), 127.9 (C), 128.1 (C), 128.2 (C), 129.0 (CH), 129.3 (CH), 130.0 (CH), 133.9 (C), 134.0 (C), 134.3 (CH), 135.2 (C), HRMS (ES⁺): m/z (M+H) calcd for C₁₈H₁₅N₂O₂S: 323.0849 found: 323.0826. Anal. Calcd for C₁₈H₁₄N₂O₂S: C, 67.06, H, 4.38, N, 8.69, S, 9.94. Found: C, 66.86, H, 4.65, N, 8.48, S, 9.59.

2.1.2.4. *N*-(1*H*-indol-5-yl)-5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonamide (7b). Yield 74%, mp 118–121 °C, ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.49 (s, 6H), 6.25 (m, 1H), 6.73 (dd, J = 2.1 J = 8.6, 1H), 7.14 (d, J = 8.6, 1H), 7.15 (d, J = 2, 1H), 7.25 (m, 2H), 7.49 (t, J = 7.3, 1H), 7.61 (t, J = 8.6, 1H), 8.05 (dd, J = 1.1, J = 7.3, 1H), 8.38 (d, J = 8.6, 1H), 8.46 (d, J = 8.6, 1H), 10.13 (s, 1H, NH), 10.96 (s, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 45.4 (CH₃), 101.3 (CH), 111.9 (CH), 113.2 (CH), 115.5 (CH), 116.7 (CH), 119.4 (CH), 123.8 (CH), 126.6 (CH), 127.9 (C), 128.2 (CH), 129.1 (C), 129.2 (C), 129.6 (C), 129.9 (CH), 130.0 (CH), 133.7 (C), 135.7 (C), 151.7 (C), HRMS (ES⁺): m/z (M+H) calcd for C₂₀H₂₀N₃O₂S: 366.1271 found: 366.1248. Anal. Calcd for C₁₉H₁₈N₄O₂S: C, 62.28, H, 4.95, N, 15.29, S, 8.75. Found: C, 62.24, H, 5.24, N, 14.71, S, 8.60.

2.1.2.5. *N*-(2-methyl-1*H*-indol-5-yl)-8-quinolinesulfonamide (8f). Yield 58%, mp 192–194 °C, ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 2.25 (s, 3H), 5.88 (s, 1H), 6.60 (dd, J = 2, J = 8.6, 1H), 6.94 (d, J = 8.6, 1H), 6.98 (d, J = 2, 1H), 7.58 (t, J = 7.7, 1H), 7.74 (dd, J = 4.2, J = 8.4, 1H), 8.2 (d, J = 7.7, 2H), 8.52 (dd, J = 1.7, J = 8.4, 1H), 9.21 (dd, J = 1.7, J = 4.2, 1H), 9.39 (bs, 1H, NH), 10.76 (bs, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 13.6 (CH₃), 99.3 (CH), 110.6 (CH), 113.0 (CH), 116.1 (CH), 122.9 (CH), 126.0 (CH), 128.4 (C), 128.7 (C), 129.1 (C), 132.0 (CH), 134.0 (C), 134.1 (CH), 135.8 (C), 136.9 (C), 137.4 (CH), 143.4 (C), 151.7 (CH), HRMS (ES⁺): m/z (M+H) calcd for C₁₈H₁₆N₃O₂S: 338.0958 found: 338.0934. Anal. Calcd for C₁₈H₁₅N₃O₂S: C, 64.08, H, 4.48, N, 12.45, S, 9.50. Found: C, 63.97, H, 4.64, N, 12.01, S, 9.12.

2.1.2.6. *N*-(2-anthryl)-4-nitrobenzenesulfonamide (9a). Yield 58%, mp 183–187 °C, ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.05 (dd, J = 2, J = 9, 1H), 7.36 (m, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.80 (m, 1H), 8.02 (m, 2H), 8.09 (d, J = 9, 2H), 8.35 (d, J = 9, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 115.6 (CH), 123.4 (CH), 125.0 (CH),

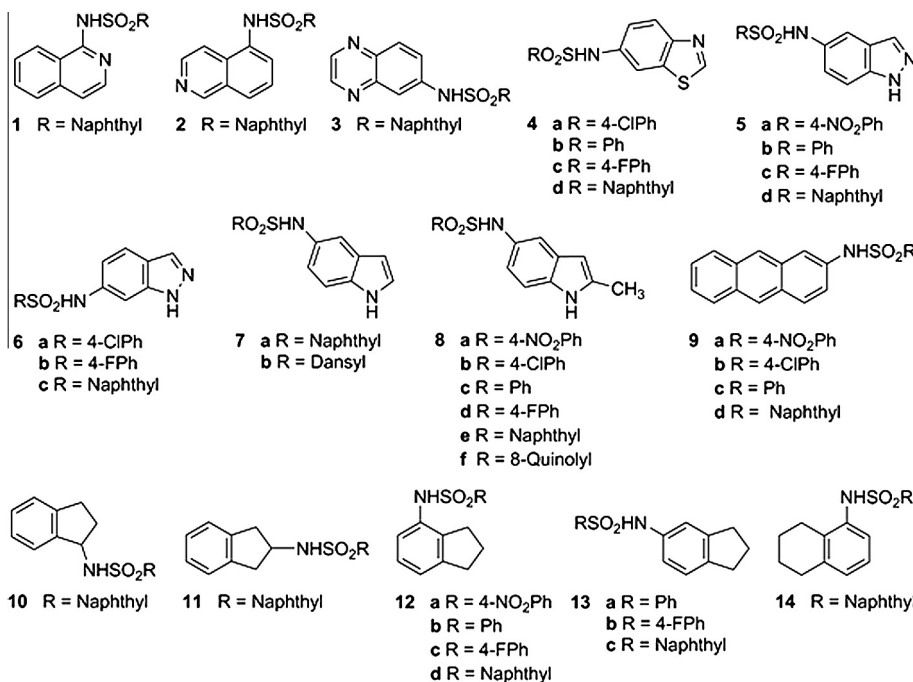


Fig. 1. Molecular structures of sulfonamides 1–14.

125.5 (CH), 125.6 (CH), 126.2 (CH), 126.4 (CH), 126.9 (CH), 127.4 (C), 128.0 (CH), 128.4 (CH), 130.1 (C), 132.0 (CH), 132.3 (C), 134.0 (C), 145.7 (C), 146.4 (C), 150.1 (C), HRMS (ES⁺): m/z (M–H) calcd for C₂₀H₁₃N₂O₄S: 377.0596, found: 377.0593. Anal. Calcd for C₂₀H₁₄N₂O₄S: C, 63.48, H, 3.73, N, 7.40, S, 8.47. Found: C, 63.95, H, 4.04, N, 7.45, S, 8.95.

2.1.2.7. N-(2-anthryl)-4-chlorobenzenesulfonamide (9b). Yield 53%, mp 160–161 °C, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.31 (dd, $J = 2.1, J = 9, 1H$), 7.47 (m, 2H), 7.61 (d, $J = 8.9, 2H$), 7.70 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.9, 2H$), 8.0 (m, 3H), 8.42 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 10.69 (bs, 1H, NH), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 115.4 (CH), 121.4 (CH), 125.5 (CH), 125.6 (CH), 126.2 (CH), 126.4 (CH), 128.0 (CH), 128.4 (CH), 128.9 (C), 129.0 (CH), 129.9 (CH), 130.1 (CH), 131.0 (C), 131.5 (C), 132.1 (C), 134.9 (C), 138.3 (C), 138.7 (C), HRMS (ES⁺): m/z (M+H) calcd for C₂₀H₁₄ClNO₂S: 368.0512, found: 368.0511. Anal. Calcd for C₂₀H₁₄ClNO₂S: C, 65.30, H, 3.83, N, 3.80, S, 8.71. Found: C, 63.19, H, 3.53, N, 7.45, S, 8.90.

2.1.2.8. N-(2-anthryl)-benzenesulfonamide (9c). Yield 97%, mp 195–197 °C (lit [18] 184 °C), ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.31 (dd, $J = 2.0, J = 9, 1H$), 7.36 (m, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.61 (d, $J = 8.7, 2H$), 7.70 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 8.7, 2H$), 8.0 (m, 3H), 8.42 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 10.70 (bs, 1H, NH), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 115.4 (CH), 121.4 (CH), 125.5 (CH), 125.6 (CH), 126.2 (CH), 126.4 (CH), 128.0 (CH), 128.4 (CH), 128.9 (C), 129.0 (CH), 129.4 (CH), 129.8 (CH), 130.1 (CH), 131.0 (C), 132.1 (C), 134.9 (C), 138.3 (C), 138.7 (C). Anal. Calcd for C₂₀H₁₅NO₂S: C, 72.05, H, 4.53, N, 4.20, S, 9.62. Found: C, 71.77, H, 4.17, N, 3.95, S, 9.44.

2.1.2.9. N-(2-anthryl)-1-naphthalenesulfonamide (9d). Yield 99%, mp 105–109 °C, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.26 (dd, $J = 2.1, J = 9, 1H$), 7.43 (m, 2H), 7.64 (t, $J = 8, 2H$), 7.76 (m, 2H), 7.91 (d, $J = 9, 1H$), 7.95 (dd, $J = 2.4, J = 6.8, 2H$), 8.04 (d, $J = 7.7, 1H$), 8.19 (d, $J = 8.3, 1H$), 8.32 (s, 1H), 8.36 (d, $J = 1.7, 1H$), 8.38 (s, 1H), 8.83 (d, $J = 8.5, 1H$), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 113.5 (CH), 120.6 (CH), 124.6 (CH), 124.8 (CH), 125.1 (CH), 125.5 (CH), 126.2 (CH), 126.3 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (C), 127.9 (CH), 128.4 (CH), 128.6 (CH), 129.5 (CH), 129.9 (CH), 130.6 (CH), 130.8 (C),

131.4 (C), 132.0 (C), 134.1 (C), 134.6 (C), 134.9 (CH), 135.0 (C), 138.8 (C). HRMS (TOF⁺): m/z (M+H) calcd for C₂₄H₁₈NO₂S: 384.1053, found: 384.1047. Anal. Calcd for C₂₄H₁₇NO₂S: C, 75.17, H, 4.47, N, 3.65, S, 8.36. Found: C, 71.77, H, 4.17, N, 3.95, S, 9.44.

2.1.2.10. N-(2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)-1-naphthalenesulfonamide (10). Yield 46%, mp 164–165 °C, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.54 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 2.59 (m, 1H), 2.74 (m, 1H), 4.66 (m, 1H), 6.87 (d, $J = 7.7, 1H$), 7.04 (td, $J = 2.9, J = 7.7, 1H$), 7.14 (m, 2H), 7.69 (m, 3H), 8.13 (dd, $J = 2, J = 7.3, 1H$), 8.25 (d, $J = 7.3, 1H$), 8.26 (d, $J = 8.5, 1H$), 8.49 (d, $J = 9, 1H, NH$), 8.73 (d, $J = 8.5, 1H$), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 29.7 (CH₂), 33.8 (CH₂), 58.2 (CH), 124.3 (CH), 124.8 (CH), 124.9 (CH), 125.3 (CH), 126.6 (CH), 127.2 (CH), 128.0 (CH), 128.1 (CH), 129.1 (CH), 129.3 (CH), 134.2 (CH), 136.8 (C), 142.2 (C), 142.8 (C), 143.0 (C), 143.4 (C), HRMS (ES⁺): m/z (M+H) calcd for C₁₉H₁₈NO₂S: 324.1037 found: 324.1037.

2.1.2.11. N-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-1-naphthalenesulfonamide (11). Yield 51%, mp 184–187 °C, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 2.65 (dd, $J = 7.3, J = 15.8, 2H$), 2.83 (dd, $J = 7.3, J = 15.8, 2H$), 3.91 (sextet, $J = 7.3, 1H$), 7.1 (m, 4H), 7.7 (m, 3H), 8.11 (d, $J = 7.7, 1H$), 8.21 (dd, $J = 1.1, J = 7.7, 1H$), 8.25 (d, $J = 8.3, 1H$), 8.38 (d, $J = 7.5, 1H, NH$), 8.70 (d, $J = 8.3, 1H$), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 37.7 (CH₂), 50.18 (CH), 124.6 (CH), 125.0 (CH), 125.1 (CH), 126.8 (CH), 127.2 (CH), 127.9 (C), 128.2 (CH), 129.1 (CH), 129.3 (CH), 134.20 (CH), 134.2 (C), 136.3 (C), 140.6 (C), HRMS (ES⁺): m/z (M+H) calcd for C₁₉H₁₈NO₂S: 324.1037 found: 324.1032. Anal. Calcd for C₁₉H₁₇NO₂S: C, 70.56, H, 5.30, N, 4.33, S, 9.91. Found: C, 70.30, H, 5.09, N, 4.48, S, 9.59.

2.1.2.12. N-(2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)-4-nitrobenzenesulfonamide (12a). Yield 70%, mp 175–178 °C, ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.82 (quintet, $J = 7.5, 2H$), 2.57 (t, $J = 7.5, 2H$), 2.77 (t, $J = 7.5, 2H$), 6.83 (dd, $J = 3.5, J = 5.5, 1H$), 7.03 (s, 1H), 7.05 (d, $J = 5.5, 1H$), 7.92 (d, $J = 8.8, 2H$), 8.34 (d, $J = 8.8, 2H$), 10.05 (bs, 1H, NH), ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ = 24.9 (CH₂), 30.6 (CH₂), 33.0 (CH₂), 122.7 (CH), 122.8 (CH), 124.9 (CH), 127.4 (CH), 128.5 (CH), 132.4 (C), 139.5 (C), 146.0 (C), 146.2 (C), 150.1 (C). Anal. Calcd for

$C_{15}H_{14}N_2O_4S$: C, 56.59, H, 4.43, N, 8.80, S, 10.07. Found: C, 56.83, H, 4.51, N, 8.91, S, 9.68.

2.1.2.13. *N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)-benzenesulfonamide (12b). Yield 96%, mp 140–143 °C, 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 1.77 (quintet, J = 7.5, 2H), 2.50 (t, J = 7.5, 2H), 2.75 (t, J = 7.5, 2H), 6.87 (dd, J = 2.5, J = 6.6, 1H), 7.01 (m, 2H), 7.55 (m, 3H), 7.66 (dd, J = 1.5, J = 7, 2H), 9.67 (bs, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 24.9 (CH₂), 30.4 (CH₂), 33.0 (CH₂), 122.2 (CH), 122.5 (CH), 126.9 (CH), 127.2 (CH), 129.5 (CH), 133.0 (CH), 133.1 (C), 139.0 (C), 140.7 (C), 145.6 (C), HRMS (TOF⁺): m/z (M+H) calcd for $C_{15}H_{16}NO_2S$: 274.0896, found 274.0902. Anal. Calcd for $C_{15}H_{15}NO_2S$: C, 65.91, H, 5.53, N, 5.12, S, 11.73. Found: C, 65.67, H, 5.57, N, 5.13, S, 11.72.

2.1.2.14. *N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)-4-fluorobenzenesulfonamide (12c). Yield 97%, mp 115–117 °C, 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 1.80 (quintet, J = 7.5, 2H), 2.52 (t, J = 7.5, 2H), 2.77 (t, J = 7.5, 2H), 6.85 (dd, J = 2.8, J = 6, 1H), 7.02 (m, 2H), 7.40 (t, J = 8.8, 2H), 7.72 (ddd, J = 5.2, J = 8.8, 2H), 9.71 (bs, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 24.9 (CH₂), 30.5 (CH₂), 33.0 (CH₂), 116.6 (d, J_{C-F} = 22.5, CH), 122.4 (CH), 122.6 (CH), 127.2 (CH), 130.0 (d, J_{C-F} = 9.7, CH), 133.0 (C), 137.1 (d, J_{C-F} = 3, C), 139.2 (C), 145.7 (C), 164.5 (d, J_{C-F} = 247.5, C), HRMS (TOF⁺): m/z (M+H) calcd for $C_{15}H_{15}FNO_2S$: 292.0802, found 292.0808.

2.1.2.15. *N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)-1-naphthalenesulfonamide (12d). Yield 63%, mp 185–186 °C, 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 1.65 (q, J = 7.4, 2H), 2.39 (t, J = 7.4, 2H), 2.66 (t, J = 7.4, 2H), 6.86 (dd, J = 1.8, J = 7.3, 1H), 6.92 (d, J = 7.3, 1H), 6.96 (t, J = 7.3, 1H), 7.57 (t, J = 8.2, 1H), 7.66 (m, 2H), 8.07 (m, 2H), 8.21 (d, J = 8.2, 1H), 8.70 (m, 1H), 9.98 (bs, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 24.7 (CH₂), 30.3 (CH₂), 32.9 (CH₂), 121.6 (CH), 121.8 (CH), 124.8 (CH), 125.0 (CH), 127.1 (CH), 127.2 (C), 127.9 (C), 128.1 (C), 129.3 (CH), 129.6 (C), 133.0 (CH), 134.1 (C), 134.5 (C), 135.7 (CH), 138.3 (CH), 145.7 (CH), HRMS (ES⁺): m/z (M+H) calcd for $C_{19}H_{18}NO_2S$: 324.1053 found: 324.1039. Anal. Calcd for $C_{19}H_{17}NO_2S$: C, 70.56, H, 5.30, N, 4.33, S, 9.91. Found: C, 70.3, H, 5.31, N, 4.46, S, 9.55.

2.1.2.16. *N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl)-benzenesulfonamide (13a) [17]. Yield: 91%, mp: 150–154 °C, 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 1.92 (m, 2H), 2.72 (m, 4H), 6.84 (dd, J = 8.1, J = 2.1, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.02 (d, J = 8.1, 1H), 7.53 (m, 3H), 7.72 (d, J = 7.9, 2H), 10.1 (brs, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 25.4 (CH₂), 31.9 (CH₂), 32.6 (CH₂), 117.1 (CH), 118.9 (CH), 124.9 (CH), 127.0 (CH), 129.5 (CH), 134.0 (CH), 136.0 (C), 139.9 (C), 140.0 (C), 145.4 (C), HRMS-ESI⁺: m/z calcd for $C_{15}H_{15}NO_2S$: 273.0823, found: 273.0826. Anal. Calcd for $C_{15}H_{15}NO_2S$: C, 65.91, H, 5.53, N, 5.12, S, 11.73. Found: C, 66.075, H, 5.48, N, 5.15, S, 11.46.

2.1.2.17. *N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl)-4-fluorobenzenesulfonamide (13b). Yield 87%, mp 134–136 °C, 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 1.93 (quintet, J = 7, 2H), 2.73 (m, 4H), 6.82 (dd, J = 2, J = 8, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.03 (d, J = 8, 1H), 7.38 (t, J = 8.8, 2H), 7.72 (dd, J = 5.1, J = 8.8, 2H), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 25.4 (CH₂), 32.0 (CH₂), 32.6 (CH₂), 116.8 (CH, d, J_{C-F} = 22, CH), 117.4 (CH), 119.2 (CH), 125.0 (CH), 130.0 (d, J_{C-F} = 9.75, CH), 135.8 (C), 136.3 (d, J_{C-F} = 3, C), 140.3 (C), 145.1 (C), 164.5 (d, J_{C-F} = 249.7, C), HRMS (ES⁺): m/z (M+H) calcd for $C_{15}H_{15}FNO_2S$: 292.0808, found: 292.0805. Anal. Calcd for $C_{15}H_{14}FNO_2S$: C, 61.84, H, 4.84, N, 4.81, S, 11.00. Found: C, 61.72, H, 4.88, N, 4.78, S, 10.95.

2.1.2.18. *N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl)-1-naphthalenesulfonamide (13c). Yield 88%, mp 112–115 °C, 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 1.86 (quintet, J = 7.5, 2H), 2.65 (t, J = 7.5, 4H), 6.67 (dd, J = 2.1,

J = 8, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.94 (d, J = 8, 1H), 7.71 (m, 3H), 8.06 (d, J = 8, 1H), 8.16 (m, 2H), 8.74 (d, J = 8, 1H), 10.48 (bs, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 25.3 (CH₂), 31.9 (CH₂), 32.6 (CH₂), 116.1 (CH), 117.9 (CH), 124.7 (CH), 124.8 (CH), 124.9 (CH), 127.3 (CH), 127.9 (C), 128.4 (CH), 129.4 (CH), 130.1 (CH), 134.1 (C), 134.6 (CH), 135.0 (C), 136.0 (C), 139.5 (C), 144.9 (C), HRMS (ES⁺): m/z (M+Na) calcd for $C_{19}H_{17}NNaO_2S$: 346.0878 found 346.0883. Anal. Calcd for $C_{19}H_{17}NO_2S$: C, 70.78, H, 5.00, N, 4.34, S, 9.94. Found: C, 70.40, H, 5.25, N, 4.38, S, 9.69.

2.1.2.19. *N*-(5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-yl)-1-naphthalenesulfonamide (14). Yield 45%, mp 187–189 °C, 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ = 1.34 (m, 2H), 1.47 (m, 2H), 2.34 (t, J = 6.2, 2H), 3.38 (t, J = 6.2, 2H), 6.70 (dd, J = 1.5, J = 7.54, 1H), 6.84 (d, J = 7.5, 1H), 6.87 (d, J = 7.5, 1H), 7.57 (t, J = 7.7, 1H), 7.65 (m, 2H), 8.05 (m, 2H), 8.20 (d, J = 8.29, 1H), 8.65 (m, 1H), 9.75 (bs, 1H, NH), ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 22.4 (CH₂), 22.5 (CH₂), 24.6 (CH₂), 29.3 (CH₂), 123.7 (CH), 124.9 (CH), 125.1 (CH), 125.6 (CH), 127.2 (CH), 127.6 (CH), 127.9 (C), 128.0 (CH), 129.2 (CH), 129.3 (CH), 133.7 (C), 134.1 (C), 134.4 (CH), 134.8 (C), 136.4 (C), 138.3 (C), HRMS (ES⁺): m/z (M+H) calcd for $C_{20}H_{20}NO_2S$: 338.1209 found: 338.1202.

2.2. Biological studies

2.2.1. Cell culture

Jurkat (Acute T-cell Leukemia, a gift from Prof. Joan Gil, IDIBELL, Barcelona), Jeko-1 (Non-Hodgkin Lymphoma, a gift from Beatriz Martínez, CNIO, Madrid), JVM-2, Granta-549 (Non-Hodgkin Lymphoma, a gift from Dr. Dolors Colomer, Hospital Clínic, Barcelona), and Z-138 (Non-Hodgkin Lymphoma, a gift from Dr. Eva Ortega-Paino, Lund University, Lund) were maintained in RPMI-1640 with L-glutamine and HEPES (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel). LN229, U251, U373 (Glioma, a gift from Dr. Joan Seoane, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona), SKMG-3 (Glioma, a gift from Dr. Hans Skovgaard, Rigshospitalet, Oslo), PC-3 (Prostate Cancer, a gift from Prof. Anne J. Ridley, King's College, London), SW480 and SW620 (Colorectal cancer, a gift from Prof. Eric Lam, Imperial College, London) cells were maintained in DMEM High Glucose (4.5 g/l) with L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cells were grown in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO₂. RPMI and DMEM were supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum and 100 units/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). All cell lines were subconfluent grown and passaged, routinely tested for mycoplasma contamination and subjected to frequent morphological tests and growth curve analysis as quality-control assessments. All cell lines were treated at a prophylactic concentration of 5 μ g/ml Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA).

2.2.2. Cell viability analysis

The number of viable cells in culture was determined based on quantification of ATP, which signals the presence of metabolically active cells, using the Cell Titer-Glo[®] luminescent assay kit (Promega, Madison, WI). Following the manufacturer's instructions, the cells were plated in 96-well plates, treated 24 h later with the compounds for the indicated times and concentrations, followed by addition of Cell Titer-Glo reagent. Luminescence was detected using a multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT).

2.2.3. Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining. Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 70% ethanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Fixed cells

were then washed twice in PBS and stained with 50 µg/ml propidium iodide (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) in the presence of 50 µg/ml RNase A (Sigma–Aldrich, St Louis, MO), then analyzed by flow cytometry using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL, Beckman Coulter, Fullerton, CA) and winMDI software.

2.2.4. Annexin V-FITC/propidium iodide flow cytometric analysis

Analysis of phosphatidylserine externalization in apoptotic cells was determined by an ApoTarget Annexin-V-FITC Apoptosis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. 2×10^5 cells were seeded in 6-well plates and treated as indicated. Cells were then collected and suspended in 100 µl of Annexin V-binding buffer. 5 µl of Annexin-V-FITC and 10 µl of propidium iodide were added and incubated 15 min at room temperature in the dark. Flow cytometry analysis was carried out using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL, Beckman Coulter, Fullerton, CA) and winMDI software.

2.2.5. Caspase activity analysis

Enzymatic activity of caspases was determined by measurement of caspases-3 and 7 activity by means of the luminometric Caspase-Glo 3/7 assay (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's protocol using a Synergy HT multi-detection microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT).

2.2.6. γ -H2A.X quantification

DNA damage was assessed monitoring the intensity of γ -H2A.X fluorescence using flow cytometry. Briefly, trypsinized cells were collected by centrifugation, washed in PBS and fixed in 3.7% formaldehyde (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) for 15 min on ice. Cells were then permeabilized with 0.2% v/v Triton-X (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) for 10 min, and incubated with 1:400 rabbit anti-p-(S139)-H2A.X antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) for 30 min on ice, washed in Triton-X 0.1% in PBS and incubated with 1:400 anti-rabbit Alexa 555-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) for 20 min on ice and washed. Flow cytometry analysis was carried out using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL, Beckman Coulter, Fullerton, CA) and Flowing software.

2.2.7. Clonogenic assays

Cells were seeded in 12-well plates. 24 h later, cells were treated for 3 h with 10 µM **8e** or vehicle alone as a control. Cells were then washed with PBS, trypsinized and plated at low density (3000 cells/60-mm plate). Cells were allowed to divide and form colonies for 7–10 days. The colonies were fixed and stained with 0.5% (w/v) crystal violet (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) in 70% ethanol and the number of colonies counted. All experiments were performed in triplicate.

2.2.8. Gel electrophoresis and immunoblotting

Cells were harvested in a buffer containing 50 mM Tris–HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% (v/v) Triton X-100 plus protease and phosphatase inhibitors (all from Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). Protein content was measured by the Bradford procedure. Cell lysates were electrophoresed in SDS–polyacrylamide gels. After electrophoresis the proteins were transferred to Immobilon-P strips (Millipore, Billerica, MA) for 2 h at 60 V. The sheets were pre-incubated in TBS (20 mM Tris–HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.05% Tween 20 and 5% defatted milk powder for 1 h at room temperature and then incubated for 1 h at room temperature in TBS, 0.05% Tween 20, 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) and 0.5% defatted milk powder containing the appropriate antibodies: p-Chk1 (Ref. 2348, Cell Signaling Technology, Beverly, MA 1:1000) and β -tubulin (T0198, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, 1:4000). After washing in TBS,

0.05% Tween 20, the sheets were incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark, 1/2000 dilution,) for 1 h at room temperature. After incubation, the sheets were washed twice in TBS, 0.05% Tween 20 and once in TBS. The peroxidase reaction was visualized by the enhanced chemiluminescence detection system (Millipore, Billerica, MA).

2.2.9. Tubulin staining

Cells grown on coverslips were fixed in ice-cold Methanol (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) for 2 min, permeabilized in 0.2% (v/v) Triton X-100 for 30 min and blocked by incubating in 5% BSA for 30 min. Tubulin filaments were visualized by incubating the fixed cells for 1 h at 37 °C with anti- β -tubulin (T0198, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, 1:400), washing thrice in PBS and incubating with donkey anti-mouse–Alexa 488 (A21202, Life Technologies, Carlsbad, CA, 1:400) in the presence of DAPI (32670, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, 1:300). Stained cells were analyzed on a Leica TCS SPE confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.2.10. Senescence assays

Cells were plated subconfluently and treated for 24 h with 10 µM **8e**. Cells were then washed with PBS, fixed in 3% (v/v) formaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, and then incubated with a stain solution containing 1 mg/ml of β -D-galactoside, for 24 h at 37 °C with the Senescence Cells Histochemical Staining Kit (CS0030, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). Blue-stained cells were counted in at least 10 fields at 10 \times magnification, and the number of stained cells was expressed as the percentage of positive cells relative to total cell number.

2.2.11. Cell motility assays

MCF-7 cells and LN229 cells were plated in 6-well plates (4×10^5 cells/plate), wounded thrice with a sterile tip and 4 representative images were collected (time 0 h). After 16 h, images of the same regions were collected and the ratio of cell motility in each experimental condition quantified.

2.2.12. In vitro tubulin polymerization assays

The polymerization of purified monomeric tubulin *in vitro* was measured using the tubulin polymerization assay kit (Cytoskeleton Inc, Denver, CO) according to the manufacturer's instructions. Briefly, Tubulin (>99% pure) was reconstituted to 3 mg/ml in ice-cold 80 mM PIPES pH 6.9, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP, 10.2% glycerol. 100 µl of the reconstituted tubulin was added to each well of a 96-well plate (pre-warmed at 37 °C) and was either untreated or exposed to the indicated compounds at the specified concentrations, in duplicate. The absorbance at 340 nm was measured every 60 s for one hour at 37 °C using a Synergy HT multi-detection microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT).

2.2.13. Statistical analysis

The statistical significance of differences was assessed by Student's *t* test using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA). Statistically significant differences are indicated by ****p* < 0.001, ***p* < 0.01 and **p* < 0.05.

2.3. DNA binding studies

Double-stranded ctDNA was purchased from commercial sources (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) and used without further purification. Polynucleotide was dissolved in sodium cacodylate buffer, *I* = 0.05 M (pH = 7.0), additionally sonicated and filtered through a 0.45 µm filter. DNA concentration per nucleotide was determined by absorption spectroscopy, using the molar extinction coefficient of 6600 M⁻¹ cm⁻¹ at 260 nm. The stock solution of compound **8e** was prepared, due to the poor solubility in water,

at a concentration of 1 mM in DMSO and diluted into buffer solution at the desired concentration.

2.3.1. Thermal denaturation experiments

Thermal denaturation experiments were performed in a stoppered quartz cuvettes (1 cm path length) using an Agilent 8453 spectrometer equipped with a Peltier temperature controller system (± 0.1 °C). Thermal melting curves for ctDNA were determined by following the absorption change at 260 nm in the absence or presence of **8e** as a function of temperature.

The absorbance intensity of wavelength 260 nm was measured over a temperature range of 25–98 °C. The temperature of the samples was raised in 0.5 °C increments and equilibrated for 1 min at each temperature setting. Absorbance of the ligands was subtracted from every curve, and the absorbance scale was normalized. The T_m values were taken as the midpoints of the transition curves, determined from the maximum of the first derivative and checked graphically by the tangent method. ΔT_m values were calculated subtracting T_m for the free polynucleotide from T_m of the complex ctDNA-**8e**. Every ΔT_m value here reported was the average of at least two measurements, the error in ΔT_m is ± 0.5 °C.

2.3.2. Fluorimetric experiments

Titration experiments were carried out at room temperature by adding increasing amounts of ctDNA to a 1×10^{-4} M ligand solution. All solutions were prepared in 50 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0) using doubly distilled water and passed through a Millipore apparatus. The absorbance of aqueous buffered solution of **8e** was proportional to their concentrations up to 100 μ M. Hence, no significant intermolecular aggregation of the compounds, which would be expected to give rise to hypochromicity effects, occurred in the concentration range needed for the following spectroscopic studies. The emission spectra were recorded in the 317–500 nm range with excitation wavelengths of 300 nm. Absorption and volume correction procedures were applied to the raw fluorescence data.

Ethidium Bromide Displacement Assays were recorded on a spectrofluorimeter in the 540–680 nm range with an excitation wavelength of 520 nm. The fluorescence was normalized by the maximum fluorescence signal when EB was bound to the DNA in the absence of competition for binding and was corrected for background fluorescence of free EB in solution.

2.3.3. Circular dichroism experiments

CD spectra were recorded on a JASCO J815 spectropolarimeter between 400 and 200 nm in continuous scanning mode (50 nm/min, 1 nm bandwidth, and 1 s response time). All of the CD spectra were generated and represented averages of five scans. Measurements were performed by adding progressively increasing amounts of **8e** to different solutions of ctDNA (1×10^{-5} M) in 50 mM cacodylate buffer (pH 7).

2.4. Docking experiments

The pDBs of tubulin in complex with benzenesulfonamides ABT-751 (3HKC.pdb) and T138067 (3HKE.pdb), colchicine (3UT5), pyrrolidinedione TN16 (3HKD), two enantiomeric pyridopyrazines (3N2G.pdb and 3N2K.pdb) and podophyllotoxin (1SA1) were retrieved from the protein data bank [19] and only the chains and ligands corresponding to one tubulin dimer were used. The ligands were built with Sparta08, prepared with AutoDockTools [20] and docked with AutoDock 4.2 [21] by running 100–300 times the Lamarckian genetic algorithm (LGA) with a maximum of 2.5×10^6 energy evaluations, 150 individuals in population and a maximum of 27,000 generations. The results were analyzed with

AutoDockTools and with an in-house developed java-based software tool [22].

3. Results

Taking into account our previous results on antiparasitic agents targeting *L. infantum* β -tubulin and the increasing therapeutic relevance of sulfonamide derivatives as antitumoral compounds, we decided to assess the potential anticancer activity of our sulfonamide library in a combined effort performing an array of cell biological and chemical studies in order to identify and characterize bioactive compounds.

3.1. Chemistry

The insertion of the secondary sulfonamide group into the organic scaffolds is chemically straightforward and different methods have been adopted [23]. Sulfonamides **1–14** were prepared as previously described by condensation of the corresponding sulfonyl chloride with amine derivatives in pyridine at 0 °C [16]. The compounds were obtained in good yields and characterized by ^1H NMR and ^{13}C NMR spectroscopy, CHNS elemental analysis and HRMS.

3.2. Biological activities

3.2.1. Antiproliferative activities

All compounds were evaluated for their *in vitro* antiproliferative activity against a panel of representative human cancer cell lines, including cells from both solid tumors (colorectal, brain, prostate) and hematological malignancies (leukemia, lymphoma). Cells were treated for 48 h with 10 μ M of the indicated compounds and cell viability was assessed using a luminescent-based ATP assay. This commonly-used concentration was selected in our initial screen in order to discard as ineffective any compounds showing a negative biological effect. These results clearly indicated that one compound, sulfonamide **8e**, showed a significant antiproliferative activity across the panel (Fig. 2A). Similar results were obtained with additional cell lines including U87MG, U251, U373, Granta-519, JVM-2, Z-138, and SW480 (data not shown). In agreement with its effects on cell viability, phase-contrast microscopy indicated that treatment with **8e** reduced LN229 and PC-3 cell proliferation and induced morphological changes consistent with the induction of cell death (Fig. 2B). Dose–response experiments in selected cell lines indicated that sulfonamide **8e** was endowed with a pharmacologically-interesting antiproliferative activity in the nanomolar/low micromolar range, with IC_{50} values ranging from 91 nM (Jurkat) to 17 μ M (PC-3) (Fig. 2C). Differences in sensitivity are not likely to be related to expression of ATP-binding cassette drug transporters, since the IC_{50} value for U87MG cells is within the same range as for LN229 cells (Fig. 2C), and LN229 but not U87MG cells have been shown to overexpress P-gp and MRP-1 [24].

Based on the results obtained with **8e**, we decided to synthesize an additional series of compounds including naphthyl groups or related aromatic rings in order to test whether this functional group could somehow be responsible for the antiproliferative activity induced by **8e**. These compounds were tested for their antiproliferative activity against three representative cancer cell lines: Jeko-1, SKMG-3 and SW620, analyzing their viability at 48 h upon a standard 10 μ M treatment. Surprisingly, none of the newly-synthesized compounds showed significant antiproliferative activity when compared to **8e** (Fig. 2D). We thus proceeded to further characterize the cellular effects of **8e**, selected as the only active compound within this series of sulfonamides.

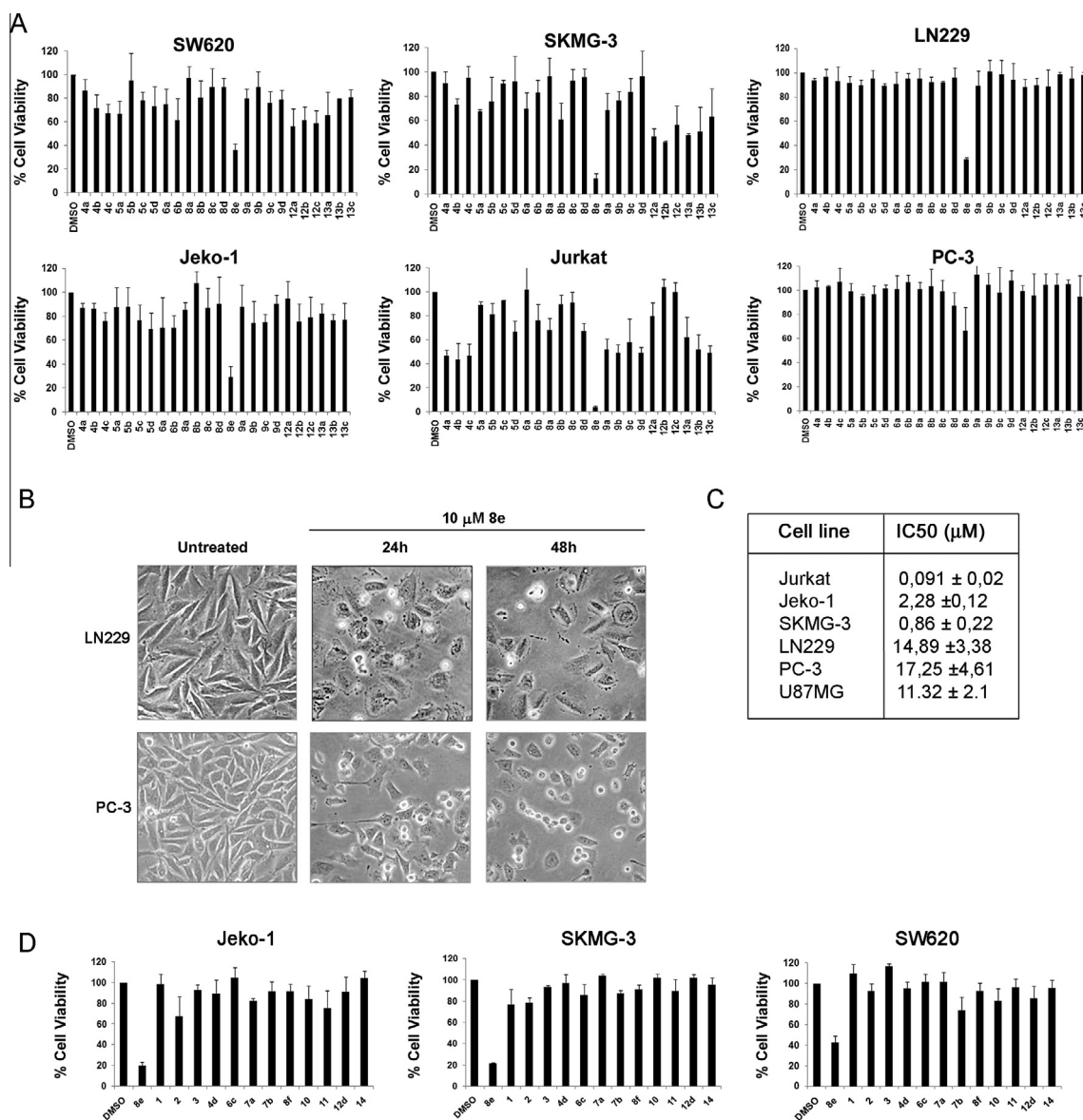


Fig. 2. Screening of sulfonamide compounds against human cancer cell lines. (A) The indicated cell lines were treated for 48 h with 10 μM of the indicated sulfonamide compounds. The mean ± SD values from three independent experiments, each conducted in triplicate, are shown in the graph, representing the percentage of viable cells relative to untreated conditions. (B) Representative phase contrast micrographs of LN229 (top) and PC-3 (bottom) cells left untreated or treated for 24 h and 48 h with 10 μM sulfonamide **8e**. (C) IC₅₀ mean ± SD values for the indicated cell lines, obtained from three independent experiments, each conducted in triplicate. (D) The indicated cell lines were treated for 48 h with 10 μM of the indicated sulfonamide compounds. The mean ± SD values from three independent experiments, each conducted in triplicate, are shown in the graph, representing the percentage of viable cells relative to untreated conditions.

3.2.2. Effect on cell cycle progression and cellular senescence

Flow cytometry studies upon propidium iodide staining in a number of cell lines treated with 10 μM **8e** were performed in order to analyze its impact on cell cycle progression. A 24 h treatment with **8e** induced a remarkable increase in the G2/M population in both LN229 and PC-3 cells (Fig. 3A), which led to a dramatic G2/M arrest at 48 h in all the cell lines tested (Fig. 3B). We next analyzed induction of cellular senescence upon **8e** treatment, performing a standard senescence assay based on the quantification of β-galactosidase positivity [25]. Whereas untreated PC-3 cells were β-gal negative at all observed time-points, treatment of PC-3 cells with **8e** led to a dramatic increase in the proportion of β-gal positive cells, already detectable at 24 h and further increased at 48 h and 72 h (Fig. 3C). These data indicate that prolonged cell cycle arrest induced by sulfonamide **8e** also leads to the induction of the cellular senescence program.

3.2.3. Induction of apoptosis

We next assessed whether treatment with **8e** was also able to promote cellular death. For this purpose, we investigated whether treatment with **8e** could induce apoptosis in LN229 and PC-3 cells. Flow cytometric analysis upon double Annexin V/propidium iodide staining of **8e**-treated cells indicated that, in both cell lines, there was an increase in the early apoptotic (Annexin V-positive) fraction at 24 h (Fig. 4A). This was then followed by a dramatic shift of the cellular population to the early apoptotic quadrant at 72 h, with a significant proportion of cells progressing to late apoptosis (double Annexin V and propidium iodide-positive cells, upper right quadrant) (Fig. 4A and B).

In order to confirm that cell death in response to **8e** was associated with the activation of caspases, we analyzed caspase activation. For this purpose, we first assessed caspase 3 cleavage in response to **8e** treatment in LN229 and in the highly-sensitive

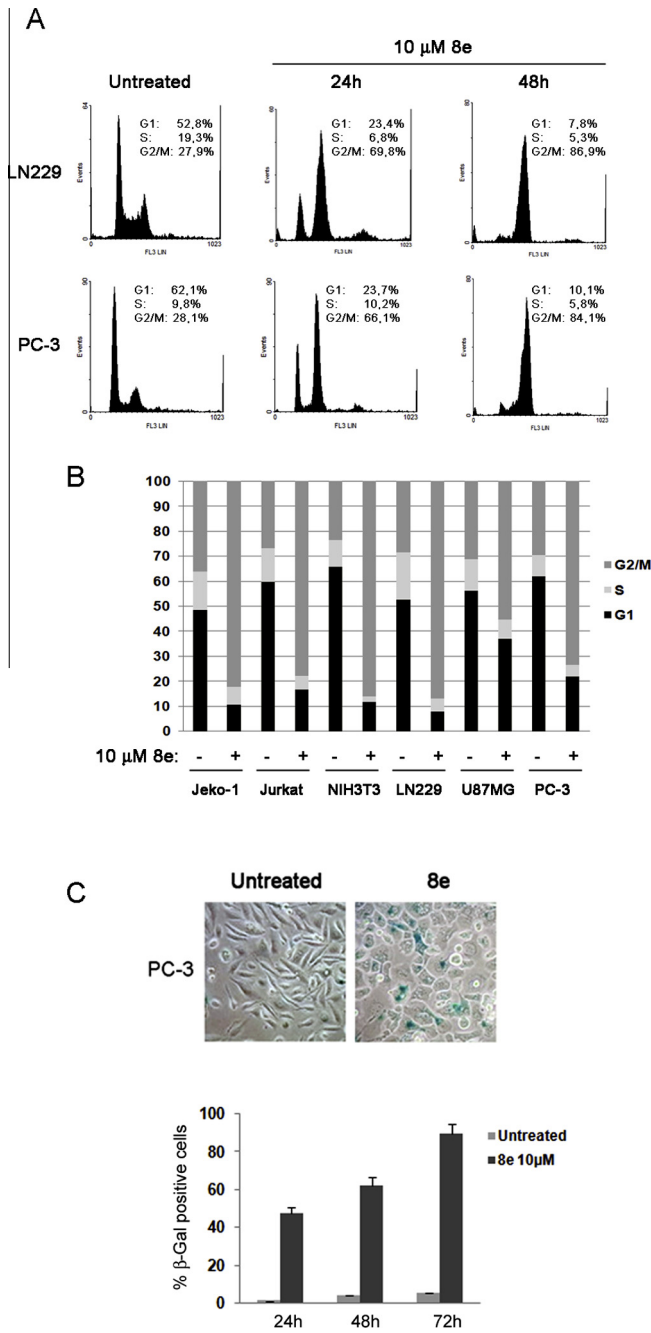


Fig. 3. Sulfonamide **8e** induces G2/M arrest and cellular senescence. (A) LN229 and PC-3 cells were left untreated or were treated for 24 h and 48 h with 10 μM **8e**. Cells were harvested and their DNA content analyzed by flow cytometry as described in Methods. The cell cycle distribution is shown for each experimental condition. (B) The graph summarizes the flow cytometry data obtained in all tested cell lines, indicating the cell cycle distribution in control and **8e**-treated conditions (48 h) for each cell line. (C) PC-3 cells were left untreated or treated for 48 h with 10 μM **8e** and stained for β-galactosidase as indicated in Methods. The mean ± SD values from three independent experiments, each conducted in triplicate, are shown in the graph, representing the percentage of β-galactosidase positive cells related to untreated conditions at the indicated time points.

SKMG-3 cell line. As expected, exposure to **8e** led to the appearance of the low molecular bands indicative of cleaved, active caspase-3 (Fig. 4C). In correlation with their higher sensitivity to **8e**, SKMG-3 cells showed a more dramatic induction of caspase-3 cleavage (Fig. 4C). In agreement with these observations, treatment with 10 μM **8e** for 48 h induced a detectable increase in the activity of the executioner caspases 3/7 in most cell lines (Fig. 4D).

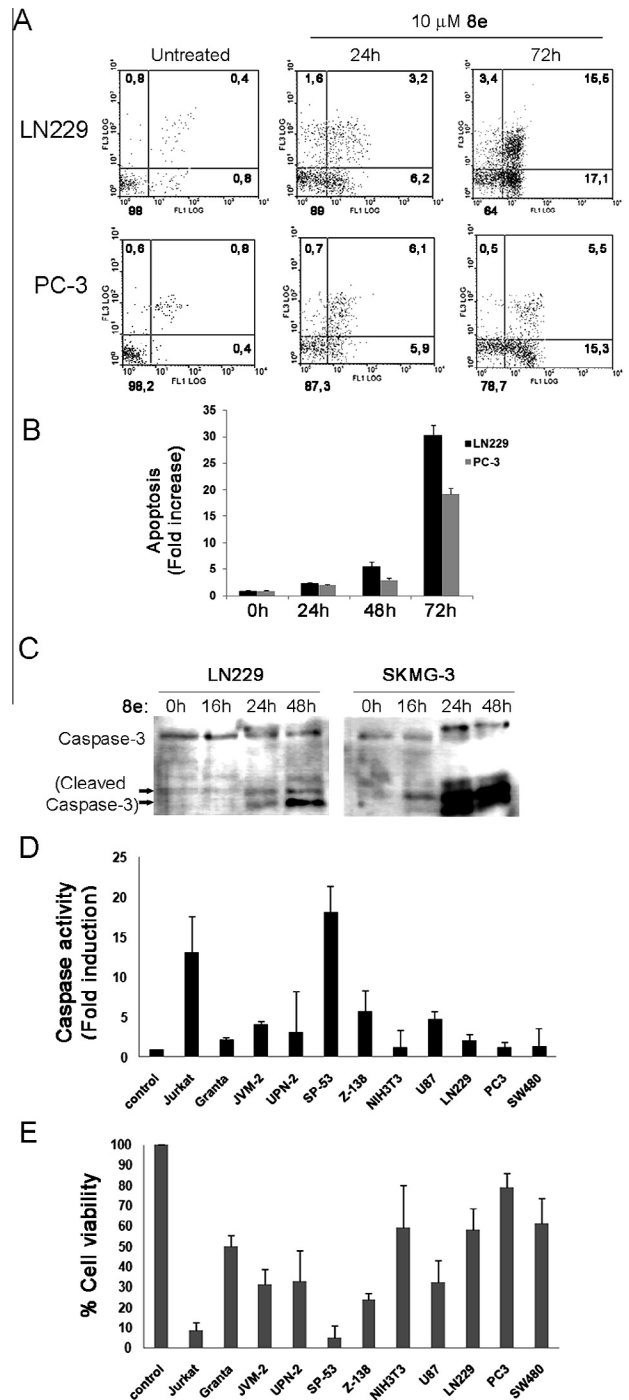


Fig. 4. Sulfonamide **8e** induces apoptosis and activation of executioner caspases. (A) LN229 and PC-3 cells were left untreated or were treated for 24 h and 72 h with 10 μM **8e**. Cells were harvested, stained with Annexin V-FITC/Propidium Iodide and analyzed by flow cytometry as described in Methods. The x-axis shows Annexin V-FITC staining and y-axis indicates Propidium iodide staining. The percentage of cells in each quadrant is shown. (B) The graph represents the fold increase in apoptotic LN229 and PC-3 cells, relative to untreated cells, at the indicated time-points. (C) LN229 and SKMG-3 cells were treated with 10 μM **8e**, harvested at the indicated time points and cellular extracts analyzed by immunoblot with anti-caspase 3 antibodies. (D) The indicated cell lines were left untreated (control) or were treated for 48 h with 10 μM **8e** and caspase 3/7 activity was measured as indicated in Methods. The data shows the mean ± SD values from three independent experiments, each conducted in triplicate, representing the fold induction in caspase activity relative to untreated cells. (E) The indicated cell lines were left untreated (control) or were treated for 48 h with 10 μM **8e** and cell viability was measured as indicated in Methods. The data shows the mean ± SD values from three independent experiments, each conducted in triplicate, representing the percentage of viable cells relative to untreated cells.

Importantly, the levels of caspase activation inversely correlated with the reduction on cell viability induced by **8e** treatment in those same cell lines (Fig. 4D). Taken together, these results indicate that prolonged treatment with **8e**, which rapidly induces a G2/M cell cycle arrest, leads to the onset of caspase-dependent apoptosis and thus to cell death.

3.2.4. DNA damage analysis

In order to assess whether **8e** could induce cellular DNA damage we used flow cytometry to measure the staining of histone H2A.X phosphorylated at Ser-139 (also termed γ -H2A.X) which is a well-established readout for DNA damage, since H2A.X becomes rapidly phosphorylated upon DNA double-strand breaks [26]. Whereas only a modest background level of γ -H2A.X staining was detected in untreated Z-138 cells, treatment with **8e** induced a clear shift yielding a γ -H2A.X-positive population (Fig. 5A). Quantification of γ -H2A.X staining revealed a 6-fold increase upon **8e** treatment in Z-138 cells, and very similar results were also obtained in both LN229 and SP-53 cells (Fig. 5B).

We next investigated whether **8e** could promote the sustained growth-inhibitory effects elicited by DNA-damaging agents, performing clonogenic assays upon a short exposure to **8e**. To this end, LN229 and PC-3 cells were treated with 10 μ M **8e** for 3 h and seeded at low density to follow-up colony formation. Surprisingly, the clonogenicity of **8e**-treated cells was very similar to that of untreated cells (Fig. 5C), whereas treatment with a standard genotoxic agent such as etoposide significantly reduced colony formation (data not shown).

In order to investigate whether **8e** was able to promote the activation of the DNA damage checkpoint, we analyzed the phosphorylation levels of the checkpoint signal-transducing kinase Chk1. As expected, treatment with etoposide clearly induced a time-dependent increase in the phosphorylation levels of Chk1.

In sharp contrast, Chk1 activation was undetectable upon **8e** exposure as indicated by the absence of phosphorylation induction (Fig. 5D). In agreement with these observations, studies aimed at elucidating whether **8e** could structurally alter purified DNA *in vitro* yielded negative results. Thermal denaturation, fluorescence titration, ethidium bromide displacement assays and circular dichroism studies, all indicated low affinity binding, ruling out **8e** as an *in vitro* DNA-damaging compound (data not shown). Altogether, these observations indicate that **8e** does not induce cell cycle arrest secondary to the activation of the DNA damage checkpoint.

3.2.5. Disruption of microtubule assembly

Since the cellular effects of **8e** are compatible with the response to antimetabolic agents, we next investigated whether **8e** could alter the pattern of the microtubule network in a number of cell lines. In NIH3T3, T98G, LN229 and MCF-7 cells tubulin staining revealed a well-organized network of filamentous microtubules. In contrast, treatment with **8e** for 24 h induced microtubule disassembly, with tubulin staining appearing as a disorganized meshwork mostly restricted to the perinuclear region (Fig. 6A). Analysis of tubulin staining in synchronized, untreated, NIH3T3 cells indicated the presence of a well-formed mitotic spindle at \sim 24 h shortly followed by cytokinesis. Importantly, neither the assembly of the mitotic spindle nor the presence of the cytokinetic ring was detected in **8e**-treated cells (Fig. 6B). Interestingly, in correlation with the effects of other established tubulin binders [27], long term treatment (>48 h) with **8e** also induced micronucleation (Fig. 6C). We finally investigated whether **8e** could directly influence tubulin polymerization *in vitro*. To this end, *in vitro* polymerization assays were performed to monitor the kinetics of tubulin polymerization in the absence or presence of **8e**. Interestingly, **8e** clearly induced a dose-dependent decrease in tubulin polymerization (Fig. 6D).

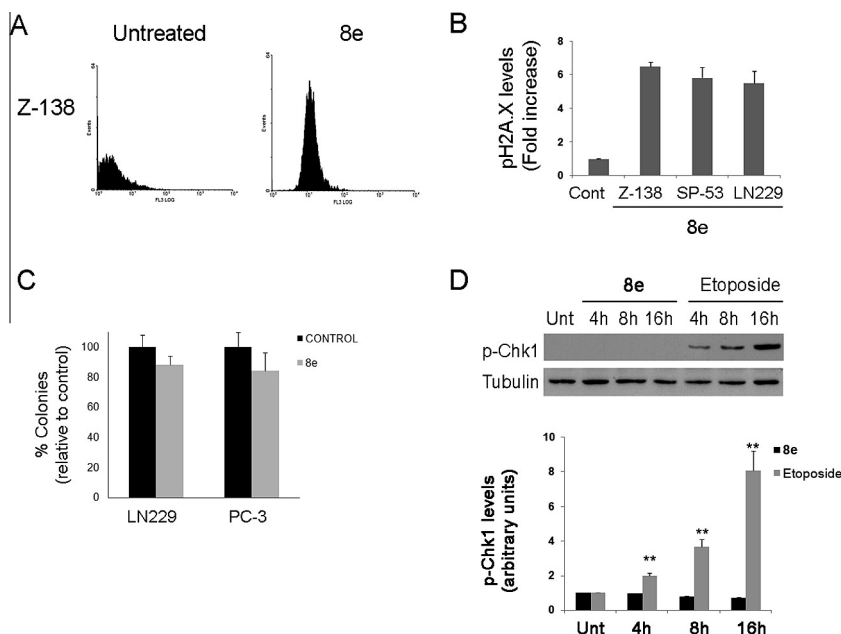


Fig. 5. Sulphonamide **8e** increases γ -H2A.X in the absence of DNA damage induction. (A) Z-138 cells were left untreated or were treated with for 4 h with 10 μ M **8e**, harvested, stained with anti-pH2A.X and analyzed by flow cytometry as indicated in Methods. The histograms represent the fluorescent intensity (y-axis) of p-H2A.X-positive (x-axis) events. (B) The graph summarizes the flow cytometry data obtained in all tested cell lines, representing the fold increase in p-H2A.X-positive fluorescence, relative to untreated cells (control). (C) LN229 and PC-3 cells were left untreated (control) or were treated for 3 h with 10 μ M **8e** and plated at low density to measure their clonogenic potential as indicated in Methods. The graph represents the percentage of viable colonies, relative to control. (D) PC-3 cells were left untreated or were treated with 10 μ M **8e** or 30 μ M etoposide for the indicated time-points, harvested and cellular extracts analyzed by immunoblot with the indicated specific antibodies. A representative immunoblot (Top) and a graph indicating the mean quantified levels of p-Chk-1 (Bottom) are shown. The differences between **8e** and etoposide are statistically significant (Student's *t*-test: ***p* < 0.01).

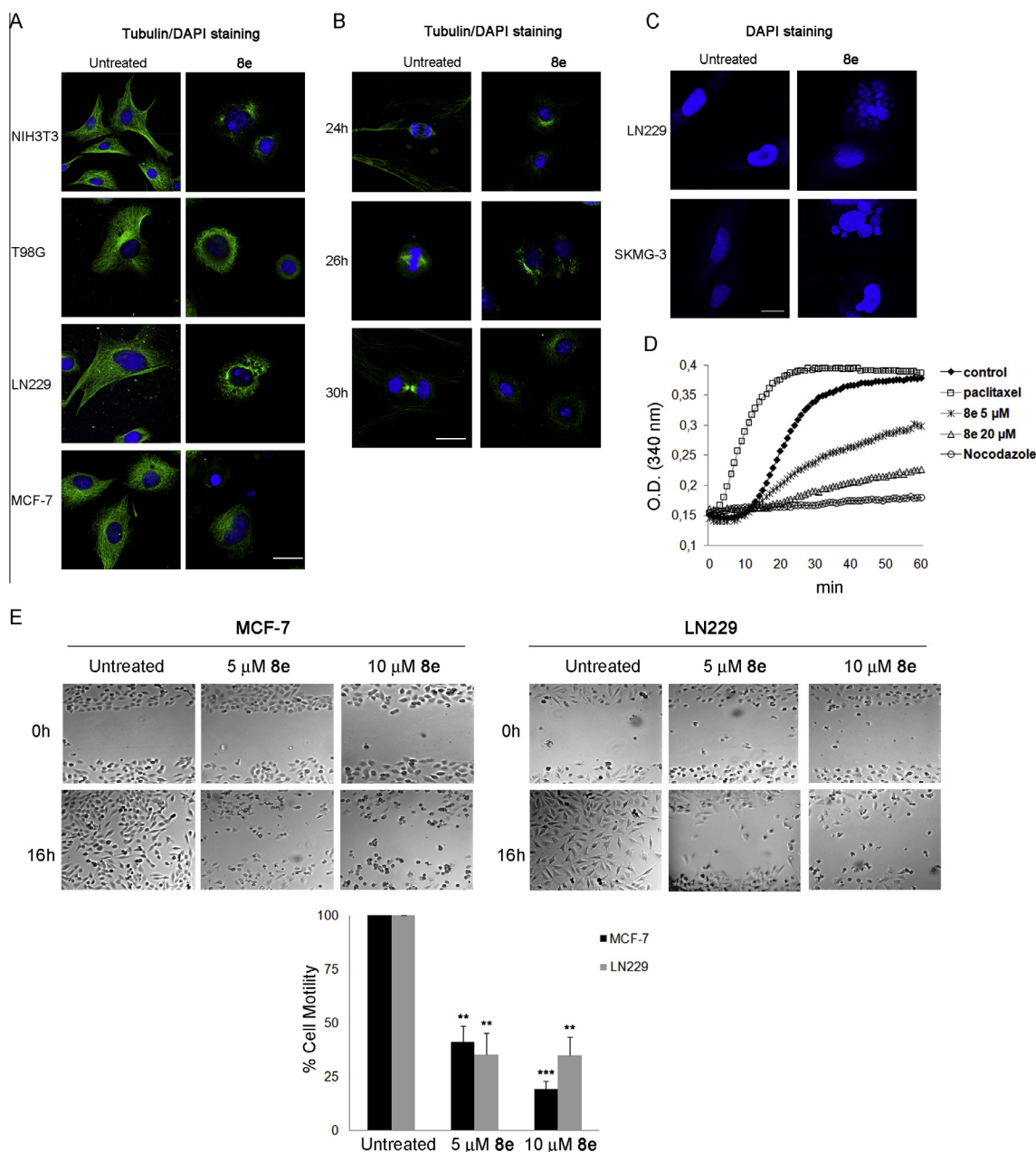


Fig. 6. Sulfonamide **8e** disrupts the tubulin cytoskeleton and alters tubulin polymerization. (A) The indicated cell lines were left untreated or were treated for 24 h with 10 μM **8e**, fixed and stained with anti-Tubulin and DAPI as indicated in Methods. Bar, 20 μm . (B) NIH3T3 cells were arrested by serum deprivation for 48 h, stimulated with 10% FCS to re-enter the cell cycle in the absence (untreated) or presence of 10 μM **8e**, fixed at the indicated time-points and stained with anti-Tubulin and DAPI. Bar, 20 μm . (C) LN229 and SKMG-3 cells were left untreated or were treated for 48 h with 10 μM **8e**, fixed and stained with DAPI. Bar, 20 μm . (D) Purified tubulin was incubated in the presence of DMSO (control), paclitaxel, nocodazole or the indicated concentrations of **8e** at 37 $^{\circ}\text{C}$. The graph depicts *in vitro* tubulin polymerization represented as the increase in absorbance at 340 nm (*y*-axis) over time (*x*-axis). (E) Representative phase-contrast micrographs of MCF-7 (left panel) and LN229 (right panel) cells left untreated or treated with 5 or 10 μM **8e** as indicated, before (upper panel, 0 h) and after (lower panel, 16 h) performing wound healing assays as described in Methods. The graph shows the mean \pm SD rate of motility, from three independent experiments performed in triplicate, expressed as the percentage of cell motility in each of the indicated conditions relative to untreated cells. The differences between control and **8e** treatment are statistically significant (Student's *t*-test: * $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

These results strongly indicate that sulfonamide **8e** interferes with tubulin polymerization dynamics, leading to microtubule cytoskeleton malfunction and mitotic arrest.

3.2.6. Inhibition of cancer cell motility

Since sulfonamide **8e** can interfere with tubulin polymerization, we investigated whether it could also inhibit cancer cell motility. To this end, we performed wound-healing assays using MCF-7 breast cancer cells and LN229 glioma cells, since they both are good models for cell motility assays. Both cell lines clearly showed a high rate of cell motility as indicated by the efficiency of gap

closure at 16 h. Interestingly, treatment with either 5 μM or 10 μM **8e** strongly reduced cell motility in both cell lines (Fig. 6E). These results indicate that **8e**, together with its previously described effects on cell proliferation, senescence and apoptosis, can inhibit cancer cell motility.

3.2.7. Sulfonamide **8e** is a reversible antimitotic agent

Since reversibility of antimitotic compounds is an important parameter in terms of predicting *in vivo* efficacy and undesirable side effects [28], we investigated the reversibility of the cellular effects of sulfonamide **8e**. We first analyzed whether disrupting

the treatment with **8e** would lead to the proper re-assembly of the microtubule network. Interestingly, 48 h after the removal of **8e**, cells displayed a completely reorganized microtubule cytoskeleton (Fig. 7A), which is undistinguishable from that of untreated cells (Fig. 6A). In agreement with this, cell proliferation inhibition was

also reverted 48 h upon **8e** washout, as indicated by the increase in both LN229 and PC-3 cell number detected in viability assays (Fig. 7B). As expected, proliferation is accompanied by progressive mitotic exit as indicated by the increase in the proportion of LN229 cells entering into the G1 phase of the cell cycle (Fig. 7C).

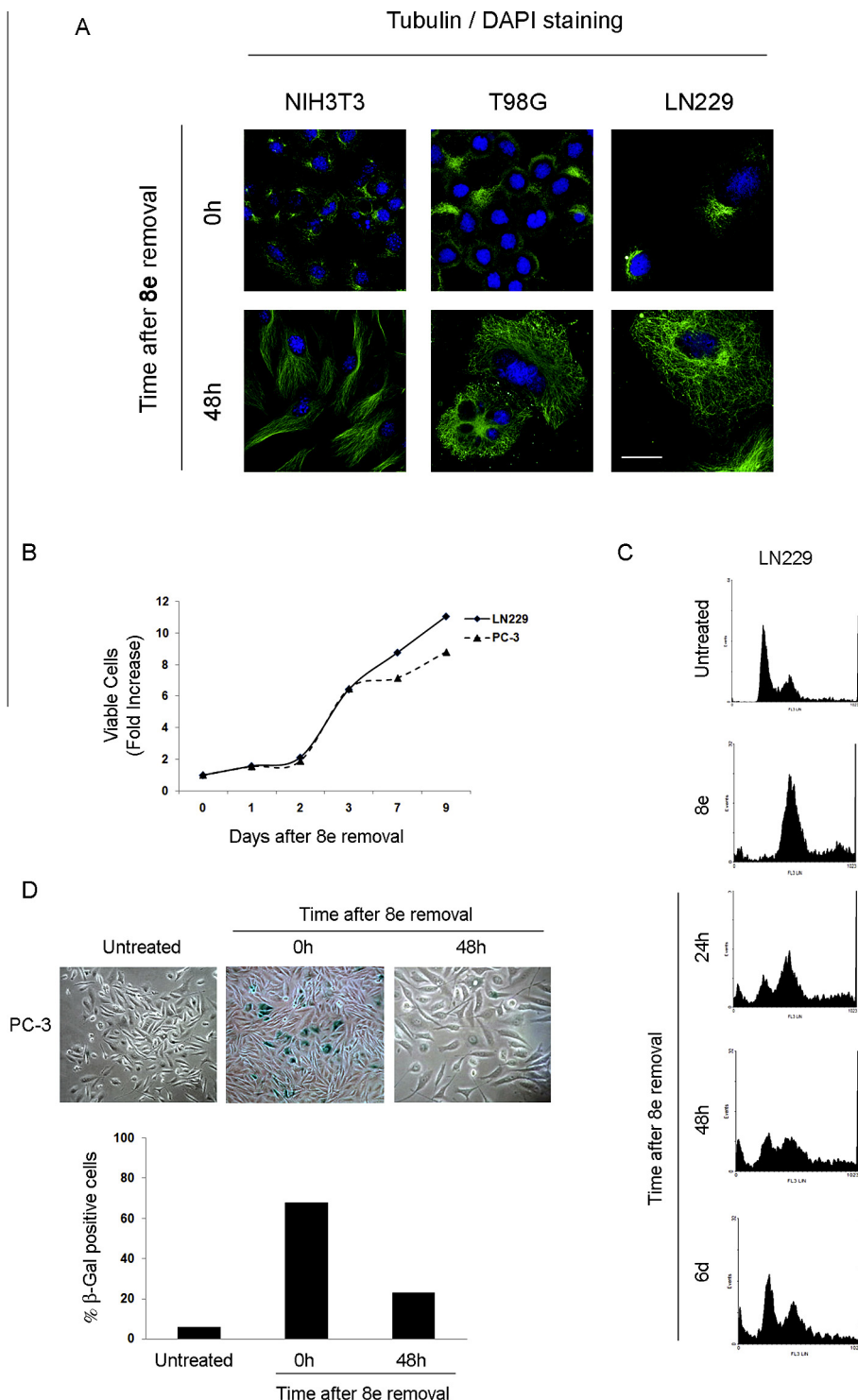


Fig. 7. Sulfonamide **8e** is a reversible antimetabolic. (A) The indicated cell lines were treated for 24 h with 10 μM **8e**, washed to remove **8e**, fixed at the indicated time-points and stained with anti-Tubulin and DAPI as indicated in Methods. Bar, 20 μm . (B) LN229 and PC-3 cells were treated for 24 h with 10 μM **8e**, washed to remove **8e**, and cell viability measured at the indicated time-points after removal. The graph represents the fold increase in viable cells, relative to cells treated for 24 h with **8e**. (C) LN229 cells were left untreated or treated for 24 h with 10 μM **8e**, washed to remove **8e**, harvested at the indicated time-points after removal and stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. The cell cycle distribution is shown for each experimental condition. (D) PC-3 cells were left untreated or were treated for 24 h with 10 μM **8e**, washed to remove **8e** and stained for β -galactosidase at the indicated time-points after removal. The mean \pm SD values from three independent experiments, each conducted in triplicate, are shown in the graph, representing the percentage of β -galactosidase positive cells related to untreated conditions at the indicated time points.

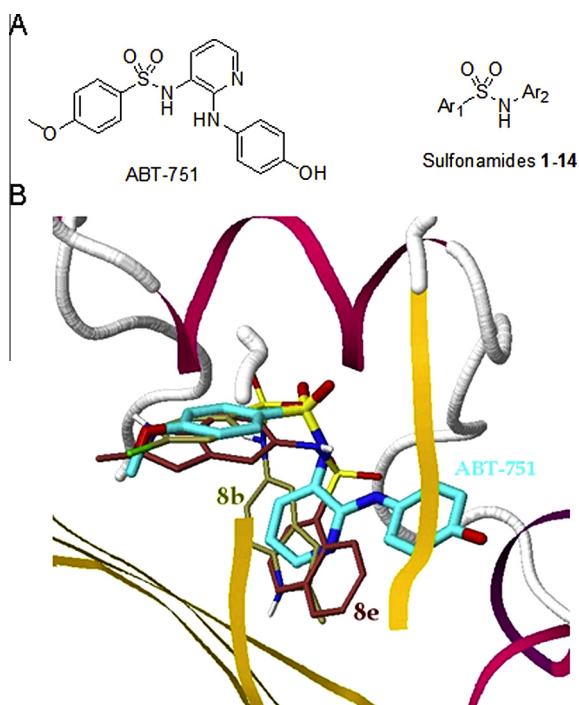


Fig. 8. Docking studies support interaction of sulfonamide **8e** with the colchicine site of tubulin. (A) Structure of ABT-751 and generic structure of the sulfonamides. (B) Superposition of the docked dispositions of **8e** (carbons in maroon) and **8b** (carbons in olive) at the ABT-751 site, showing the reversal of the binding mode. The structure of ABT-751 (carbons in cyan) is shown for comparison.

Remarkably, even the detection of senescence is reduced in a time-dependent manner upon **8e** removal in PC-3 cells (Fig. 7D). Taken together, our observations clearly indicate that the cellular effects elicited by sulfonamide **8e** are fully reversible.

3.2.8. Docking studies and SAR analysis

With the goal of better understanding the structure–activity relationships, we performed docking experiments for the synthesized sulfonamides in different crystal structures of the colchicine site of tubulin in complex with structurally diverse ligands. From among these, the docking results for 3HKC, the complex of tubulin with the benzenesulfonamide ABT-751 [29] were selected due to its higher structural similarity with the new compounds here described (Fig. 8A). Overall the sulfonamides bind to the ABT-751 site with the two aromatic rings occupying the sites for the *p*-methoxyphenyl ring and the 2,3-diaminopyridine moiety of ABT-751, thus placing the sulfonamide bridge close to that of ABT-751, while the more deeply buried pocket for the *p*-aminophenol is only occupied by ligands with large ring systems, such as **9a–d**. The docked ligands show two different dispositions corresponding to the reversal of the sulfonamide moiety depending on the geometry of the attached aromatic rings, mainly to the benzofused ones. When there is only one *alpha* linked benzofused system (e.g. the naphthyl group in **8e**), it preferentially binds at the 2,3-diaminopyridine pocket, thus allocating the other ring in the *p*-methoxyphenyl pocket. When two such *alpha* rings are present, both orientations can occur. When no *alpha* ring is present, the benzofused systems still prefer to bind at the 2,3-diaminopyridine pocket, as we can see for instance for **8b**. Therefore, the presence of the 1-naphthyl group causes a reversal in the binding mode for **8e**, which probably explains its different activity profile (Fig. 8B). The same reversal is observed in **7a,b** but in these cases, it does not result in a potency increase. This is probably due to the lack of a substituent to replace the methoxy group of ABT-751 that is an important pharmacophoric element

in the recognition of colchicine site ligands (hydrophobic site 1 of the pharmacophoric model of Nguyen et al. [30]) The introduction of additional nitrogen atoms is also detrimental for the activity, due to unsatisfied hydrogen bonds acceptor potential in the complexes.

4. Discussion

In this report we have investigated the *in vitro* anticancer activities of our in-house panel of sulfonamides, consisting both of novel structures and previously-reported compounds some of which have shown interesting biological properties as antiparasitic agents [16]. The analysis of the antiproliferative activity of a series of 24 sulfonamide-based compounds in a comprehensive panel of representative human cancer cell lines indicated that only one compound, sulfonamide **8e**, had clear antiproliferative properties. Since this compound was the only one within the series containing a naphthyl group, we reasoned that this structural motif might be responsible for its biological activity, and thus synthesized 12 additional sulfonamide compounds containing naphthyl or related aromatic rings such as quinoyl or dansyl moieties in order to test whether the naphthalene functional group was the major determinant of the activity of compound **8e**. Surprisingly, however, none of the novel sulfonamides including naphthalene-related structures showed antiproliferative activity against three representative cancer cell lines, in contrast with the performance of **8e** in these cells. The observation that only one compound within a series of highly-related structures promotes significant biological effects suggests that **8e** is likely to specifically interfere with a cellular target.

Interestingly **8e** treatment led to a very robust cell cycle arrest and the induction of cellular senescence, which is a form of long-term and often irreversible proliferative arrest characterized by a larger and flattened cell shape and the expression of senescent markers such as β -galactosidase [31]. The observed G2/M arrest indicates that sulfonamide **8e** impairs cell proliferation by preventing entry into mitosis or its completion. These results are compatible with the activation of the checkpoint pathway that imposes a G2 arrest in order to prevent mitosis entry following the detection of cellular DNA damage [32], which is normally observed in response to genotoxic agents. These results are also compatible with the detection of apoptotic cell death upon prolonged exposure to **8e**. In agreement with this, a significant increase in γ -H2AX was detected in a number of cell lines treated with **8e**, thus suggesting the presence of double-strand breaks in cellular DNA. An established assay to monitor the sustained antiproliferative effects of genotoxic agents is the analysis of cellular clonogenic capacity upon a transient exposure to such genotoxic drugs. Interestingly these assays indicated that, whereas a standard genotoxic agent such as etoposide induced a sustained antiproliferative effect, treatment with **8e** was unable to reduce cellular clonogenicity, thus indicating that **8e** does not promote the hallmark response of a DNA damage-inducing agent. In view of these conflicting observations, we directly monitored the activation of the DNA damage checkpoint by analyzing the phosphorylation levels of the checkpoint transducing kinase Chk1, which is rapidly phosphorylated in response to DNA damage and amplifies the checkpoint signal phosphorylating crucial downstream mediators [33]. The observation that the genotoxic agent etoposide, but not **8e**, was able to induce an increase in Chk1 phosphorylation indicates that **8e** does not promote the activation of the DNA damage checkpoint. In agreement with these observations, a number of studies including thermal denaturation, fluorescence titration, ethidium bromide displacement assays and circular dichroism measurements indicated low affinity binding of **8e** with purified DNA. These observations suggest that **8e** does not function as a

genotoxic agent and therefore indicate that its cellular effects are likely to be unrelated to the observed increase in γ -H2AX. The most plausible explanation for the detection of γ -H2AX in the absence of other evidences of DNA damage, such as the observed lack of checkpoint activation, is the so called “pseudo DNA damage response” that has been reported in senescent cells. This response is characterized by the detection of γ -H2AX in senescent cells without the detection of DNA damage by direct measures of DNA fragmentation [34]. Taken together, our results indicate that despite the detection of γ -H2AX, presumably as a consequence of senescence induction, **8e** does not function as a cellular genotoxic agent with the ability to induce the DNA damage checkpoint.

The observation that **8e** leads to a dramatic increase in G2/M content in the absence of a detectable measure of checkpoint activation, which would induce a G2 arrest, strongly points to the disruption of mitotic progression as the key mechanism underlying the activity of **8e**. The cellular effects of this compound are compatible with the hallmark response to other well-established anticancer agents inducing a G2/M-content increase followed by apoptosis: the mitotic poisons, such as tubulin-binding agents. Due to the crucial role of microtubules for the completion of mitosis, tubulin heterodimers, the subunits of microtubules, constitute key cellular targets for the development of new anticancer drugs and thus tubulin inhibitors are currently used for the treatment of cancer. These inhibitors have antitumor activity by destabilizing tubulin polymerization, which alters microtubule dynamics and prevents the correct assembly of the mitotic spindle, leading to mitotic arrest. Several compounds, such as the taxanes, the vinca alkaloids, and estramustine all prevent cell cycle progression by inhibiting mitosis [35], and several tubulin binders are clinically-used chemotherapeutic agents [4]. Interestingly, a number of sulfonamides have been recently reported capable of binding microtubules and exerting antimitotic activity [7]. In agreement with our previous observations, **8e** treatment led to a clear disruption of the microtubule cytoskeleton in a number of cell lines, with tubulin staining accumulating in the perinuclear region. Moreover, the formation of the mitotic spindle followed by the cytokinetic ring detected in synchronized NIH3T3 cells was not observed upon **8e** treatment. Accordingly, *in vitro* tubulin polymerization assays with purified tubulin monomers confirmed that **8e** is able to inhibit the polymerization of tubulin. Noteworthy, in correlation with our observations in response to **8e** exposure, mitotic poisons such as paclitaxel [36], discodermolide [37], vincristine and vinblastine [38] also have been shown to induce cellular senescence and some of these compounds have also been reported to promote an increase in γ -H2AX [39]. Collectively, our data strongly indicate that sulfonamide **8e** targets tubulin polymerization to elicit its cellular effects.

The dynamic regulation of the cellular cytoskeleton, including the microtubule network, is central to many complex cellular processes such as the control of cell shape and motility. Cell motility is frequently altered in cancer cells, which usually display a highly motile phenotype that is required to traverse the basal lamina and the endothelial layer of vessels in the process of localized invasion required for the metastatic dissemination of tumors [40]. Remarkably, and in agreement with its ability to disassemble the tubulin cytoskeleton, compound **8e** is also able to reduce cancer cell motility as indicated by our results in wound healing assays performed with MCF-7 and LN229 cells, thus improving its anticancer potential. Another interesting property displayed by some antimitotic agents is reversibility of action, since compounds that disrupt microtubule dynamics show a wide degree of reversibility in their ability to block mitosis. The classic antimitotic compound colchicine, for instance, induces an almost irreversible mitotic block, whereas structurally-related colcemid exerts reversible effects. This property of mitotic poisons is not

only compound-specific but also difficult to explain in terms of SAR: even small structural changes in compounds within a given class can lead to profound differences in mitotic block reversibility [41]. Reversibility is an important parameter in terms of predicting *in vivo* efficacy and undesirable side effects, as illustrated by the fact that slow dissociation from tubulin is thought to be the main reason behind colchicine's toxicity, which has led to its failure in the clinic [28]. Taking this into account, we investigated the cellular response upon **8e** removal. Interestingly, **8e** washout led to a robust time-dependent reversion of its cellular effects, as shown by the full assembly of the tubulin cytoskeleton, the restoration of cell proliferation accompanied by progressive mitotic exit and concomitant G1 increase and, finally, the reduction of cellular senescence. This latter observation is remarkable since senescence has been, until recently, often described as an irreversible growth arrest. However, similar observations showing reversibility in the detection of senescent markers have also been previously reported, such as in ceramide-induced senescence [42] or in senescence induced by FGFR3 [43].

We finally show that docking studies and SAR analysis further confirm our experimental observations and strongly suggest that sulfonamide **8e** interacts with the colchicine site of tubulin. In summary, our data have enabled to identify a naphthalene sulfonamide, compound **8e**, as a potential anticancer agent with antiproliferative activity within a library of sulfonamide compounds. Exposure to **8e** leads to a dramatic G2/M arrest followed by the induction of apoptosis and the detection of cellular senescence, and also a reduction of cancer cell motility. These cellular effects, which are reversible upon removal of the compound, are likely related to the ability of **8e** to inhibit tubulin polymerization and thus mitotic progression, and therefore allow us to conclude that sulfonamide **8e** is a novel reversible antimitotic compound inhibiting cancer cell motility.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish MINECO and FEDER funds from the E. U. (CTQ2013-48917-C3-1-P, Consolider-Ingenio Project CSD2010-000652010 and Unidad de Excelencia MDM 2015-0038) and Generalitat Valenciana (PROMETEO II 2015/002). C.G.-R. thanks the Ministry of Education of Spain for a FPU Grant. We are grateful to Joan Seoane (Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Barcelona), Hans Skovgaard (Rigshospitalet, Oslo), Dolors Colomer (Hospital Clínic, Barcelona) and Beatriz Martínez (CNIO, Madrid) for cell lines, Manel Joaquin (Universitat Pompeu Fabra, Barcelona) for advice on γ -H2AX staining and Antoni Costa (Universitat de les Illes Balears, Palma) for advice on non-linear regression analysis and IC₅₀ determinations. Rafael Peláez thanks Consejería de Educación, Junta de Castilla y León (SA147U13).

References

- [1] American Cancer Society, Cancer Facts Fig. 2013 Rep., 2013. <<http://www.cancer.org/research/cancerfactsfigures/cancerfactsfigures/cancer-facts-figures-2013>> (accessed March 5, 2016).
- [2] (a) American Cancer Society, Treat. Types, 2016. <<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes>> (accessed March 5, 2016); (b) World Health Organization, Cancer, 2015. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> (accessed March 5, 2016); (c) C. Ceresa, A. Bravin, G. Cavaletti, M. Pellei, C. Santini, The combined therapeutical effect of metal-based drugs and radiation therapy: the present status of research, *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 2237–2265, <http://dx.doi.org/10.2174/0929867321666140216125721>;

- (d) A. Rescifina, C. Zagni, M.G. Varrica, V. Pistorà, A. Corsaro, Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: synthesis, activity, and modeling, *Eur. J. Med. Chem.* 74 (2014) 95–115, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.029>;
- (e) A. Deepthi, S. Raju, A. Kalyani, M. UdayaKiran, A. Vanaja, Targeted drug delivery to the nucleus and its potential role in cancer chemotherapy, *J. Pharm. Sci. Res.* 5 (2013) 48–56;
- (f) A. Mohan, S. Narayanan, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, Combinations of plant polyphenols & anti-cancer molecules: a novel treatment strategy for cancer chemotherapy, *Anticancer Agents Med. Chem.* 13 (2013) 281–295, <http://dx.doi.org/10.2174/1871520611313020015>;
- (g) Z. Binkhathlan, A. Lavasanifar, P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives, *Curr. Cancer Drug Targets* 13 (2013) (2012) 326–346, <http://dx.doi.org/10.2174/15680096113139990076>;
- (h) I. Abraham, K. El Sayed, Z.S. Chen, H. Guo, Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance, *Mar. Drugs* 10 (2012) 2312–2321, <http://dx.doi.org/10.3390/md10102312>;
- (i) M. Kollareddy, D. Zheleva, P. Dzubak, P.S. Brahmshatriya, M. Lepsik, M. Hajdich, Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic, *Invest. New Drugs* 30 (2012) 2411–2432, <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-012-9798-6>;
- (j) S.K. Singh, S.K. Tripathi, N. Dessalew, P. Singh, Cyclin dependent kinase as significant target for cancer treatment, *Curr. Cancer Ther. Rev.* 8 (2008) 225–235;
- (k) N. Gonen, Y.G. Assaraf, Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance, *Drug Resist. Updat.* 15 (2012) 183–210, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2012.07.002>;
- (l) A. Urruticoechea, R. Alemany, J. Balart, A. Villanueva, F. Viñals, G. Capellà, Recent advances in cancer therapy: an overview, *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010) 3–10, <http://dx.doi.org/10.2174/138161210789941847>;
- (m) M. Nishiyama, H. Eguchi, Recent advances in cancer chemotherapy: current strategies, pharmacokinetics, and pharmacogenomics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 367–368, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.11.001>.
- [3] a) I. Marzo, J. Naval, Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls, *Biochem. Pharmacol.* 86 (2013) 703–710, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.010>;
- b) K.W. Wood, W.D. Cornwell, J.R. Jackson, Past and future of the mitotic spindle as an oncology target, *Curr. Opin. Pharmacol.* 1 (2001) 370–377, [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4892\(01\)00064-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00064-9).
- [4] a) E. Mukhtar, V.M. Adhami, H. Mukhtar, Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy, *Mol. Cancer Ther.* 13 (2014) (2010) 275–284, <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0791>;
- b) D. Katsetos, Tubulins as therapeutic targets in cancer: from bench to bedside, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 2778–2792, <http://dx.doi.org/10.2174/138161212800626193>;
- c) Y. Lu, J. Chen, M. Xiao, W. Li, D.D. Miller, An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site, *Pharm. Res.* 29 (2013) 2943–2971, <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-012-0828-z>;
- d) C. Dumontet, M.A. Jordan, Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 790–803, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3253>.
- [5] (a) P.K. Ranjith, R. Pakkath, K.R. Haridas, S.N. Kumari, Synthesis and characterization of new N-(4-(4-chloro-1H-imidazol-1-yl)-3-methoxyphenyl) amide/sulfonamide derivatives as possible antimicrobial and antibutubercular agents, *Eur. J. Med. Chem.* 71 (2014) (2014) 354–365, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.002>;
- b) T.A. Kirschberg, N.H. Squires, H. Yang, A.C. Corsa, Y. Tian, N. Tirunagari, et al., Novel, sulfonamide linked inhibitors of the hepatitis C virus NS3 protease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 969–972, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.060>;
- (c) M.W. Carson, J.G. Luz, C. Suen, C. Montrose, R. Zink, X. Ruan, et al., Glucocorticoid receptor modulators informed by crystallography lead to a new rationale for receptor selectivity, function, and implications for structure-based design, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 849–860, <http://dx.doi.org/10.1021/jm401616g>;
- (d) S.S.A. Shah, G. Rivera, M. Ashfaq, Recent advances in medicinal chemistry of sulfonamides. Rational design as anti-tumoral, anti-bacterial and anti-inflammatory agents, *Mini Rev. Med. Chem.* 13 (2013) 70–86, <http://dx.doi.org/10.2174/138955713804484749>;
- (e) A. Scozzafava, F. Carta, C.T. Supuran, Secondary and tertiary sulfonamides: a patent review (2008–2012), *Expert Opin. Ther. Patents* 23 (2013) 203–213, <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.2013.742065>;
- (f) G. Chen, H. Ren, A. Turpoff, A. Arefolov, R. Wilde, J. Takasugi, et al., Discovery of N-(4-(indol-2-yl)phenyl)sulfonamides as novel inhibitors of HCV replication, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 3942–3946, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.04.050>;
- (g) T. Hanke, F. Rörsch, T.M. Thieme, N. Ferreiros, G. Schneider, G. Geisslinger, et al., Synthesis and pharmacological characterization of benzenesulfonamides as dual species inhibitors of human and murine mPGEs-1, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 7874–7883, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.006>;
- (h) S. Ovais, S. Yaseen, R. Bashir, P. Rathore, M. Samim, S. Singh, et al., Synthesis and anti-inflammatory activity of celecoxib like compounds, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 28 (2012) 1105–1112, <http://dx.doi.org/10.3109/14756366.2012.710847>;
- (h) I.R. Greig, E. Coste, S.H. Ralston, R.J. Van'T Hof, Development of triaryl sulfonamides as novel anti-inflammatory agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 816–820, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.11.067>;
- (j) A. Salahuddin, A. Inam, R.L. van Zyl, D.C. Heslop, C.-T. Chen, F. Avecilla, et al., Synthesis and evaluation of 7-chloro-4-(piperazin-1-yl)quinoline-sulfonamide as hybrid antiprotozoal agents, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 3080–3089, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.052>;
- (k) K.T. Andrews, G.M. Fisher, S.D.M. Sumanadasa, T. Skinner-Adams, J. Moeker, M. Lopez, et al., Antimalarial activity of compounds comprising a primary benzene sulfonamide fragment, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 6114–6117, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.09.015>;
- (l) X. Chen, S. Hussain, S. Parveen, S. Zhang, Y. Yang, C. Zhu, Sulfonyl group-containing compounds in the design of potential drugs for the treatment of diabetes and its complications, *Curr. Med. Chem.* 3578–3604 (2012);
- (m) D. Patel, M. Jain, S.R. Shah, R. Bahekar, P. Jadav, A. Joharapurkar, et al., Discovery of potent, selective and orally bioavailable triaryl-sulfonamide based PTP1B inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 1111–1117, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.122>.
- [6] L. Hu, Z. Li, J. Jiang, D.W. Boykin, Novel diaryl or heterocyclic sulfonamides as antimitotic agents, *Anticancer Agents Med. Chem.* 8 (2008) 739–745.
- [7] (a) S. Mehndiratta, Y.F. Chiang, M.J. Lai, H.Y. Lee, M.C. Chen, C.C. Kuo, et al., Concise syntheses of 7-anilino-indoline-N-benzenesulfonamides as antimitotic and vascular disrupting agents, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 4917–4923, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.042>;
- (b) A.P. Toner, F. McLaughlin, F.J. Giles, F.J. Sullivan, E. O'Connell, L.A. Carleton, et al., The novel toluidine sulphonamide EL102 shows pre-clinical in vitro and in vivo activity against prostate cancer and circumvents MDR1 resistance, *Br. J. Cancer.* 109 (2013) 2131–2141, <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.537>;
- (c) M.V.R. Reddy, M.R. Mallireddigari, V.R. Pallela, S.C. Cosenza, V.K. Billa, B. Akula, et al., Design, synthesis, and biological evaluation of (E)-N-aryl-2-arylethanesulfonamide analogues as potent and orally bioavailable microtubule-targeted anticancer agents, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 5562–5586, <http://dx.doi.org/10.1021/jm400575x>;
- (d) N. Abbassi, H. Chicha, E.M. Rakib, A. Hannioui, M. Alaoui, A. Hajjaji, et al., Synthesis, antiproliferative and apoptotic activities of N-(6(4)-indazolyl)-benzenesulfonamide derivatives as potential anticancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* 57 (2012) 240–249, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.09.013>;
- (e) Y. Luo, K.M. Qiu, X. Lu, K. Liu, J. Fu, H.L. Zhu, Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of cinnamic acyl sulfonamide derivatives as novel antitubulin agents, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 4730–4738, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.088>;
- (f) J. Chen, T. Liu, R. Wu, J. Lou, J. Cao, X. Dong, et al., Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-γ-carbolinearyl sulfonamides as anticancer agents, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 8478–8484, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.10.047>;
- (g) Y.M. Wang, L.X. Hu, Z.M. Liu, X.F. You, S.H. Zhang, J.R. Qu, et al., N-(2,6-dimethoxyppyridine-3-yl)-9-methylcarbazole-3-sulfonamide as a novel tubulin ligand against human cancer, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 6218–6227, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0550>.
- [8] (a) S.M. Monti, C.T. Supuran, G. De Simone, Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008–2013), *Expert Opin. Ther. Pat.* 23 (2013) 737–749, <http://dx.doi.org/10.1517/13543776.2013.798648>;
- (b) S.K. Suthar, S. Bansal, S. Lohan, V. Modak, A. Chaudhary, A. Tiwari, Design and synthesis of novel 4-(4-oxo-2-arylthiazolidin-3-yl) benzenesulfonamides as selective inhibitors of carbonic anhydrase IX over I and II with potential anticancer activity, *Eur. J. Med. Chem.* 66 (2013) 372–379, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.003>;
- (c) J. Slawinski, K. Szafranski, D. Vullo, C.T. Supuran, Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of a novel series of 5-substituted 2,4-dichlorobenzenesulfonamides and their inhibition of human cytosolic isozymes I and II and the transmembrane tumor-associated isozymes IX and XII, *Eur. J. Med. Chem.* 82 (2014) (2012) 47–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.039>;
- (d) A. Husain, D. Madhesia, Heterocyclic compounds as carbonic anhydrase inhibitor, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 27 (2012) 773–783, <http://dx.doi.org/10.3109/14756366.2011.617882>;
- (e) M.S. Al-Said, M.M. Ghorab, M.S. Al-Dosari, M.M. Hamed, Synthesis and in vitro anticancer evaluation of some novel hexahydroquinoline derivatives having a benzenesulfonamide moiety, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 201–207, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.11.002>.
- [9] V. Turcotte, S. Fortin, F. Vevey, Y. Coulombe, J. Lacroix, M.-F. Côté, et al., Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of novel substituted N-phenylureidobenzenesulfonate derivatives blocking cell cycle progression in S-phase and inducing DNA double-strand breaks, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 6194–6208, <http://dx.doi.org/10.1021/jm3006492>.
- [10] (a) A. Kamal, D. Dastagiri, M. JanakiRamaiah, J. Surendranadha Reddy, E. VijayaBharathi, M. Kashi Reddy, et al., Synthesis and apoptosis inducing ability of new anilino substituted pyrimidine sulfonamides as potential anticancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 5817–5824, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.09.039>;
- (b) F. Habens, N. Srinivasan, F. Oakley, D.A. Mann, A. Ganesan, G. Packham, Novel sulfasalazine analogues with enhanced NF-κB inhibitory and apoptosis promoting activity, *Apoptosis* 10 (2005) 481–491, <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-005-1877-0>.
- [11] (a) J. Kim, P. Chun, H.R. Moon, Synthesis of novel N-(2-hydroxyphenyl) arylsulfonamides as selective HDAC inhibitory and cytotoxic agents, *Bull. Korean Chem. Soc.* 34 (2013) 1487–1493, <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2013.34.5.1487>;

- (b) E. Noaman, N. Fahmy, R. Yousri, O. El Shawi, M. Ghazy, Evaluation of the antitumor and radiosensitizing activity of a novel quinoline sulfonamide derivative (PIQSA) as a histone deacetylase inhibitor, *J. Cancer Ther.* 2 (2011) 567–578, <http://dx.doi.org/10.4236/jct.2011.24077>.
- [12] P. Jain, C. Saravanan, S.K. Singh, Sulphonamides: deserving class as MMP inhibitors? *Eur. J. Med. Chem.* 60 (2013) 89–100, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.016>.
- [13] (a) R. Schmieder, F. Puehler, R. Neuhaus, M. Kissel, A.A. Adjei, J.N. Miner, et al., Allosteric MEK1/2 inhibitor refametinib (BAY 86–9766) in combination with sorafenib exhibits antitumor activity in preclinical murine and rat models of hepatocellular carcinoma, *Neoplasia* 15 (2013) 1161–1171, <http://dx.doi.org/10.1593/neo.13812>;
- (b) Y. Luo, Y. Li, K.M. Qiu, X. Lu, J. Fu, H.L. Zhu, Metronidazole acid acyl sulfonamide: a novel class of anticancer agents and potential EGFR tyrosine kinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 6069–6076, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.08.038>;
- (c) N.S. Reddy, M.R. Mallireddigari, S. Cosenza, K. Gumireddy, S.C. Bell, E.P. Reddy, et al., Synthesis of new coumarin 3-(*N*-aryl) sulfonamides and their anticancer activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4093–4097, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.05.016>.
- [14] T. Haritunians, S. Gueller, J. O'Kelly, R. Llaría Jr., H. Phillip, Novel acyl sulfonamide LY573636-sodium: effect on hematopoietic malignant cells, *Oncol. Rep.* 20 (2008) 1237–1242.
- [15] (a) J. Müller, A. Hemphill, New approaches for the identification of drug targets in protozoan parasites, in: *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, Elsevier, 2013, pp. 359–401, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407704-1.00007-5>;
- (b) R. Lama, R. Sandhu, B. Zhong, B. Li, B. Su, Identification of selective tubulin inhibitors as potential anti-trypanosomal agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 5508–5516, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.07.023>;
- (c) T.G. George, M.M. Endeshaw, R.E. Morgan, K.V. Mahasanen, D.A. Delfin, M.S. Mukherjee, et al., Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 3,5-substituted-*N*¹-phenyl-*N*⁴, *N*⁴-di-*n*-butylsulfanilamides as antikinoplastid antimicrotubule agents, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 6071–6079, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.042>.
- [16] C. Galiana-Roselló, P. Bilbao-Ramos, M.A. Dea-Ayuela, M. Rolón, C. Vega, F. Bolás-Fernández, et al., In vitro and in vivo anti-leishmanial and trypanocidal studies of new *N*-benzene- and *N*-naphthalenesulfonamide derivatives, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 8984–8998, <http://dx.doi.org/10.1021/jm4006127>.
- [17] M.A. Dea-Ayuela, E. Castillo, M. Gonzalez-Alvarez, C. Vega, M. Rolón, F. Bolás-Fernández, et al., In vivo and in vitro anti-leishmanial activities of 4-nitro-*N*-pyrimidinand *N*-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and *N*²-(4-nitrophenyl)-*N*¹-propylglycinamide, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 7449–7456, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.09.030>.
- [18] J.F. Tilney-Basset, Introduction of a sulphonamido-group by means of benzene-sulphonyl azide: an unusual substitution pattern for anthracene, *J. Chem. Soc.* 2517–2518 (1962).
- [19] World Wide Protein Data Bank, 2016. <<http://www ww p d b . o r g />> (accessed February 18, 2016).
- [20] M.F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graph. Model.* 17 (1999) 57–61.
- [21] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, et al., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639–1662, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B).
- [22] R. García, C.A. Therón, R. López, J.L. Peláez, JADOPPT: Java based AutoDock Preparing and Processing Tool (unpublished work).
- [23] S. Shoaib, A. Shah, T. Najjam, Synthetic routes of sulfonamide derivatives: a brief review, *Mini. Rev. Org. Chem.* 10 (2013) 160–170, <http://dx.doi.org/10.2174/1570193X11310020005>.
- [24] O. Bähr, J. Rieger, F. Duffner, R. Meyermann, M. Weller, W. Wick, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein mediate specific patterns of multidrug resistance in malignant glioma cell lines, but not in primary glioma cells, *Brain Pathol.* 13 (2003) 482–494.
- [25] K. Itahana, J. Campisi, G.P. Dimri, Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay, *Methods Mol. Biol.* 371 (2007) 21–31.
- [26] J. Lukas, C. Lukas, J. Bartek, More than just a focus: the chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 1161–1169, <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2344>.
- [27] Y. Nakayama, N. Uno, K. Uno, Y. Mizoguchi, S. Komoto, Y. Kazuki, E. Nanba, T. Inoue, M. Oshimura, Recurrent micronucleation through cell cycle progression in the presence of microtubule inhibitors, *Cell Struct. Funct.* 40 (2015) 51–59.
- [28] (a) N.E. Thomas, R. Thamkachy, K.C. Sivakumar, K.J. Sreedevi, X.L. Louis, S.A. Thomas, et al., Reversible action of diaminothiazoles in cancer cells is implicated by the induction of a fast conformational change of tubulin and suppression of microtubule dynamics, *Mol. Cancer Ther.* 13 (2014) 179–189, <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0479>;
- (b) L. Sun, E. Hamel, C.M. Lin, S.B. Hastie, A. Pyluck, Kuo-Hsiung Lee, Antitumor agents. 141. Synthesis and biological evaluation of novel thiocolchicine analogs: *N*-acyl-, *N*-aroyl-, and *N*-(substituted benzy)deacetylthiocolchicines as potent cytotoxic and antimetabolic compounds, *J. Med. Chem.* 6 (1993) 1474–1479.
- [29] A. Dorléans, B. Gigant, R.B.G. Ravelli, P. Mailliet, V. Mikol, M. Knossow, Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 13775–13779, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0904223106>.
- [30] T.L. Nguyen, C. McGrath, A.R. Hermone, J.C. Burnett, D.W. Zaharevitz, B.W. Day, et al., A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 6107–6116, <http://dx.doi.org/10.1021/jm050502t>.
- [31] D. Muñoz-Espín, M. Serrano, Cellular senescence: from physiology to pathology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 482–496, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3823>.
- [32] J. Bartek, J. Lukas, DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 (2007) 238–245, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.009>.
- [33] J. Lukas, C. Lukas, J. Bartek, Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time, *DNA Repair* 3 (2004) 997–1007, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.006>.
- [34] T.V. Pospelova, Z.N. Demidenko, E.I. Bukreeva, V.A. Pospelov, A.V. Gudkov, M.V. Blagosklonny, Pseudo-DNA damage response in senescent cells, *Cell Cycle* 8 (2009) 4112–4118, <http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.24.10215>.
- [35] M. Schmidt, H. Bastians, Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs, *Drug Resist. Updat.* 10 (2007) 162–181, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2007.06.003>.
- [36] (a) M. Prencipe, P. Fitzpatrick, S. Gorman, M. Tosetto, M. Masetto, R. Klinger, et al., Cellular senescence induced by aberrant MAD2 levels impacts on paclitaxel responsiveness in vitro, *Br. J. Cancer.* 101 (2009) 1900–1908, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605419>;
- (b) J.Y.-F. Chen, C.-C. Hwang, W.-Y. Chen, J.-C. Lee, T.-F. Fu, K. Fang, et al., Additive effects of C(2)-ceramide on paclitaxel-induced premature senescence of human lung cancer cells, *Life Sci.* 87 (2010) 350–357, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.06.017>.
- [37] L.E. Klein, B.S. Freeze, A.B. Smith, S.B. Horwitz, The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence, *Cell Cycle* 4 (2005) 501–507, <http://dx.doi.org/10.4161/cc.4.3.1550>.
- [38] (a) L. Groth-Pedersen, M.S. Ostenfeld, M. Høyer-Hansen, J. Nylandsted, M. Jäättelä, Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siraimesin, *Cancer Res.* 67 (2007) 2217–2225, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3520>;
- (b) L. Duana, K. Sterba, S. Kolomeichuk, H. Kim, P.H. Brown, T.C. Chambers, Inducible overexpression of c-Jun in MCF7 cells causes resistance to vinblastine via inhibition of drug-induced apoptosis and senescence at a step subsequent to mitotic arrest, *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 481–489.
- [39] (a) W.B. Dalton, M.O. Nandan, R.T. Moore, V.W. Yang, Human cancer cells commonly acquire DNA damage during mitotic arrest, *Cancer Res.* 67 (2007) 11487–11492, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5162>;
- (b) J.D. Orth, A. Loewer, G. Lahav, T.J. Mitchison, Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction, *Mol. Biol. Cell.* 23 (2012) 567–576, <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0781>.
- [40] (a) S. Etienne-Manneville, Microtubules in cell migration, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29 (2013) 471–499, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155711>;
- (b) A. Wells, J. Grahovac, S. Wheeler, B. Ma, D. Luffenburger, Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis, *Trends Pharmacol. Sci.* 34 (2013) 283–289, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.03.001>.
- [41] M.J. Towle, K.A. Salvato, B.F. Wels, K.K. Aalfs, W. Zheng, B.M. Seletsky, et al., Eribulin induces irreversible mitotic blockade: Implications of cell-based pharmacodynamics for in vivo efficacy under intermittent dosing conditions, *Cancer Res.* 71 (2011) 496–505, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1874>.
- [42] R.E. Mouton, M.E. Venable, Ceramide induces expression of the senescence histochemical marker, β-galactosidase, in human fibroblasts, *Mech. Ageing Dev.* 113 (2000) 169–181, [http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374\(99\)00105-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374(99)00105-0).
- [43] P. Krejci, J. Prochazkova, J. Smutny, K. Chlebova, P. Lin, A. Aklia, et al., FGFR3 signaling induces a reversible senescence phenotype in chondrocytes similar to oncogene-induced premature senescence, *Bone* 47 (2010) 102–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2010.03.021>.