



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Departamento de Ciencias Biológicas.

Trabajo de Tesis Doctoral

**Noveles heterociclos con actividad
anticonvulsivante derivados del *Myo*-inositol
y Ácido Valproico**

Licenciada Gisela A. Samaja

Director: Prof. Dr. Luis E. Bruno-Blanch.

Año 2011

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en la Cátedra de Química Medicinal, Área Diseño de Fármacos, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, U.N.L.P., bajo la dirección del **Prof. Dr. Luis E. Bruno-Blanch.**

El mundo está en manos
de aquellos que tienen
el coraje de soñar
y de correr riesgos
de vivir sus sueños.

A mi Padre que me guía desde el cielo
y a mi Madre que me guía aquí en la tierra.

Agradezco a la Universidad Nacional de La Plata y CONICET por la beca doctoral otorgada, por brindarme un lugar en la vida académica y de investigación. Agradezco especialmente al Prof. Dr. Luis Bruno Blanch, a mis compañeros de laboratorio y a todas las personas que me han ayudado para que este trabajo se llevara a cabo. A mi familia por estar siempre a mi lado.

INDICE

ABREVIATURAS	7
CAPITULO 1. EPILEPSIA	
Introducción.	12
Clasificación de las convulsiones epilépticas.	14
Etiología.	16
Diagnóstico de la Epilepsia y las Convulsiones.	17
Frecuencia de las convulsiones.	18
Tratamiento de la Epilepsia.	19
Mecanismo de las convulsiones.	23
Referencias del Capítulo 1.	28
CAPITULO 2. DISEÑO DE FARMACOS y FARMACOS ANTIEPILEPTICOS	
Diseño de Fármacos.	31
Diseño Racional de Fármacos.	32
Fármacos antiepilépticos.	42
Fármacos antiepilépticos de Primera generación.	45
Segunda generación de Fármacos antiepilépticos.	51
Nuevos fármacos antiepilépticos y fármacos antiepilépticos que son segunda generación de fármacos antiepilépticos ya existentes.	57
Nuevas formulaciones de Viejos Fármacos establecidos.	59
Fármacos en desarrollo.	61
Referencias del Capítulo 2.	65
CAPITULO 3. PROFÁRMACOS	
Introducción.	69
¿Qué es un Profármaco?.	70
Estrategias en el diseño de profármacos. Ejemplos.	74
Barrera Hematoencefálica.	86
Penetración de los fármacos a través de la BHE.	88
Profármacos de fármacos anticonvulsivos.	94
Nueva tecnología en el diseño de Profármacos.	100
Referencias del Capítulo 3.	102

CAPITULO 4. ACIDO VALPROICO Y MYO-INOSITOL

Introducción.	106
Elección del fármaco: Ácido Valproico (VPA).	106
Mecanismo de acción.	112
Usos clínicos.	114
Elección del modulador: <i>Myo</i> -inositol.	117
Función fisiológica del <i>myo</i> -inositol.	121
Derivados del <i>myo</i> -inositol con actividad biológica.	124
Referencias del Capítulo 4.	127

CAPITULO 5. SINTESIS QUIMICA

Introducción.	130
Protección regioselectiva de los grupos hidroxilos del <i>myo</i> -inositol.	131
Esterificaciones de los derivados del <i>myo</i> -inositol protegidos.	136
Reacciones de hidrólisis de los grupos protectores.	138
Reacciones de Síntesis de los heterociclos sulfatos cíclicos.	141
TRABAJO EXPERIMENTAL DE SÍNTESIS.	148
Referencias del Capítulo 5.	170

CAPITULO 6. EVALUACION ANTICONVULSIVA.

Programa de Desarrollo de Fármacos Anticonvulsivos.	171
Desarrollo de modelos anticonvulsivos en animales.	172
Programa de Desarrollo de Fármacos Antiepilépticos.	176
Trabajo experimental de Evaluación Biológica.	179
Modelos animales utilizados.	182
Fase 1.	185
Fase 2.	188
Resultados.	191
Referencias del Capítulo 6.	196

CONCLUSIONES.	197
---------------	-----

Abreviaturas

4-DAMP	-----	4-dimetilaminopiridina
4-PiPy	-----	4-pirrolidinpiridina
AMPA	-----	Ácido 2-(aminometil)fenilacético
ASP	-----	Anticonvulsant Screening Program
ATPasa	-----	Adenosin Trifosfatasa
AZT	-----	Azidovudina
BHE	-----	Barrera Hematoencefálica
CBZ	-----	Carbamazepina
CCD	-----	Cromatografía Capa Delgada
CDP	-----	Cytidine diphosphate
CoMFA	-----	Comparative Molecular Fields Analysis
Da	-----	Dalton
DAG	-----	Diacilglicerol
DE ₅₀	-----	Dosis Efectiva 50
DL ₅₀	-----	Dosis Letal 50
DMSO	-----	Dimetilsulfóxido
ECA	-----	Enzima convertidora de Angiotensina
EEG	-----	Electroencefalograma
ESM	-----	Etosuccimida
FAEs	-----	Fármacos Antiepilépticos
FBM	-----	Felbamato
FDA	-----	Food and Drug Administration
GABA	-----	Ácido γ -amino butírico
GABA-T	-----	Enzima GABA transaminasa
GBP	-----	Gabapentina
GLUT 1	-----	Transportador de glucosa (Glucose Transporter 1)
GSK-3	-----	quinasa 3-glicógeno sintetasa
HAT	-----	Histona acetil transferasa

HDAC	-----	Histona deacetilasa
ILAE	-----	Liga Internacional contra la Epilepsia
i.p.	-----	intraperitoneal
IP	-----	Índice protector
LAT 1	-----	Large Neutral amino acid transporter
LEV	-----	Levetiracetam
LTG	-----	Lamotrigina
L-Val	-----	L-Valina
MES test	-----	Maximal Electroshock Seizure test
NAD(P)H	-----	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NEQ	-----	Nuevas Entidades Químicas
NMDA	-----	N-metil-D-aspartato
OMS	-----	Organización Mundial de la Salud
OXC	-----	Oxcarbazepina
PB	-----	Fenobarbital
PDB	-----	Protein Data Bank
PEG	-----	Polietilenglicol
PEPT-1	-----	Péptido Transportador 1
PHT	-----	Fenitoína
Pi	-----	Fosforo inorgánico
PLA2	-----	Enzima Fosfolipasa 2
PLC	-----	Fosfolipasa C
p.o.	-----	Per oral (vía oral)
PRM	-----	Primidona
PtdIns	-----	Fosfatidilinositol
PTZ test	-----	Pentilene tetrazol test
PTZ	-----	Pentilene tetrazol
QSAR	-----	Quantitative Structure Activity Relationships
RMN	-----	Resonancia Magnética Nuclear

s.c.	-----	Subcutánea
SMIT	-----	Cotransportador de alta afinidad Na ⁺ / <i>myo</i> -inositol
SMIT1	-----	Cotransportador <i>myo</i> -inositol sodio dependiente 1
SNC	-----	Sistema Nervioso Central
SQLE	-----	Sistema Químico de Liberación Específico
SV2A	-----	Synaptic vesicle protein
TGB	-----	Tiagabina
TPE	-----	Tiempo de efecto máximo
TPM	-----	Topiramato
VGB	-----	Vigabatrin
VNS	-----	<i>Vagus nerve stimulation</i>
VPA	-----	Ácido Valproico
ZNS	-----	Zonizamida

Objetivo de esta Investigación

El objetivo principal de esta investigación es el descubrimiento de nuevos fármacos antiepilépticos. La epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos más comunes, la prevalencia mundial de esta enfermedad se estima en el 1% (más de 60 millones de personas), de las cuales más del 80 % de esta incidencia se da en los países subdesarrollados. Se estima que el 25-30 % de los pacientes con epilepsia son farmacorresistentes, esto quiere decir que la terapia de fármacos no es efectiva en ellos. Claramente surge la necesidad de desarrollar fármacos más eficaces que no infrinjan la calidad de vida de los pacientes.

El objetivo particular de la presente tesis, es la síntesis y evaluación farmacológica de profármacos del Ácido Valproico. Para el desarrollo del presente trabajo, nuestra propuesta fue el diseño de noveles heterociclos derivados del *myo*-inositol, propuesto como transportador del agente anticonvulsivo ácido valproico. En esta oportunidad se propuso introducir originalmente, el grupo funcional sulfato cíclico orientado a favorecer un aumento en la actividad del fármaco.

Podemos enunciar los objetivos particulares de la siguiente manera:

- Diseño de Profármacos del Ácido Valproico que posean como modulador una molécula libre de efectos adversos, que sea capaz de localizarse selectivamente en el sistema nervioso central, y tenga una química acorde para realizar con éxito la síntesis.
- Síntesis de los profármacos planteados
- Evaluación biológica de los compuestos sintetizados en modelos de epilepsia aguda en animales.
- Aporte original a partir de los resultados obtenidos.

Capítulo 1

Epilepsia

Introducción

La palabra *Epilepsia* proviene del griego y significa "**ser atacado por fuerzas externas**"; en otras palabras, esta era una enfermedad en la cual el enfermo era atacado presumiblemente por una fuerza sobrenatural. El cuadro clínico de un individuo aparentemente normal, que era lanzado repentinamente contra el suelo y sacudido violentamente sugería que él o ella estaba siendo "atacado".

La Epilepsia es una de las enfermedades más antiguas conocidas por el género humano y continúa siendo el desorden neurológico crónico más común que afecta a individuos de todas las edades, es la segunda enfermedad neurológica más frecuente después del accidente cerebrovascular.

Una primera referencia de convulsiones se encuentran en la vigésimo quinta y vigésimo sexta tabla cuneiforme Sakikku (Figura 1.1), exhibida en el Museo



Británico, las cuales datan del año 718-612 antes de Cristo y fueron traducidas por J.V. Kinnier-Wilson:

"If the possessing demon possesses him many times during the middle watch of the night, and at the time of his possession his hands and feet are cold, he is much darkened, keeps opening and shutting his mouth, is brown and yellow as to the eyes.... It may go on for some time, but he will die."
(XXV-XXVIth table of the Sakikku cuneiform, 718-612 BC)

Figura 1.1. Tablas de la Epilepsia. Museo Británico.

Hipócrates reconoció a la epilepsia como un proceso orgánico del cerebro. Sin embargo, varios escritores antiguos consideran los ataques como realizados por fuerzas sobrenaturales.

En el libro Hipocrático escrito acerca de este desorden, "Enfermedad Sagrada", no fue utilizado el término epilepsia. Sin embargo, fue empleado por Hipócrates, en otro de sus libros: "Corpus". -Estoy a punto de discutir la enfermedad llamada

Capítulo 1

"sagrada", escribió el autor. -"En mi opinión esta enfermedad no es más divina o sagrada que otras, pero tiene una causa natural, y su supuesto origen divino se debe a la inexperiencia de los hombres y a su carácter peculiar".

El aspecto aterrador de los ataques convulsivos, fue, desde tiempos ancestrales, lo que atrajo la atención de los observadores, quienes han registrado sus impresiones en tablas de barro, o en manuscritos antiguos. A través de las eras, han dejado muchas referencias de la aparición, causas y tratamiento de las convulsiones.

En la Edad Media, varios escritores, como Georgius Zecchius en Basel (1586) y Vicentius Alsarius de Genoa (1617), escribieron extensos tratados sobre Epilepsia y convulsiones. Muchos autores, incluido John de Gaddesde (1280-1361), Bernard Gordon (1305), Thomas Willis (1744), atribuyeron la epilepsia a fuerzas sobrenaturales (figura 1.2).

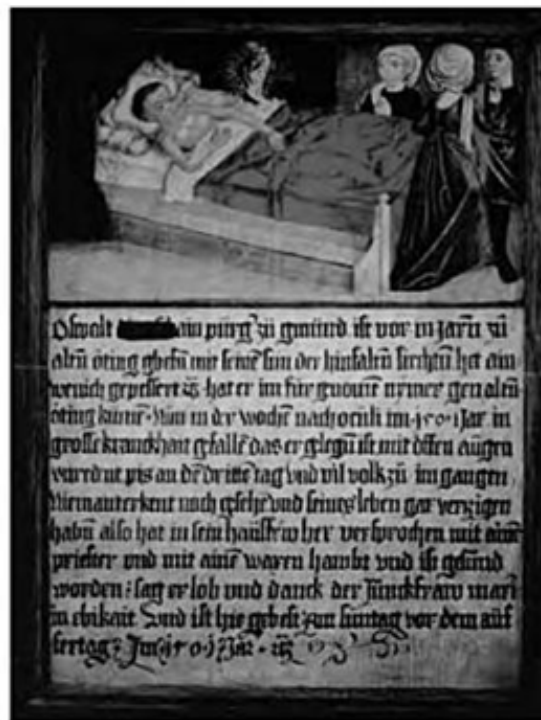


Figura 1.2. Ilustración de un texto alemán Medieval de un paciente el cual está posiblemente en un estado de estatus epiléptico.

La organización Mundial de la Salud (OMS) y la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE) definen a la epilepsia como una afección neurológica crónica, recurrente y repetitiva, de fenómenos paroxísticos ocasionados por descargas de neuronas cerebrales de forma desordenada y excesiva. La epilepsia es un síndrome de desordenes cerebrales del sistema nervioso central. En el mundo 450 millones de personas están afectadas con desordenes mentales y neurológicos, de los cuales 60 millones padecen epilepsia.¹

Se excluye de la consideración de "paciente con epilepsia" a alrededor de un 6 % de la población mundial que son aquellas personas que han tenido una convulsión

febril, convulsiones neonatales (convulsiones ocurridas en los primeros 30 días de vida) o ataques sintomáticos agudos (convulsiones producidas por enfermedades agudas, intoxicaciones, abuso de sustancias o daños neurológicos agudos) y a aquellas que han tenido una única convulsión de forma aislada.²

La epilepsia afecta a personas de todas las edades su incidencia es mayor durante los primeros años de vida y en personas ancianas, pero inicia antes de los 20 años en las tres cuartas partes de los casos; su inadecuado control puede conducir a daño cerebral permanente y a trastornos del aprendizaje.³

Clasificación de las convulsiones epilépticas.

Existen muchas clasificaciones sobre las convulsiones epilépticas, por ejemplo, una clasificación describe los síndromes epilépticos. Es decir, grupos de síntomas que suelen ocurrir y que incluyen: tipo de convulsión, causa, edad de inicio y otros factores. Se han identificado más de 40 tipos de síndromes epilépticos, los cuales han sido clasificados en crisis parciales y crisis generalizadas. De todas las clasificaciones existentes, la más completa es la realizada por la "Commission of Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy".⁴ Las crisis epilépticas pueden ser **parciales** o **generalizadas**. A cada uno de estas convulsiones se las puede clasificar a su vez en subgrupos según las características de cada convulsión.

Las **convulsiones o crisis parciales** constituyen cerca del 60 % de todas las formas de la epilepsia. Son aquellas que se originan en un lugar concreto del cerebro (llamado foco) y son, por tanto, de origen temporal, frontal, occipital o parietal. Hay dos tipos de crisis parciales: *simples*, si no se asocian a pérdida de contacto con el medio externo, o *complejas*, con pérdida de contacto con el medio (pierde la capacidad de respuesta y memoria durante la crisis).

Las *crisis parciales simples* consisten en sensaciones o percepciones anormales de tipo visual, sensitivo, psíquico u olfativo, o en una actividad motora (movimientos clónicos, posturas tónicas). Las *crisis parciales complejas* se caracterizan porque el paciente presenta una mirada ausente y la realización de actos más o menos complejos y repetitivos (automatismos manuales desorganizados u organizados, movimientos de deglución o chupeteo, etc.) con amnesia de lo sucedido durante el período de crisis y el inmediato período post-crítico. El 50% de los pacientes con crisis parciales presentan generalización secundaria y esta generalización ocurre de forma variable en función del control de su epilepsia. En las *crisis parciales con*

Capítulo 1

generalización secundaria existe una descripción clínica de un síntoma precedente (aura). Estas crisis evolucionan hasta una convulsión tónico-clónica, con pérdida del conocimiento y contracciones sostenidas (tónicas) de los músculos de todo el cuerpo, a lo que siguen períodos de contracción muscular alternada con períodos de relajación (convulsiones clónicas), y que tiene una duración de uno a dos minutos.

Las **convulsiones o crisis generalizadas** son aquellas que abarcan con amplitud ambos hemisferios del cerebro desde el inicio y pueden ser⁴

a) *convulsivas*:

- tónico-clónicas, tienen las mismas características de las convulsiones parciales con convulsiones tónico-clónicas generalizadas de manera secundaria, salvo que no van precedidas por una convulsión parcial.

- mioclónicas, es una contracción muscular breve (no más de un segundo de duración) de tipo choque eléctrico, que puede abarcar a una parte de la extremidad, o puede ser generalizada.

- tónicas

b) *no convulsivas*:

- crisis de ausencia, en las cuales hay una pérdida del conocimiento repentino acompañada de una mirada fija e interrupción de las actividades que se estaban efectuando. Tiene una duración menor a 30 segundos.

-atónicas

Las epilepsias generalizadas suelen caracterizarse por uno o más de los tipos de convulsiones generalizadas y constituyen casi el 40% de todas las formas de epilepsia (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Clasificación de las Crisis Epilépticas

I. Crisis Parciales

A. Crisis Parciales Simples

1. Con síntomas motores
2. Con síntomas sensoriales o somatosensoriales
3. Con síntomas autonómicos
4. Con síntomas psíquicos

B. Crisis Parciales Complejas

1. Iniciando como una crisis parcial simple y progresando con pérdida de la conciencia
2. Con pérdida de la conciencia desde el inicio

C. Crisis Parcial con desarrollo de crisis generalizadas secundarias

II. Crisis Generalizadas

- A.** Ausencia
- B.** Convulsión Mioclónica
- C.** Convulsión Clónica
- D.** Convulsión Tónica
- E.** Convulsión tónico-clónica
- F.** Convulsión Atónica

Etiología

Según su origen la epilepsia puede ser idiopática, sintomática o criptogénica. Se asume que la Epilepsia idiopática tiene una base genética, se inicia generalmente durante la niñez y comprende el 40 % de los casos. Generalmente los cambios corresponden a procesos moleculares a nivel de los canales de Ca^{+2} , Cl^{-} y neurotransmisores. La epilepsia sintomática típicamente es consecuencia de un daño identificado en el cerebro e incluye enfermedades infecciosas, tumores cerebrales, malformación en desarrollo, trauma cráneo-cerebral, enfermedad cerebrovascular. La falta de oxígeno en el momento del parto, puede afectar el delicado sistema eléctrico del cerebro. Otras causas pueden ser intoxicaciones con plomo y enfermedades tales como la encefalitis, meningitis o hasta casos severos de sarampión, factores tóxicos (alcohol) y factores metabólicos (hipocalcemia, hiponatremia). Esta comprende un 25 % de los casos. Para la epilepsia criptogénica la causa es desconocida pero se presume que la misma puede ser identificada con suficiente investigación.⁵

La frecuencia de esta afección es más alta en países en vías de desarrollo debido al pobre saneamiento ambiental que pone a la población en riesgo de más enfermedades infecciosas y parasitarias; a la dificultad para la atención de los embarazos y partos en muchas zonas del campo alejadas de los servicios médicos lo cual trae mayor probabilidad de experimentar daño cerebral permanente como consecuencia de algunas enfermedades, malnutrición o complicaciones prenatales. Se estima que el 80% de los enfermos viven en estos países.⁶

La epilepsia puede controlarse en muchas personas con los medicamentos tradicionales actualmente disponibles, sin embargo, la epilepsia responde al tratamiento en aproximadamente un 70% de los casos, pero alrededor de tres cuartas partes de los afectados residentes en países en desarrollo no reciben el tratamiento que necesitan. De los tratamientos existentes, el tratamiento con fármacos antiepilépticos es el más utilizado.

Capítulo 1

Diagnóstico de la Epilepsia y las Convulsiones.

La epilepsia es la tendencia del cerebro a presentar descargas eléctricas en forma desordenada, interrumpiendo otras funciones cerebrales. Presentar una convulsión no significa necesariamente que una persona sufra epilepsia. La epilepsia es la tendencia continua a presentar convulsiones recurrentes debido a una lesión permanente o a la inestabilidad intermitente de las vías eléctricas del cerebro. Cuando un niño o adulto tiene por primera vez una convulsión, esta primera crisis señala la necesidad de hacer una cuidadosa evaluación y considerar la posibilidad de comenzar un tratamiento con medicaciones. El factor más importante en esta decisión es tener en cuenta la probabilidad de que se repitan las convulsiones. Los médicos usan pruebas y extensas evaluaciones para determinar cuáles son las probabilidades de que un paciente presente otras crisis en el futuro.

Entre otros factores hay que considerar la edad, la historia familiar y posibles causas de las convulsiones. Problemas no médicos, tales como la pérdida del empleo o tensiones familiares, o cualquier otro factor que ocasione una emoción profunda pueden ser causas que la genere. Un buen diagnóstico es de importancia fundamental. El Electroencefalograma (EEG) es una parte integral de la valoración del paciente con sospecha de crisis. Por otro lado, nuevos métodos de diagnósticos como registro video-EEG prolongado, tomografía computarizada de cráneo y las diversas técnicas de imagen por resonancia magnética nuclear han permitido mejorar el diagnóstico.⁷

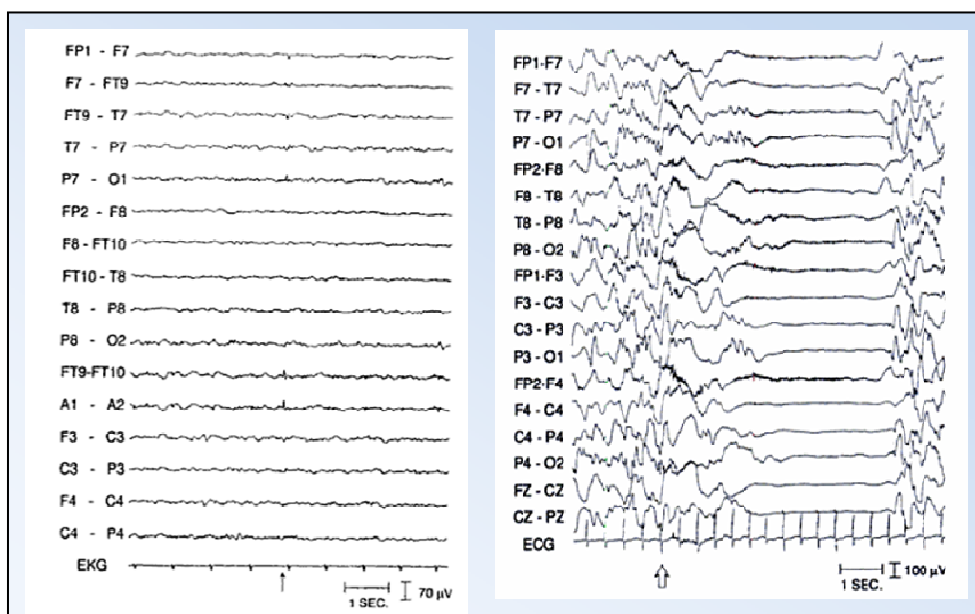


Figura 1.3 Izquierda: EEG de una mujer de 35 años normal, con dolores crónicos de cabeza. Derecha: EEG de un niño de 8 años, durante una convulsión, la misma implica una abducción tónica y una extensión de ambos brazos.

Es posible que una persona con un diagnóstico de epilepsia, presente más de un tipo de convulsión. Las convulsiones que se inician en un infante pueden ser sustituidas por otros tipos de convulsiones cuando el niño crece. No es infrecuente encontrar a individuos que presenten convulsiones parciales y periódicamente o alternativamente, manifestar convulsiones generalizadas.

Frecuencia de las Convulsiones.

En los casos más severos los ataques ocurren frecuentemente, a pesar de la toma de la medicación. En la mayoría de los casos las convulsiones son menos frecuentes y fácilmente controladas. Pero, en algunos pacientes es posible que las convulsiones puedan reaparecer después de ser controladas por muchos años. En muchos pacientes la frecuencia y la severidad de las convulsiones son variables. Asimismo, no es raro encontrar un aumento de la frecuencia de convulsiones sin ningún deterioro de la condición fundamental del paciente. Muchos factores influyen en la frecuencia de las convulsiones incluyendo, entre otros a la privación de sueño, la toma irregular del medicamento antiepiléptico, el consumo de alcohol o estupefacientes, interacciones con ciertos medicamentos, la fotosensibilidad que manifiestan algunas personas, al exponerse a las luces centellantes o a patrones visuales repetitivos.

Algunas veces pueden ocurrir cambios en las condiciones normales del cerebro lo que sería la causa del aumento de las frecuencias de las convulsiones. El embarazo puede tener efectos en la severidad y frecuencia de las convulsiones. Un incremento de la frecuencia convulsiva merece una cuidadosa reevaluación por el médico. En ocasiones es imposible identificar la causa específica de un incremento en la frecuencia de las convulsiones.

Consecuencias Sociales.

El empleo es un área con problemas significativos para las personas con epilepsia, experimentan restricciones como las relacionadas con manejar o trabajar en situaciones en las cuales puedan ser responsables de daños a ellos mismos u otras personas. Además de esto, a menudo las personas con epilepsia son víctimas de la ignorancia y estigmatización, especialmente en países donde la epilepsia tiene una connotación cultural negativa.⁸

El riesgo de muerte de una persona con epilepsia es mayor comparado con el riesgo para la población general. Esto genera una preocupación muy grande de los pacientes y médicos, y es deseable una temprana identificación de pacientes

Capítulo 1

con este riesgo, para poder llevar a cabo estrategias preventivas. La epilepsia no es una condición uniforme, y la probabilidad de mortalidad depende muchas veces de la etiología. La mortalidad puede dividirse en muertes atribuibles a la epilepsia, muertes debido a la patología responsable de la epilepsia, las cuales incluyen neoplasia, enfermedad cerebrovascular y neumonía; y muertes sin condición relacionada.⁹

Tratamiento de Epilepsia

Existen muchos tratamientos actualmente, por lo que alrededor del 70 % de las personas afectadas pueden dominar sus ataques con el uso de medicamentos o mediante la práctica quirúrgica. El tratamiento de primera elección es el uso de medicamentos y también es el más usado. No curan la epilepsia, pero en muchas personas evitan o reducen las convulsiones.¹⁰

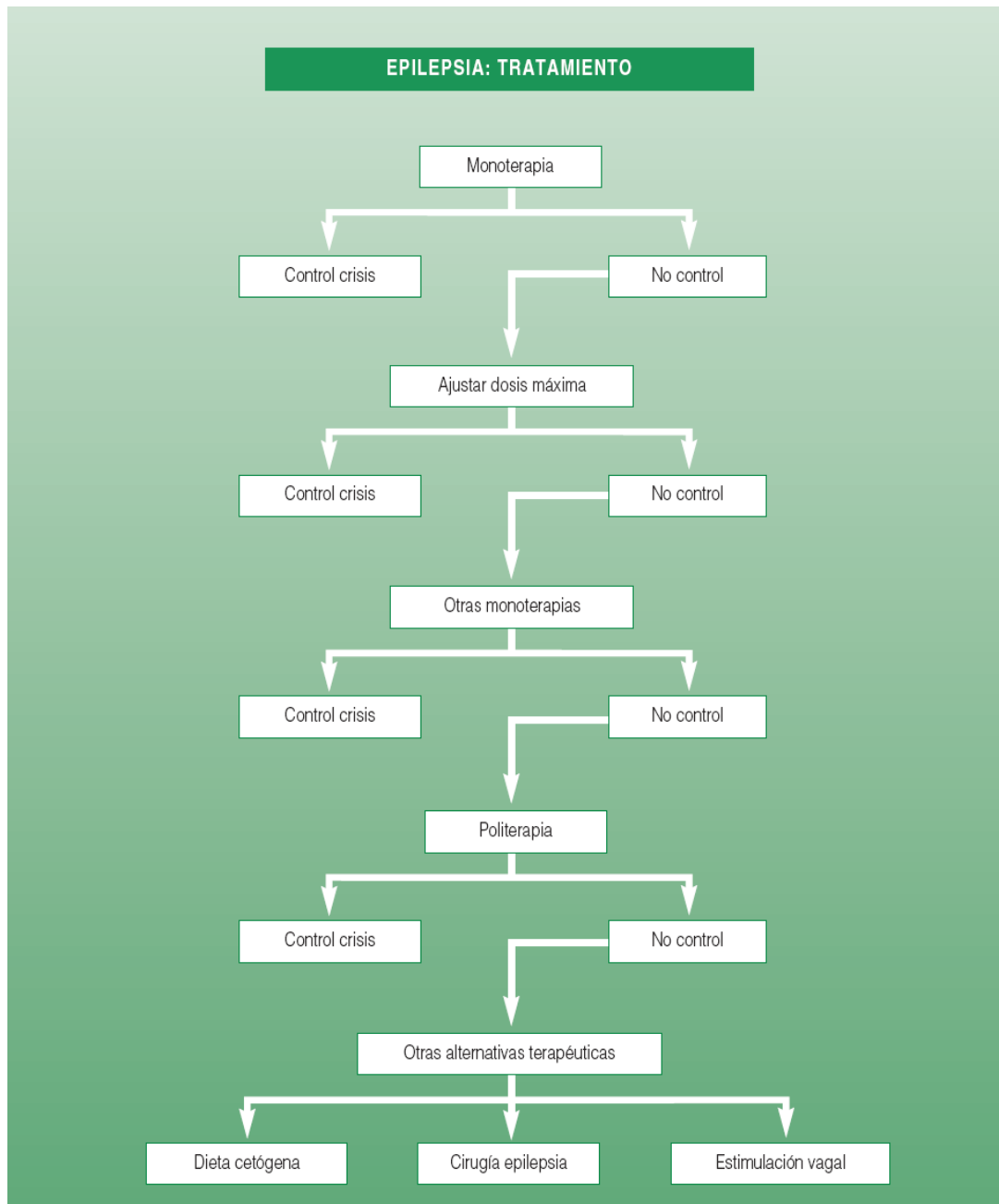
Después de una sola crisis, existen cerca del 30 % de posibilidades de una segunda crisis. Por otro lado, existe un 70 % de posibilidades de que un paciente quede libre de ataques por el resto de su vida. Por esta razón, la mayoría de los neurólogos no inician con medicación después de una sola crisis, excepto en circunstancias muy inusuales. Cuando una segunda crisis ocurre, existe un 70% de chances de que ocurra una tercera. A menos que las dos crisis estén muy separadas de tiempo, los neurólogos usualmente inician medicación después de la segunda para tratar de prevenir futuras crisis.

Después de la segunda crisis (el cual resulta en el diagnóstico epilepsia) cerca de dos tercios de los pacientes tienen sus crisis controladas con la primera medicación usada, generalmente sin mayores efectos adversos.

Si ocurren efectos adversos, o los ataques no son controlados, se prueba otro anticonvulsivante. Un veinte o veinticinco por ciento de los pacientes que no respondieron a la primera medicación, pueden responder a la segunda o a la tercera.

Lamentablemente, del 30 al 40 % por ciento de los pacientes con epilepsia parecen no responder a ninguna medicación. Varios estudios recientes en niños y adultos, han demostrado que, si los primeros dos o tres fármacos no funcionan, los parientes y doctores no deben perder tiempo probando un cuarto o quinto fármaco, pero si deben probar otros tratamientos.

Un porcentaje de estos serán candidatos a tratamiento quirúrgico de la epilepsia, en cuyo campo existen diferentes técnicas (Esquema 1.1).¹¹



Esquema 1.1. Algoritmo del Tratamiento de la Epilepsia.

Tratamiento de la epilepsia a través de la cirugía.

La cirugía es una alternativa al tratamiento en aquellos pacientes con epilepsia fármaco-resistente. Para dicho tratamiento el paciente debe ser sometido a una rigurosa evaluación pre-quirúrgica. La cirugía del cerebro puede ser un camino exitoso en el tratamiento de la epilepsia. La cirugía es considerada en los pacientes que tienen epilepsia con las siguientes características:

* El que ha sido tratado con medicamentos sin llegar a obtener una mejoría esperada.

Capítulo 1

- * En individuos con convulsiones que siempre comienzan en una región del cerebro.
- * En individuos con convulsiones que puede ser removida una parte del cerebro sin dañar una función importante como el habla, memoria o la vista.

En adición, a las operaciones para remover una pequeña parte del cerebro donde comienza la convulsión, otros procedimientos pueden ser realizados para interrumpir la propagación de los impulsos eléctricos en el cerebro.

La seguridad que permiten las nuevas técnicas de diagnóstico hace que la cirugía de la epilepsia no sea una técnica de última elección sino un tratamiento más, que en algunos casos estará indicado tempranamente.

Por ejemplo, los pacientes con epilepsia temporal con esclerosis de hipocampo o lesión, especialmente si es del lóbulo temporal derecho, son óptimos candidatos a cirugía y esta se puede indicar cuando el paciente no haya sido controlado con dos o tres fármacos antiepilépticos.¹²

Aún cuando este tipo de operaciones detenga por completo las crisis epilépticas, es importante que se sigan tomando medicamentos durante un cierto tiempo, para darle tiempo al cerebro de readaptarse. Los médicos generalmente recomiendan que se sigan tomando los medicamentos durante 2 años después de una cirugía exitosa, para evitar la ocurrencia de nuevas crisis.⁷

Pero todavía queda un gran porcentaje excluido de esta opción, y en estos casos está indicado otro tipo de tratamientos como la estimulación del nervio vago (VNS, del inglés *vagus nerve stimulation*) o a través de una dieta especial (dieta cetogénica).

La VNS y la dieta cetogénica son tratamientos alternativos para pacientes que no se controlan adecuadamente con tratamiento farmacológico y que tampoco son candidatos a cirugía.

Dieta Cetogénica

El ayuno ha sido utilizado como tratamiento para los ataques y la epilepsia desde tiempos bíblicos, y es mencionado en la Literatura de la Edad Media. Sin embargo, no fue hasta 1921, en una convención de la Asociación Médica Americana, que un Médico Pediatra de New York, Rawle Geyelin, reportó el tratamiento de un niño epiléptico de 4 años con días alternados de ayuno.

La Dieta Cetogénica, es un tratamiento médico para controlar los ataques por el cambio del metabolismo primario del organismo a la utilización de grasas como fuente de energía más que la utilización de glucosa.

No se conoce al momento la manera en que se inhiben las crisis con este tratamiento, aunque se cree que el β -hidroxibutirato formado como subproducto de la cetosis es uno de los responsables. La dieta Cetogénica simula el metabolismo del ayuno. Cuando una persona en ayuno ha quemado toda su reserva de glucosa, después de 24 a 36 horas, su cuerpo comienza a quemar las reservas de grasas para tener energía. Una persona realizando la dieta Cetogénica obtiene su energía principalmente quemando las grasas de la dieta, en mayor proporción que la fuente común de energía, los carbohidratos (glucosa). Pero, al contrario que en ayuno, la dieta cetogénica permite a la persona que mantiene esta quema de grasas, tener un metabolismo parcialmente libre de hidratos por un periodo extendido de tiempo.¹³

La dieta Cetogénica no está completamente libre de efectos adversos. En general, la dieta cetogénica es mucho mejor tolerada que la mayoría de los medicamentos, y tiene menos efectos adversos potenciales. Los efectos adversos principales son: carencia del aumento de peso, crecimiento levemente disminuido, colesterol alto, constipación, piedras en riñones, y acidosis. Todos estos efectos son reversibles sin tener que dejar la dieta.

Estimulación del nervio vago

La Estimulación del nervio vago es una técnica paliativa. Evita las convulsiones mediante el envío al cerebro de impulsos pequeños y regulares de energía eléctrica a través del nervio vago (un nervio situado en el cuello). Este aparato, denominado *estimulador del nervio vago*, funciona a pilas y se implanta quirúrgicamente bajo la piel del pecho en forma similar a un marcapasos, conectándose con el nervio vago en la parte baja del cuello. En general los pacientes disminuyen la frecuencia de las convulsiones con el dispositivo, aunque su uso no los independiza de la medicación y favorece efectos secundarios leves (como ronquera, dolor de oídos, dolor de garganta o náuseas).¹⁴

Existen muchos tratamientos actualmente, por lo que alrededor del 75 % de las personas afectadas pueden dominar sus crisis, sin embargo, un importante porcentaje de pacientes con epilepsia continúan su vida sin controlarlas. Por ejemplo, se estima que un 25-40 % de los pacientes con epilepsia presentan fármaco-resistencia, o las prácticas actuales resultan inútiles o insuficientes. Esto deja claro la necesidad de nuevas y más eficientes terapias que aumenten la calidad de vida de los pacientes con epilepsia.

Capítulo 1

Mecanismos de las convulsiones mediadas por canales iónicos

Actualmente no existen fármacos que actúen previniendo la formación de focos convulsivos, sino que los compuestos disponibles parecen actuar principalmente suprimiendo o evitando la propagación de una crisis epiléptica. Esto puede suceder a partir de diversos procesos, a veces simultáneos. Los mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos (FAEs) no son completamente conocidos. Sin embargo, estudios relativamente recientes de neurotransmisores y receptores específicos sirvieron para definir los principales modos de acción farmacológica de estos fármacos.

Los mecanismos propuestos involucran la habilidad de un fármaco de modelar la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria. Esto puede suceder mediante un efecto sobre los canales iónicos, o sobre los receptores y metabolismo de los neurotransmisores.¹⁵

Canales Iónicos

Los canales iónicos son enzimas que atraviesan la membrana plasmática, y que catalizan la difusión selectiva y pasiva de iones. Estas proteínas forman poros que sufren cambios conformacionales rápidos entre estados cerrados, no permeables y abiertos. En esta última conformación es que seleccionan y dejan pasar iones antes de volver a cerrarse. El funcionamiento anómalo de canales da lugar a patologías del sistema nervioso central, entre las que se encuentra la epilepsia. Es por ello que uno de los objetivos en el desarrollo de nuevos FAEs es encontrar compuestos que modulen selectivamente la regulación iónica de la excitabilidad neuronal. Esto fue posible luego del descubrimiento y caracterización, aunque incompleta, de estos canales.¹⁶ Los canales catiónicos dependientes del voltaje son una superfamilia de este tipo de proteínas de membrana excitables. Existe evidencia de que algunos agentes anticonvulsivos interactúan con los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{+2} , mediante su unión a sitios receptores ubicados en sus subunidades.

Canales de Sodio

Los *canales de sodio* son responsables de la propagación de los potenciales de acción en las fibras mielinizadas y no mielinizadas. Los tres estados conformacionales de estos canales se denominan activos, de reposo e inactivo. Cada uno de ellos es capaz de conducir una señal eléctrica y de permitir una permeabilidad diferente (o ninguna) de los iones Na^+ . En general, luego de que una

membrana se despolariza aumenta la permeabilidad a los iones Na^+ y estos entran a la célula, que luego retorna a su estado normal.¹⁶

Los análisis electrofisiológicos de neuronas individuales durante una crisis convulsiva parcial muestran que las neuronas presentan despolarización y potenciales de acción de activación a frecuencias altas. Este comportamiento es característico de las convulsiones y es infrecuente durante la actividad neuronal fisiológica. Por tanto, se esperaría que una inhibición selectiva de este modelo de activación redujera las convulsiones. Se cree que esto se produce mediante un decremento de la capacidad de los canales de Na^+ de recuperarse de dicha activación.¹⁷ Esto es, se requiere la abertura desencadenada por la despolarización de los canales de Na^+ en la membrana axoniana de una neurona para que se origine un potencial de acción. Después de esa abertura los canales se cierran de modo espontáneo (inactivación). Se piensa que esta inactivación da origen a un período refractario durante el cual es imposible evocar otro potencial.

Luego de este lapso los canales de Na^+ quedan de nuevo preparados para participar en otro potencial de acción. El decremento de la velocidad de recuperación limitaría la capacidad de una neurona para activar a frecuencias altas, efecto que tal vez sea la base de la acción de fármacos tales como carbamazepina, lamotrigina, fenitoína, topiramato, ácido valproico y zonisamida (figura 1.4).¹⁷ En cuanto al sitio de acción de este tipo de anticonvulsivos, se postula que se encuentra en el lado intracelular del canal.

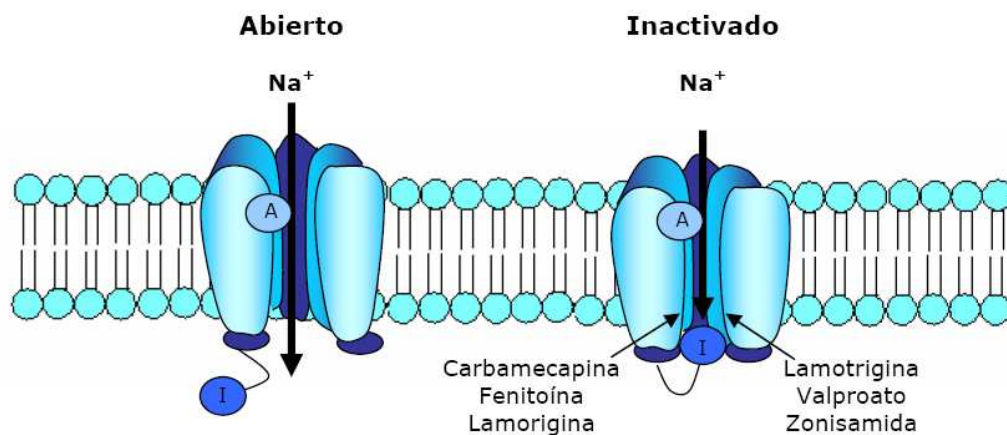


Figura 1.4. Inactivación del canal de Na^+ intensificado por el anticonvulsivo, que reduce la capacidad de las neuronas para efectuar activación a frecuencias altas. A: compuerta de activación. I: compuerta de inactivación.¹⁷

Capítulo 1

Canales de Calcio

Una propiedad intrínseca de las neuronas talámicas es una forma particular de corriente de Ca^{+2} regulada por voltaje, la corriente de umbral bajo (corriente T). El mecanismo principal por medio del cual parece actuar la mayor parte de los fármacos usados en la crisis de ausencias (etosuximida, ácido valproico, trimetadiona) es la inhibición de esta corriente T (figura 1.5).¹⁷

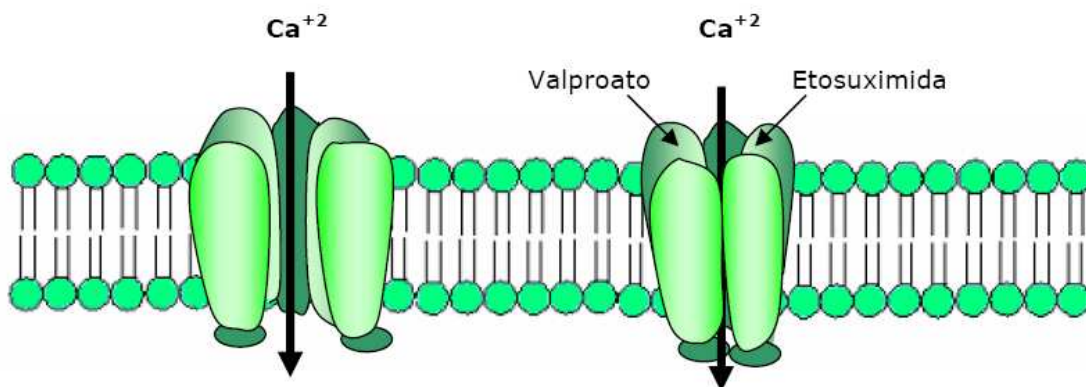


Figura 1.5. Reducción de la corriente por los canales de Ca^{+2} del tipo T inducida por los anticonvulsivos.¹⁷

Canales de Potasio

Se cree que la activación de los canales de K^{+} hiperpolarizan las neuronas y por lo tanto las inhiben. Se han desarrollado fármacos selectivos para este tipo de canales, pero no fueron exitosos debido a su incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.¹⁸

Mecanismo de las convulsiones mediadas por neurotransmisores.

Neurotransmisores excitatorios

Los aminoácidos glutamato y aspartato son considerados los principales neurotransmisores excitatorios presentes en el sistema nervioso central de los mamíferos. Los receptores de los aminoácidos excitatorios se clasifican usualmente en base a los agonistas selectivos para cada uno. De este modo se identificaron 5 subtipos de receptores, donde los tres más importantes se clasifican como receptores del N-metil-D-aspartato (NMDA), del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-

isoxazolpropiónico (AMPA), y kainato.¹⁹ Cada uno de estos tres subtipos son canales iónicos regulados por ligando y probablemente están acoplados a un canal catiónico que se abre en respuesta a la unión de agonistas, lo cual despolariza a la célula. Sin embargo, el complejo receptor-canal NMDA posee un conjunto de características únicas que lo distinguen de los otros subtipos. Este receptor consta de un sitio de unión de glutamato y uno para el co-agonista glicina, debiendo estar ambos sitios ocupados para que se produzca la apertura del canal. De este modo se permite el pasaje de Ca^{+2} y Na^{+} hacia el interior de la célula y de K^{+} hacia el exterior. Los antagonistas del receptor NMDA, tanto competitivos como no competitivos, han demostrado ser efectivos como anticonvulsivos en varios modelos animales de epilepsia. FAEs como fenitoína, carbamazepina y ácido valproico bloquean en cierta medida las respuestas mediadas por el NMDA.²⁰ En la práctica, el desarrollo de antagonistas de este receptor con el objeto de encontrar nuevos FAEs no ha resultado tan exitoso como se esperaba, debido a los efectos adversos encontrados en los compuestos diseñados.¹⁵

Procesos de inhibición sináptica.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio, el cual se forma en el cerebro por descarboxilación del glutamato. El incremento de la inhibición sináptica mediada por el GABA reduce la excitabilidad neuronal y eleva el umbral convulsivo.¹⁷ Se supone entonces que los diversos fármacos bloquean las convulsiones al regular la inhibición sináptica mediada por GABA a través de una actividad en distintos sitios de la sinapsis. Compuestos como barbituratos, benzodiazepinas y el ácido valproico parecen mostrar este mecanismo de acción.²¹ El GABA actúa mediante sitios en receptores postsinápticos, los cuales regulan los canales Cl^{-} de membrana. El principal receptor denominado GABA-A inhibe a la célula postsináptica mediante un incremento en el flujo de iones Cl^{-} hacia el interior de la célula. Las benzodiazepinas y los barbitúricos pueden intensificar esta inhibición.¹⁷ Ese mecanismo tal vez sea la base de la eficacia de estos compuestos contra convulsiones parciales y tónico-clónicas (figura 1.6).

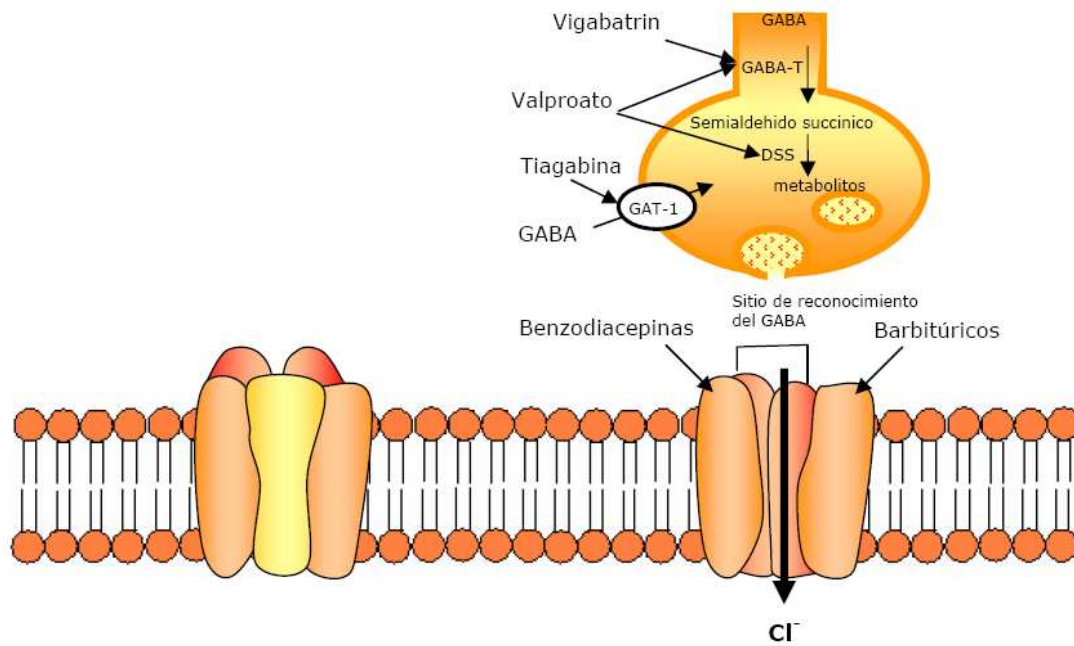


Figura 1.6. Transmisión sináptica incrementada del GABA. En presencia del GABA el receptor GABA-A (estructura del lado izquierdo) se abre, lo cual permite la entrada de Cl⁻. Algunos FAEs actúan mediante la reducción del metabolismo del GABA, otros a nivel del receptor GABA-A. GABA-T: GABA transaminasa, GAT-1: transportador de GABA, DSS: deshidrogenasa succínica de semialdehido.¹⁷

Referencias Capítulo 1

1. Theodore, W.H.; Spencer, S.S.; Wiebe, S., ILAE Report. Epilepsy in North America: A report prepared under the auspices of the global campaign against epilepsy, the International Bureau for Epilepsy, the International League Against Epilepsy, and the World Health Organization., *Epilepsia*, **2006**, 47, 1700-1722.
2. Banerjee, P.N.; Filippi, D.; Hauser, W.A. *Epilepsy Research*, **2009**, 85, 31-45.
3. Hauser, W.A.; Annegers, J.F.; Kurland, K.T. *Epilepsia*, **1991**, 32, 429-445.
4. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, **1981**, 22, 489-501.
5. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia*, **1989**, 30, 389-99.
6. Epilepsy: social consequences and economic aspects. *WHO Fact Sheet N°166*, **2001**. Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs166>
7. Frazin, N. En: *Seizures and Epilepsy: Hope Through Research*. NIH Publication N°00-156, **2000**.
8. Smeets, V.M.; Van Lierop, B.A.; Vanhoutvin, J.P.; Aldenkamp, A.P.; Nijhuis, F.J. *Epilepsy & Behavior*, **2007**, 10, 354-362.
9. Hitiris, N.; Mohanraj, R.; Norrie, J.; Brodie, M.J., *Epilepsy & Behavior*, **2007**, 10, 363-376.
10. Epilepsy: scientific and medical advances. *WHO Fact Sheet N°167*, **2001**.
11. Campos, M.R., *Pediatr. Integral*, **2007**, 11, 787-796.
12. Engel, J., *Arch. Neurol.*, **1999**, 56, 1338-1341.
13. Freeman, J. M.; Kossoff, E.H.; Hartman, Q.L.; *Pediatrics*, **2007**, 119, 535-543.
14. Handforth, A.; DeGiorgio, C.M.; Schachter, S.C.; Uthman, B.M.; Naritoku, D.K.; Tecoma, E.S., *Neurology*, **1998**, 51, 48-55.
15. White, H.S., *Epilepsia*, **1999**, 40, 2-10.
16. Brown, G. B., *Int. Rev. Neurobiol.*, **1991**, 29, 81-110.
17. McNamara, J. O., Capítulo 21: Fármacos Eficaces para el Tratamiento de las Epilepsias. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Goodman, L. S.; Gilman, A., Eds.; 10^{ma} Ed.; McGraw-Hill Interamericana, México, **2001**, 529-556.
18. Porter, R.J.; Rogawski, M.A., *Epilepsia*, **1992**, 33, S1-S6.

Capítulo 1

19. Williams, K.; Romano, C.; Dichter, M.A.; Molinoff, P.B., *Life Sci.*, **1991**, 48, 469.
20. Wamil, A.W.; McLean, M.J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1993**, 267, 218.
21. Loscher, W. GABA and the Epilepsies. Experimental and Clinical Considerations. En: *GABA. Basic Research and Cellular Applications*. Bowery, N.G.; Nisticó, G., Eds.; Pythagora Press, Rome, **1989**, 260.

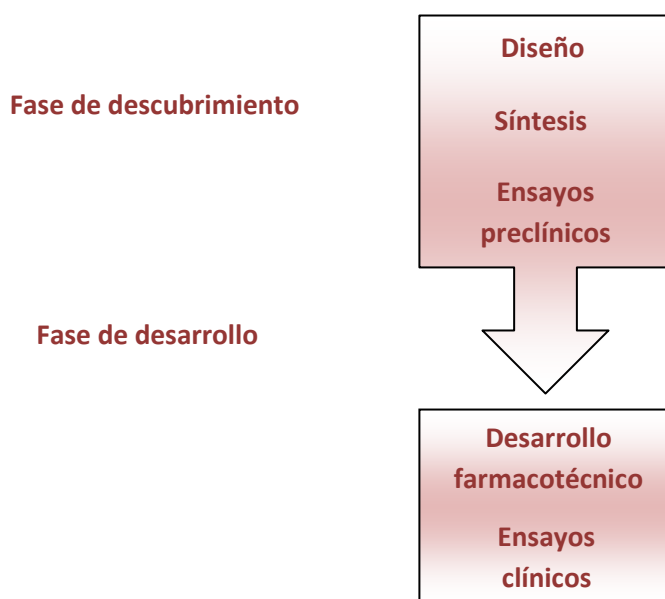
Capítulo 2
Diseño de Fármacos y Fármacos
Antiepilépticos

Diseño de Fármacos

Introducción

La historia del medicamento se remonta a los orígenes de la sociedad humana. Desde los primeros tiempos el hombre ha acudido a la naturaleza para obtener sustancias que, o bien le ayudaran a paliar su dolor, los síntomas de sus enfermedades... o bien le facilitarían la obtención del alimento (veneno para la caza), sus relaciones sociales y religiosas (estimulantes y alucinógenos), etc. Esta circunstancia ha permitido disponer de una amplia información, que sometida a la observación atenta y al estudio crítico, ha dado lugar al planteamiento de ideas que, debidamente desarrolladas, han llevado a la obtención de nuevos medicamentos.

El descubrimiento de un nuevo fármaco y su desarrollo posterior, son dos fases que condicionan el logro de un nuevo producto, útil en la terapéutica. Se considera, de manera general, que el descubrimiento comprende una serie de etapas, todas necesarias para que podamos asegurar que el compuesto tiene el perfil buscado de actividad. Estas etapas incluyen, de acuerdo al origen, el aislamiento de la fuente natural, su síntesis o la obtención biotecnológica y todas las fases preclínicas, incluida la toxicología; de manera tal que nos confirmen que el compuesto es aceptable en cuanto eficacia y seguridad para su ensayo en seres humanos. Esquema 2.1. En un sentido más amplio, es un gran conjunto de actos que culminan en la utilización terapéutica de un nuevo compuesto para que llegue a ser un medicamento.



Esquema 2.1. Esquema de Fases en el desarrollo de un nuevo medicamento.

Capítulo 2

Esta fase de descubrimiento, o sea, desde la obtención hasta la primera aplicación en animales, se estima que dura aproximadamente 42,6 meses (3,55 años) como promedio, en aquellos países y multinacionales farmacéuticas con una amplia infraestructura investigativa. En países con un nivel menor de desarrollo, esta fase alcanza aproximadamente unos 5-6 años.

La fase de desarrollo comprende la de los estudios clínicos y la del registro farmacéutico, y se estima que duren entre 68.6 meses y 30.3 meses respectivamente. Todo este largo proceso, desde su obtención hasta su registro comprende un total de 11.8 años de investigación, con un costo promedio de 1000 millones de dólares por cada nuevo medicamento que salga al mercado.¹

Lo más preocupante es que sólo una de cada 10 000 moléculas ensayadas pasa a la fase de desarrollo, una de cada 100 000 supera los ensayos clínicos y logra registrarse y sólo 3 de cada 10 nuevos medicamentos registrados recupera su inversión inicial. Esto genera una triste realidad, por cada millón de moléculas que se inician en esta larga cadena para la obtención de un nuevo medicamento, sólo tres recuperan la inversión inicial. ***Por tal motivo el diseño racional de fármacos, constituye una herramienta casi indispensable en el desarrollo actual de nuevos medicamentos, contribuyendo a un aumento de las posibilidades de éxitos y a un decrecimiento de los costos.***

Diseño Racional de Fármacos

El desarrollo de medicamentos cada vez más seguros, adecuados, específicos y efectivos en el tratamiento de enfermedades, es una tarea que requiere del esfuerzo coordinado e inteligente de un elevado número de profesionales de distinta formación y dedicación, en la que la capacidad de deducción, la intuición y en muchos casos, la suerte, han jugado un papel fundamental.

Reconociendo la importante contribución del azar en el resultado positivo de este esfuerzo, es preciso matizar que su base está sólidamente fijada en un **diseño** inteligente y racional ya que si sólo se acude al azar, es poco probable obtener medicamentos eficaces y seguros.

Las metodologías aplicadas para el diseño racional de fármacos se pueden clasificar en dos grandes grupos, ***según aborden el diseño desde el receptor y aquellas que lo hacen desde el ligando.***

Métodos Directos: Parten del conocimiento del receptor derivado de la información estructural de la proteína, de porciones proteicas o incluso del complejo ligando-receptor (por medio de rayos X, RMN, modelado molecular, etc.).

Métodos Indirectos: En ausencia de información estructural del receptor, se consideran los distintos ligandos que dan el mismo tipo de respuesta biológica, pudiendo inferirse que se unen al mismo sitio de unión. Con esta información se pueden proponer las mínimas características estructurales y electrónicas comunes que permiten interaccionar con el sitio activo. Esto quiere decir que se busca el denominador estructural común (farmacóforo) para un conjunto de ligandos (lo más variados posibles) de un dado receptor.

Desarrollo histórico de los métodos utilizados para la obtención de Fármacos Antiepilépticos.

Particularmente se presentarán las distintas metodologías aplicadas para la obtención de los fármacos antiepilépticos. El desarrollo de los mismos se genera a través de métodos indirectos ya que no se conocen aún las estructuras tridimensionales de los receptores implicados en los mecanismos de la epilepsia.

Se hará una breve presentación de la metodología directa con el objeto de que se pueda comprender la diferencia que presentan las distintas metodologías.

Serendipity

***"En el campo de la observación el azar favorece a los espíritus preparados"* Louis Pasteur, 1854.**

En la historia han existido *hechos fortuitos o accidentales* que han derivado en el descubrimiento de compuestos activos.² Sin embargo, se debe reconocer que han ocurrido grandes avances cuando ante una observación o un hecho casual una mente preparada interpreta el hecho como un avance significativo. Históricamente, la mayoría de los fármacos Antiepilépticos han sido descubiertos por Serendipity, o mediante evaluaciones biológicas (Screening) de compuestos utilizando modelos agudos de convulsiones.

La acción anticonvulsiva tanto de los bromuros como del fenobarbital se descubrió con la ayuda del azar, dado que en ese momento no se contaba con modelos experimentales adecuados, capaces de testear la actividad antiepiléptica de los compuestos.

Capítulo 2

Fármacos antiepilépticos que se obtuvieron por observación y sagacidad:

Bromuros	1857
Fenobarbital	1912
Fenitoína	1932
Etosuccimida	1958
Carbamazepina	1965
Ácido Valproico	1967

Optimización Estructural

El conocimiento de los fármacos que manifiestan una buena acción en el control de la enfermedad, permiten diseñar nuevos compuestos, a partir de su estructura, donde será dables esperar que manifieste la misma actividad. El compuesto así diseñado, si se manifiesta como activo, muy posiblemente debe haber mejorado su potencia, especificidad y/o disminuir sus efectos secundarios o adversos. Esta metodología es conocida como *Optimización Estructural de una Molécula activa* y se basa en la preparación de estructuras relacionadas, mediante transformaciones químicas programadas racionalmente.³

El objetivo que se propone es encontrar nuevos y mejores medicamentos con una mayor actividad, mejor biodisponibilidad, menor toxicidad y en lo posible, una reducción de las reacciones secundarias.

En esta metodología, se distinguen los siguientes objetivos a lograr:

- Mejora de la potencia del líder.
- Eliminación de efectos secundarios no deseados.
- Separación de actividades en compuestos multiacción. Tiene como objetivo potenciar alguna de las acciones farmacológicas sobre las demás, o eliminar algunas de ellas en beneficio de las otras.
- Combinar actividades. Se trata de reunir en una entidad actividades diferentes que puedan actuar en común frente a desórdenes asociados.
- Modificación de la biodisponibilidad del fármaco líder. El descubrimiento de un nuevo fármaco por lo general necesita un incremento de su asequibilidad biológica.

Las modificaciones estructurales se utilizan también con objetivos más estrechamente vinculados a la industria farmacéutica, como es el uso de vías sintéticas más convenientes, o la mejora en la formulación del medicamento para su mejor manejo o administración. Esto no se lleva a cabo mediante cambios efectuados al azar: se cuenta con una serie de criterios establecidos durante años de investigación que orientan la sustitución de determinados grupos de la estructura modelo.

A continuación se enumeran las estrategias más utilizadas para la **modificación estructural** de una molécula activa⁴:

- *Variación de sustituyentes*: es una excelente estrategia que puede utilizarse para aumentar las interacciones entre el compuesto y el receptor y es además, una herramienta muy común desde el punto de vista sintético. El análisis del efecto de la sustitución de grupos alquilo da información acerca de la influencia de la longitud, tamaño, volumen de las cadenas carbonadas y lipofilidad en la actividad. Si estas interaccionan con un bolsillo lipofílico del receptor, su variación dará idea de las dimensiones del mismo. La sustitución sobre compuestos aromáticos también resulta asequible. Puede implicar, por ejemplo, el reemplazo de grupos dadores por aceptores de electrones y viceversa; así como cambios de posición relativas en los anillos. De este modo diferentes propiedades estéricas, electrónicas e hidrofílicas pueden alterarse para detectar su influencia en la actividad.
- *Modificación de la extensión de la estructura*: Involucra la inclusión de grupos alquilo, o arilo, para encontrar nuevas interacciones con el receptor mediante regiones lipofílicas adicionales. También pueden incluirse otras funciones o grupos capaces de generar uniones adicionales del tipo puentes de hidrógeno y/o iónicas con el receptor.
- *Cambio en la longitud de la cadena*: algunos compuestos poseen dos grupos importantes que interaccionan con el receptor, los cuales están unidos por una cadena, es posible que la longitud de esa cadena no sea la óptima para tener la mejor interacción con el receptor. Por lo tanto, prolongando o reduciendo la cadena se puede obtener una mejor interacción entre los grupos interaccionables y el receptor.
- *Expansión o contracción de anillos aromáticos*: mediante una alteración del tamaño del grupo aromático se puede localizar a los átomos en posiciones relativas diferentes, afectando la eficiencia de la interacción con el sitio activo. Además, la extensión de la aromaticidad mediante la *fusión de anillos* puede resultar en un incremento de la interacción y la

Capítulo 2

selectividad. Otra modificación que puede hacerse con este tipo de estructuras es la *inclusión o cambio de posición de heteroátomos* en los anillos. Esto trae como ventaja la posibilidad de nuevas uniones del tipo puente de hidrógeno.

- *Rigidización de la estructura:* es otra opción en la búsqueda del aumento de la actividad y la disminución de efectos secundarios de una estructura determinada. En este caso se fija una parte de ella de manera de rigidizar una conformación por ciclación o localización de un grupo voluminoso, y de esta manera se impide su capacidad de rotación. Como consecuencia de esta rigidización se elimina la posibilidad de adquirir conformaciones vinculadas a interacciones, con determinados grupos que son responsables de efectos no deseados.
- *Simplificación estructural:* En ocasiones, la molécula se simplifica por apertura de anillos o eliminación de determinados grupos, en un intento de identificar qué parte o partes son responsables de la actividad biológica que se está estudiando. Con este fin se diseñan compuestos más sencillos, que contengan los diferentes fragmentos mencionados. Es necesario aclarar que las partes responsables de la actividad no tienen necesariamente que encontrarse unidas entre sí, sino que pueden estar separadas por una serie de átomos que no forman parte decisiva en la interacción con el receptor. En estos estudios se necesita de un verdadero conocimiento de la estructura tridimensional y de las *distintas conformaciones* del compuesto.
- *Bioisosterismo:* En un enunciado un tanto simplista, es razonable el hecho de que compuestos con una misma actividad biológica, deban poseer también una misma estructura, o al menos puntos comunes en las partes responsables de la actividad. *Se definen como grupos bioisósteros a moléculas o grupos que producen una respuesta biológica semejante o antagónica, por poseer propiedades físicas y/o químicas análogas.*⁵ El bioisosterismo es una herramienta muy usada en la química medicinal para la optimización estructural y el diseño de nuevas moléculas. La aplicación de sus principios ha conducido al descubrimiento de un gran número de fármacos. Como ejemplos podemos citar las oxazolidinadionas y las hidantoínas que son bioisósteros clásicos con acción anticonvulsiva (figura 2.1).³

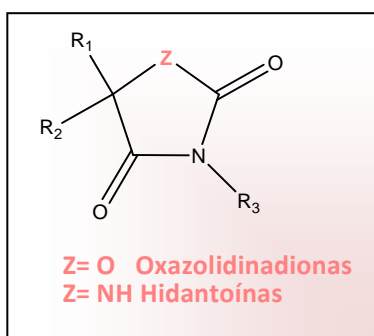


Figura 2.1. Ejemplo de fármacos anticonvulsivantes diseñados por aplicación de los principios del isosterismo.

Profármacos:

En este trabajo de Tesis se aplicará esta metodología para el diseño de nuevos compuestos anticonvulsivos. La misma se detalla en el Capítulo 3 del presente trabajo.

Relación Estructura Actividad Cuantitativa (REAC)

2D-QSAR

El análisis REAC, también conocido en sus siglas en inglés, QSAR (Relaciones Estructura-Actividad Cuantitativas) como todo análisis QSAR es retrospectivo (conocemos el conjunto de moléculas y sus actividades) y nos da una idea cuantitativa de la variación de actividad asociada a una modificación dada. El análisis QSAR es una aproximación "in-silico" (mediante cálculos computacionales) basada en un tratamiento estadístico que relaciona, mediante algoritmos matemáticos, la actividad biológica con descriptores estructurales y/o fisicoquímicos de los ligandos.

De acuerdo a los resultados de este estudio pueden deducirse qué propiedades o características resultan importantes para la actividad. La información obtenida puede ser utilizada para proponer con una cierta base racional cuales cambios estructurales pueden conducir a nuevos compuestos en donde sea posible observar un incremento de la actividad.

La metodología 2D-QSAR da como resultado una ecuación matemática que relaciona cuantitativamente parámetros estructurales con la actividad biológica, asignada a la molécula como un todo.

Capítulo 2

$$\text{Log } 1/C = a \log P + b \sigma + c MR + \dots + k$$

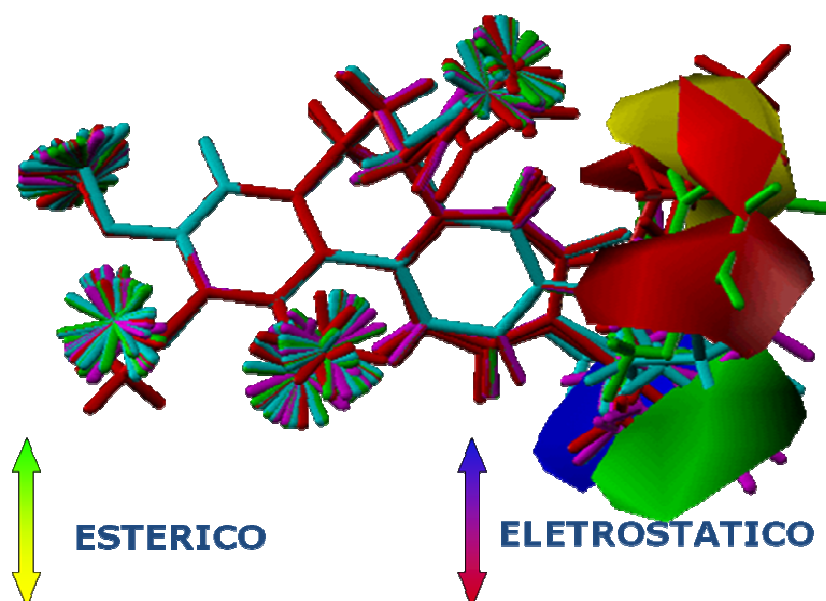
donde 1/C: actividad biológica y los términos dependientes son **Descriptores o parámetros**: son propiedades moleculares calculadas a partir de la estructura química (peso molecular, área superficial, coeficiente de partición, etc.)

Sin embargo, a partir de esta información que es importante porque nos indica de que descriptores depende la actividad del conjunto en estudio, no se puede llegar a diseñar una nueva molécula en base a los resultados 2D-QSAR, limitación que está implícita en el método estadístico usado para generar el algoritmo. Es decir no puede hacerse una extrapolación de una curva de ajuste, dado por la limitación que presenta el corredor de errores. Debe además tenerse en cuenta que la interpretación de los resultados no puede incluir un análisis de las interacciones espaciales que están ocurriendo entre el ligando y el sitio activo, limitando la validez del resultado obtenido.

3D-QSAR

Las limitaciones presentadas en el caso del uso de 2D-QSAR, metodología indirecta, se encuentran superadas con el uso de 3D-QSAR, que *es un modelo cuantitativo que relaciona la actividad biológica de moléculas con sus propiedades calculadas en el espacio de tres dimensiones*. La diferencia más significativa cuando se usan métodos 3D-QSAR, es que se tiene en cuenta la forma espacial de la molécula y se incorpora como prerrequisito al análisis, el conocer el estado conformacional del conjunto de compuestos, en el que debe haberse identificado la conformación activa.⁶ Existen varias metodologías para el estudio 3D-QSAR pero la más utilizada es la metodología CoMFA (Comparative Molecular Fields Análisis: Análisis Comparativo de Campos Moleculares). La metodología 3D-QSAR CoMFA mide la similaridad molecular en el espacio. La filosofía de la metodología 3D-QSAR CoMFA se basa en que las propiedades más importantes de una molécula son su tamaño y forma global (campos estéricos) y sus propiedades electrónicas (campos electrostáticos) los cuales pueden ser cuantificados. Las moléculas del conjunto de análisis son superpuestas en una grilla respetando la conformación activa y en una planilla adicional que tiene el programa, se le asocia la actividad biológica que presenta. La unidad de la grilla es un átomo de Csp³. Posterior a la superposición molecular (fit) el programa realiza análisis estadísticos y como el resultado estará vinculado a cada celda de la grilla, y por lo tanto estas al ser un número muy

grande de variables, el resultado se expresa en regiones espaciales que son favorecidas o desfavorecidas por incrementos estéricos o electrónicos (figura 2.2).



*Figura 2.2. Regiones espaciales de las moléculas del conjunto superpuestas. Reducción del volumen estérico es favorecido si el color es amarillo
Incremento de volumen estérico es favorecido si el color es verde
Mayor carga (+) es favorecida si el color es azul
Mayor carga (-) es favorecida si el color es rojo.*

Otra alternativa es el uso de modelos QSAR combinados para el modelado de nuevos compuestos. Esta metodología combina varios métodos de optimización así como diferentes tipos de descriptores e incluye rigurosos y consistentes modelos de validación.⁷

Modelado desde el receptor:

Es un método directo de diseño de fármacos que se basa en el conocimiento de las características del receptor, es decir se conoce la estructura tridimensional del receptor y localiza el sitio activo.

Existen bases de datos por ejemplo: Protein Data Bank (PDB) donde se encuentran depositadas las coordenadas 3D de más de 70 mil proteínas, complejos ligando proteínas, ácidos nucleicos, y otras macromoléculas biológicas.

- Las características del receptor, sitio activo y ligando se pueden obtener por ejemplo, por cocrystalización del ligando unido a la macromolécula y posterior uso de difracción por Rayos X del cristal. Se puede estudiar así la

Capítulo 2

estructura del complejo ligando-receptor por métodos computacionales e identificar la conformación del ligando.

- No todas las proteínas se pueden cristalizar fácilmente, como ocurre con las proteínas de membranas. Si no se cuenta con los datos de Rayos X del receptor ni del sitio activo, se puede construir un modelo del receptor. Para ello necesitamos conocer la secuencia aminoacídica de la proteína en 2D y la estructura terciaria de una proteína relacionada. Con estos datos podemos construir un modelo del receptor mediante la técnica de *Modelado por Homología*.⁸
- Una vez que se tiene la *estructura 3D del receptor*, utilizando programas que buscan en bases de datos, se buscan ligandos que encastran en la cavidad del sitio activo por complementariedad geométrica. Esta técnica se denomina *Docking*.⁹ El procedimiento de *Docking* consiste en enfrentar los grupos involucrados en la interacción droga-sitio activo. Así se definen distancias de unión óptimas y por último se optimiza el ligando en el entorno del receptor.
- Otros programas generan la estructura de un ligando a partir de un segmento inicial que interacciona con el sitio activo. Luego agregan distintos fragmentos a este segmento hasta obtener al ligando completo dentro del sitio activo (**GROW**).¹⁰
- Los métodos más recientes de diseño llamados "de novo" (LUDI)¹¹ buscan ligandos totalmente novedosos que interaccionen con el sitio activo.

Cribado Virtual (Screening virtual - SV):

El *screening virtual* es un método que permite seleccionar moléculas candidatas apropiadas a partir de colecciones de compuestos o librerías obtenidas por combinatoria química, las cuales pueden o no contar con evaluaciones biológicas. Como los datos de entrada de estos métodos son estructuras químicas y datos de propiedades de estas estructuras, el *screening virtual* se puede aplicar a librerías virtuales de cualquier tamaño. Lo más importante es el pre-tratamiento adecuado de las bases de datos.

En los casos del uso de la búsqueda por *similitud*, lo más importante es la superposición de las moléculas, la búsqueda de un farmacóforo (este está definido por el conjunto de grupos funcionales o porciones moleculares y su posición relativa en el espacio, los cuales determinan los requerimientos necesarios para la interacción con el sitio de unión), uso de técnicas de docking, y la definición correcta de las propiedades de donores y aceptores de electrones. Otro método de screening

virtual fue el derivado de encontrar “*hits frecuentes*”, moléculas que resultan ser activas en diferentes bioensayos.¹²

Tradicionalmente el descubrimiento de un nuevo fármaco comienza a partir del conocimiento de un compuesto líder, con la aparición de la química combinatoria y evaluaciones farmacológicas de alta performance (HTS), se pueden evaluar millones de compuestos para encontrar un nuevo fármaco.

Perspectivas:

La segunda mitad del siglo XX, se ha caracterizado, en virtud de los acontecimientos más importantes, en los anales de la historia como la “era del espacio”, la “era de la computación” y la “era atómica”. De la misma manera se evidencia que también merece llamarse la “era farmacéutica”. En el mundo después de 1950, el descubrimiento y desarrollo de drogas comenzó a ser la consolidación de la era farmacéutica y la química medicinal la base de la misma.¹³

En el año 2006 iniciaron su comercializaron 41 nuevos fármacos en el mundo. La cantidad de nuevos compuestos introducidos está en un orden de decreciente en los últimos años. Situación que puede resultar sorprendente, en razón del creciente, e importante, aumento de los fondos destinados a la investigación farmacéutica.

Estados Unidos aporta el 54% de los nuevos fármacos y Europa el 20%. Japón solamente el 0.5%. Si se los expresa por categorías terapéuticas, los agentes inmunológicos representan el 22% (9) y los antineoplásicos y metabólicos, el 17% (7) respectivamente. No aparecen compuestos nuevos para el tratamiento de enfermedades olvidadas de países en desarrollo, como Malaria, Chagas, Leishmaniasis.

La dificultad de encontrar nuevos fármacos para el sistema nervioso central se visualiza en las estadísticas, ya que en el año 1997 era del 22 % de los fármacos comercializados en el mundo (13 sobre un total de 58 nuevos fármacos) para pasar, diez años después en el año 2006 a ser de un 2% (1 sobre un total de 41 nuevos fármacos).

Puede concluirse que en el último cuarto de siglo pasado se logró poner a disposición de la sociedad un número considerable de medicamentos para muchas enfermedades, y que, en la actualidad, **la situación se ha centrado en optimizar lo encontrado** y en la búsqueda de nuevos compuestos para enfermedades no tratadas.

Un cambio considerable en el mercado de medicamentos, que no influye de manera directa en el descubrimiento de fármacos, esta dado por la aparición de genéricos en el mercado mundial.¹

Capítulo 2

Fármacos Antiepilépticos

En la mayoría de los casos, los fármacos anticonvulsivos clásicos han sido descubiertos por azar, mediante metodologías de screening o a través de la variación estructural de fármacos conocidos. Por ejemplo, los fármacos antiepilépticos desarrollados entre 1912 y 1960 se basaron en una estructura heterocíclica simple común. Durante este período, no se crearon compuestos genuinamente novedosos, sino que la atención se centró en las hidantoínas, barbituratos, oxazolindionas, succinimidias y acetilureas. El conocimiento de los mecanismos de acción de las drogas anticonvulsivas y de las patofisiologías presentes en las enfermedades cerebrales ha incrementado notoriamente en los últimos 20 años. A partir de esta información se han implementado estrategias de diseño racional directas, basadas en la comprensión de estos procesos. Un ejemplo exitoso de la aplicación de esta metodología es el desarrollo de compuestos miméticos del GABA, como son el vigabatrin y la tiagabina, disponibles comercialmente en la actualidad.

Historia de los fármacos antiepilépticos

La epilepsia ha sido descrita y es bien conocida desde épocas antiguas, pero antes del siglo XIX, los brebajes, pócimas y otros remedios disponibles para el tratamiento de las convulsiones se basaron principalmente en rumores e ideas falsas acerca de la naturaleza de la convulsión. Naturalmente estos eran inútiles y muchas veces contribuían al fallecimiento del



paciente. El primer tratamiento médico eficaz fue con bromuro de potasio, introducido por Sir Charles Locock, un obstetra, en 1857. Como ocurrió con muchas otras drogas el razonamiento de su uso era totalmente erróneo, no obstante demostró ser efectivo en algunos casos. Una creencia popular de ese entonces era que la epilepsia era una manifestación de histeria y una consecuencia de la masturbación, por ello era lógico prescribir bromuro de potasio, y luego una solución que consistía en mezclas de sales de bromuros de sodio, potasio y amonio, debido a las propiedades sedativas y antiafrodisiacas de estas sustancias. Los bromuros eran más eficaces en convulsiones tónico-clónicas generalizadas y menos para los otros tipos de convulsiones. Los bromuros poseían marcados efectos adversos, incluyendo efectos sobre la piel (erupción, rash, lesiones ulcerosas),

efectos sobre el tracto gastrointestinal (anorexia, dispepsia, estreñimiento) y sobre el Sistema Nervioso Central (confusión, encefalopatía, irritabilidad, psicosis).¹⁵

Este bromuro fue el tratamiento de la epilepsia por más de 50 años, hasta 1912. Fue en ese año que Alfred Hauptmann divulgó que el tratamiento crónico con fenobarbital, reduce la frecuencia de las convulsiones en pacientes con epilepsia.

Luego llegó la Fenitoína, un fármaco que aún sigue siendo de primera elección en el tratamiento de las convulsiones, que fue sintetizada en 1908, por químicos de Parke-Davis, pero esta no fue lanzada al mercado hasta 1938, gracias a los estudios de Merritt y Putnam, que encontraron que la fenitoína suprimía las convulsiones sin generar efectos sedantes. Esta acertada colaboración entre la academia y la industria, fue la promotora de la búsqueda de nuevos fármacos anticonvulsivos.¹⁶ La trimetadiona, primer fármaco específico para el tratamiento de crisis de ausencia (epilepsia del pequeño mal), fue introducida en 1946, siguiendo los test en animales de Richards y Everett, particularmente el Pentilentetrazol test (PTZ test), de Laboratorios Abbott, y las evaluaciones clínicas de Lennox.¹⁷

Entre 1946 y 1978, 16 nuevas drogas fueron desarrolladas y aprobadas en los Estados Unidos para el tratamiento de la epilepsia. (Ver Tabla 2.1).

Cinco de estas, primidona, carbamazepina, clonazepam, etosuximida y ácido valproico, aún hoy son ampliamente prescritas. Entre 1978 y 1993, no se aprobaron nuevos fármacos antiepilepticos en Estados Unidos. Sin embargo, desde 1993, cuatro nuevos agentes fueron aprobados y comercializados: felbamato, gabapentin, lamotrigina y topiramato.¹⁸

Entre el año 1993 y 2000, la F.D.A (Food and Drug Administration the USA), aprobó el uso de ocho nuevos fármacos antiepilepticos. Entre ellos nuevas formulaciones de viejas drogas como la Fosfenitoína, un profármaco soluble en agua de la fenitoína, que comenzó a estar disponible para la administración intravenosa e intramuscular, teniendo varias ventajas sobre la fenitoína intravenosa.

Por último cabe destacar que entre el año 2000 y 2009¹⁹ se aprobaron sólo cuatro nuevos medicamentos anticonvulsivos: pregabalina, rufinamida, lacosamida y eslicarbazepina acetato, siendo ésta última un profármaco de un metabolito activo de un fármaco antiepileptico de primera generación.

Capítulo 2

Tabla 2.1. Fármacos Antiepilépticas

Fármaco	Año de comercialización (introducido) en USA
Fenobarbital	1912
Mefobarbital ^a	1935
Fenitoina	1938
Trimetadiona	1946
Mefenitoina ^a	1947
Parametadiona ^a	1949
Fentenilate ^a	1950
Fenacemide ^a	1951
Metarbital ^a	1952
Benzclorpropamide ^a	1952
Fensuximide	1953
Primidona	1954
Metosuximina ^a	1957
Etotoin	1957
Aminoglutetimida ^a	1960
Etosuximida	1960
Diazepam	1968
Carbamazepina	1974
Clonazepam	1975
Valproato	1978
Clorazepato	1981
Felbamato	1993
Gabapentin	1994
Lamotrigina	1994
Fosfofenitoina	1996
Topiramato	1996
Tiagabina	1997
Levetiracetam	1999
Zonisamida	2000
Oxcarbazepina	2000
Pregabalina	2005
Rufinamida	2007
Lacosamida	2008
Eslicarbazepina acetato	2009

^a Retiradas del mercado

Reseña de los Fármacos Antiepilépticos utilizados en clínica en la actualidad.

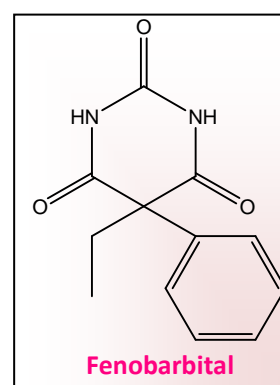
La evolución de los Fármacos Antiepilépticos puede observarse mejor clasificando a los mismos en *generaciones* según las estrategias de desarrollo de fármacos utilizadas.

Fármacos antiepilépticos de Primera generación o FAEs clásicos.

El desarrollo de los primeros FAEs no siguió un programa de diseño de nuevas estructuras, sino que fueron surgiendo de las propiedades anticonvulsivas observadas en modelos animales, de screening aleatorios, de variación estructural de fármacos antiepilépticos conocidos. Otras veces el descubrimiento fue fortuito, como en el caso del Ácido Valproico. Entre los FAEs clásicos, los más utilizados son: **Fenobarbital** (PB), **Fenitoína** (PHT), **Primidona** (PRM), **Etosuccimida** (ESM), **Carbamazepina** (CBZ), **Ácido valproico** (VPA).

Fenobarbital

El Fenobarbital, el más antiguo antiepiléptico de uso general, continúa siendo el antiepiléptico más administrado en el mundo. El Fenobarbital, introducido por Hauptman en 1912, fue uno del grupo de barbitúricos sintetizados y estudiados por Bayer, la compañía Alemana química farmacéutica, en los finales de 1800. Este fue utilizado inicialmente como sedativo, pero luego se evidenció su efectividad en tratamiento de la epilepsia.²⁰



Se ha comprobado que el Fenobarbital es efectivo en controlar convulsiones tónico-clónicas, mejor que cualquier otro antiepiléptico, puede ser tomado una vez al día, está disponible en formulaciones parenterales y es muy económico. La gran prevalencia de efectos adversos crónicos, especialmente de tipo psicológico, comparado con otros fármacos antiepilépticos, hacen que el Fenobarbital sea un antiepiléptico de segunda elección, excepto cuando el costo es una consideración primaria.

Capítulo 2

Difenilhidantoína (Fenitoína®)

La introducción de la Fenitoína fue el paso más importante en la historia de la epilepsia. Esta transformó el tratamiento de la epilepsia, cambio las bases conceptuales de la práctica de epilepsia, el abordaje del descubrimiento de drogas, el rol de las compañías farmacéuticas en la epilepsia. El mejor conocimiento de las estructuras químicas de las drogas inicio el concepto de síntesis de familias de drogas que contengan funciones similares (hidantoínas y barbituratos). La Fenitoína (figura 2.3) no fue la primera hidantoína en ser sintetizada de la cual se hayan conocido sus efectos antiepilépticos. La feniletihidantoína (Nirvanol), fue un importante precursor. Esta posee en su anillo de hidantoína unidos los mismos radicales que el Fenobarbital. Ésta se usó como hipnótico entre 1920 y 1930, pero no fue ampliamente utilizada debido a su toxicidad. La Fenitoína, fue originariamente sintetizada en 1908 por Blitz, y nuevamente en 1923 por Dox y Thomas, químicos orgánicos que trabajaban en la búsqueda de drogas hipnóticas en los laboratorios de Parke-Davis. Ellos notaron que las hidantoínas tienen una estructura de anillo similar al ácido barbitúrico y que al igual que los barbituratos, una sustitución alifática en la posición 5 les confiere propiedades hipnóticas, pero no así una sustitución aromática en la misma posición. Esto fue gratamente aceptado ya que la mayoría de las sustancias antiepilépticas en uso en esos tiempos, eran sedativas (bromuros, fenobarbital, ácido metiletil fenilbarbitúrico) y el efecto antiepiléptico debía estar relacionado a sus efectos sedativos. Así, luego de estudios clínicos realizados por Merritt y Putnam, Parke-Davis lanzo al mercado en 1938 "Dilantin Sodium" (Fenitoína sódica). La Fenitoína es eficaz contra todos los tipos de convulsiones parciales y tónico-clónicas generalizadas, pero no contra las crisis de ausencia.

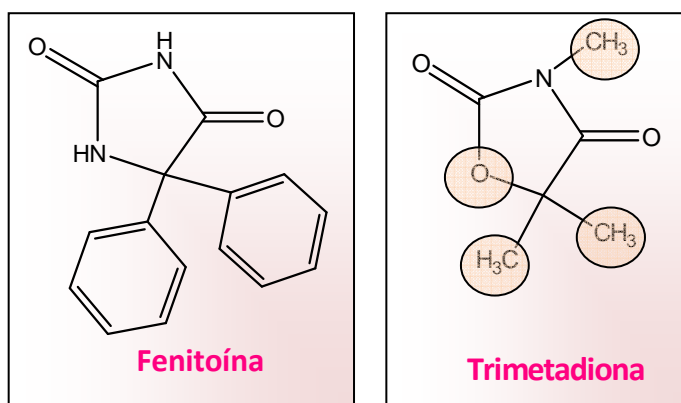
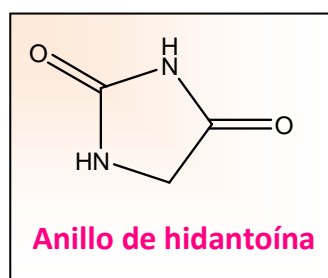


Figura 2.3
Estructuras de la Fenitoína y Trimetadiona, descubiertas a partir de la evaluación de estos compuestos en modelos animales.

Trimetadiona (Tridione®)

La Trimetadiona (Figura 2.3) fue sintetizada en 1944 por Spielman en su búsqueda de drogas con propiedades analgésicas. Sus efectos anticonvulsivantes en animales fueron reportados ese mismo año, y en 1946 se obtuvo la licencia para ser utilizada en humanos. Esta droga fue particularmente efectiva para tratar el pequeño mal (crisis de ausencia). La Trimetadiona tuvo una aceptación mundial más rápida que

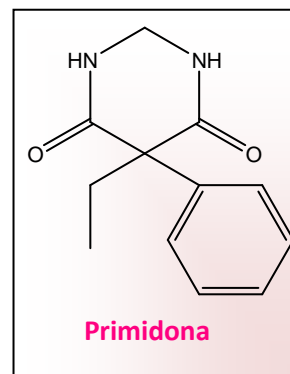


la Fenitoína, quizás a causa de que no existía otra terapia alternativa. La Trimetadiona se emplea sólo para tratar las crisis de ausencia y por lo general exclusivamente en sujetos que no se pueden controlar de manera adecuada con otros compuestos o que no los toleran. A causa de su grave toxicidad potencial (efectos adversos teratogénicos tales como deformación congénita, retardo mental, o de crecimiento) la terapéutica con Trimetadiona requiere supervisión médica constante, sobre todo durante el primer año de tratamiento.

Propaganda de Tridione® para su uso en Epilepsia.

Primidona (Mysoline®)

Más de 2500 barbituratos se sintetizaron desde que fue producido el primer ácido barbitúrico en 1864. Sólo una pequeña fracción de ellos mostró actividad anticonvulsivante, pero no demostraron ser superiores al Fenobarbital. La Primidona fue su mayor competidor. Ésta fue introducida a la práctica médica en 1952. Como la Primidona se metaboliza en vivo a Fenobarbital, no se consideraba que tuviera mayores ventajas que este último.



Pero a principios de los años 50 se reconoció que la Primidona suprime las convulsiones generalizadas en ratones antes de que tenga tiempo de convertirse en

Capítulo 2

Fenobarbital, y esto sentó las bases de que la Primidona posee actividad antiepiléptica independiente del Fenobarbital.



Calm after Storm

"MYSOLINE" is the new anticonvulsant that in clinical trials throughout the world has been shown to be of great value in the treatment of epilepsy.

A new series of papers which have appeared recently, confirm the high efficacy of this drug formed from the early work; its powerful action in grand mal epilepsy has been re-emphasized, and there is evidence that it may be equally valuable in the psychomotor type. The small amount of work which has been done with "Mysoline" in petit mal is encouraging.

Notable Features:

- Low toxicity.
- Notable absence of hypnotic effect.
- Well tolerated in therapeutic dosage.
- Beneficial effect on the general behaviour, performance, and sociability.

'MYSOLINE'

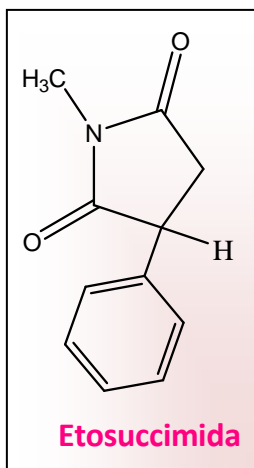
Imperial Chemical (Pharmaceuticals) Limited
A subsidiary company of Imperial Chemical Industries Ltd. MANCHESTER, ENGLAND

Los efectos adversos de la Primidona son similares a los del fenobarbital, pero ésta es menos sedativa. La Primidona es de utilidad contra las convulsiones tónico - clónicas generalizadas y contra las convulsiones tanto simples como parciales complejas.

Propaganda de Mysoline® para su uso en Epilepsia.

Etosuccimida

Etosuccimida fue introducido en la década del 50' para el tratamiento de las crisis de ausencia. El espectro anticonvulsivo de la etosuccimida en animales es comparable al de la trimetadiona. La característica más relevante de ambos fármacos, a dosis no tóxicas, es la protección contra las convulsiones motoras clónicas inducidas por el PTZ. En contraste, a dosis no tóxica, la etosuccimida no inhibe la extensión tónica característica de las convulsiones por electroshock o de las convulsiones de "encendido" o activación inducida. La etosuccimida es más eficaz que la trimetadiona contra las crisis de ausencia y entraña un riesgo más bajo de efectos adversos graves. Esto hace que la etosuccimida sea un compuesto importante en el tratamiento de dicho tipo de epilepsia.



Se puede observar que las estructuras químicas de la mayor parte de los FAEs que aparecieron antes de 1965, guardaban relación estrecha con el fenobarbital (difenilhidantoínas, oxazolodinodionas y succinimidias) mientras que las sustancias que aparecieron después de ese período, eran disímiles.

Otras drogas, derivadas de la fenitoína y del fenobarbital, como *fetenilato*, *benzocloropropamida* y *aminoglutetimida*, se introdujeron al mercado en esa época, pero fueron posteriormente retiradas debido a su toxicidad demostrada a largo plazo.²¹

Luego de 1962, el ente regulatorio de los medicamentos de Estados Unidos (FDA) se volvió más estricto en cuanto a los requerimientos necesarios para que una nueva droga sea incorporada al mercado. No sólo se exigía determinar la seguridad de una droga sino también su eficacia, previa a la comercialización.²² Este factor, junto con la opinión de los médicos de que las mejoras en los tratamientos dependían exclusivamente de un mejor uso de los fármacos ya existentes, ***redujo considerablemente el interés de la industria por el desarrollo de nuevos compuestos.***

Benzodiazepinas.

Como resultado de esta situación, entre 1960 y 1974 un único compuesto, el *diazepam*, fue aprobado para el tratamiento de la epilepsia. Otras drogas desarrolladas por la industria en esa época no lograron ser certificadas por la FDA debido a la falta de pruebas de eficacia adecuadas.

En el caso de las benzodiazepinas (figura 2.4), la mayoría de las estructuras han manifestado propiedades anticonvulsivas amplias, el *clonazepam* y el *clorazepato* se han aprobado en Estados Unidos para el tratamiento a largo plazo de algunos tipos de convulsiones. *El diazepam*, otro de los fármacos perteneciente a esta familia, tiene funciones claramente definidas en la terapéutica del estado epiléptico. En el modelo animal, las benzodiazepinas, se han manifestado como compuestos con mayor protección en las convulsiones inducidas por PTZ que las convulsiones inducidas por el electroshock.

Capítulo 2

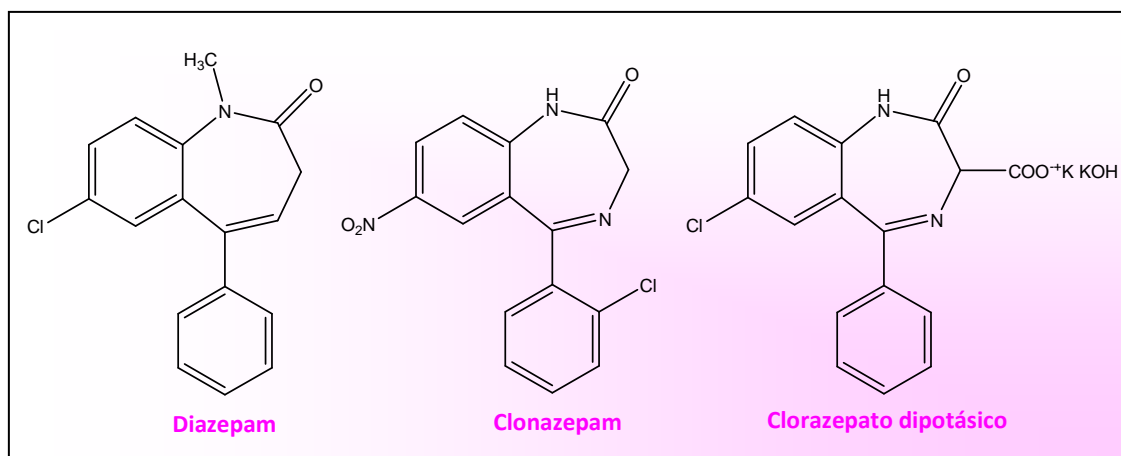


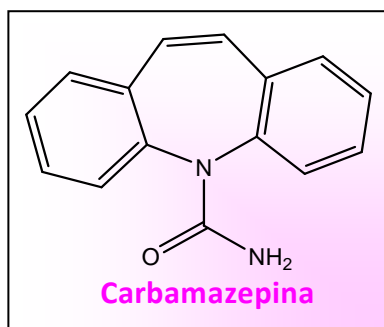
Figura 2.4. Estructuras de benzodiazepinas aprobadas como fármacos antiepilépticos.

El clonazepam es extraordinariamente potente para antagonizar los efectos del PTZ, pero carece casi de acción en las convulsiones inducidas por electroshock. El clonazepam es de utilidad para tratar las crisis de ausencia, lo mismo que las convulsiones mioclónicas en niños. Sin embargo, suele desarrollarse tolerancia, en algunos sujetos, a sus efectos anticonvulsivos después de 1 a 6 meses de administración, los cuales no responden a ninguna posología. Aunque en la actualidad el diazepam es el medicamento preferido para el tratamiento del estado epiléptico, su acción relativamente breve constituye una desventaja. Frente al estado epiléptico, se administra por vía intravenosa o rectal. El clorazepato resulta eficaz para tratar las convulsiones parciales, combinado con otros fármacos antiepilépticos.

Carbamazepina

La Carbamazepina (CBZ) es uno de los fármacos prescritos con mayor frecuencia para el tratamiento de desórdenes neurológicos. Ha sido usado desde los comienzos de los años 60' para pacientes con epilepsia, síndromes de dolor crónico y varios otros desórdenes psiquiátricos. La CBZ se aprobó su uso en los E.E.U.U como anticonvulsivo en 1974. En la actualidad se considera un medicamento de primera opción en clínica para el tratamiento de las convulsiones parciales y tónico-clónicas. La CBZ es un derivado iminodibencil, es un compuesto tricíclico relacionado estructuralmente con los antidepresivos. Los metabolitos activos de la CBZ, en especial su derivado monohidroxilado, producen un bloqueo de canales voltaje

El desarrollo de la carbamazepina fue el resultado de un estudio de la relación estructura-actividad de una serie de anticonvulsivos, derivados iminodibencilos, realizada por laboratorios Geigy a fines de la década de los 50.

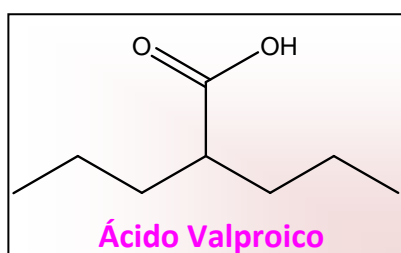


dependientes (sodio, potasio y calcio), resultando en una estabilización de la hiperexcitada membrana neural y acciones en los neurotransmisores sinápticos, de forma que su efecto sea el de la disminución de la propagación de los impulsos sinápticos. Cuando se realiza el tratamiento con este fármaco, deben controlarse las funciones renal, hepática y los datos hematológicos.²³

Ácido Valproico

El Ácido Valproico es la más nueva de las "drogas viejas". El Ácido Valproico (VPA) es uno de los fármacos más ampliamente utilizados en el tratamiento de la epilepsia. Este fármaco posee una estructura de ácido carboxílico de cadena alifática ramificada (ácido-2-propil-pentanóico). Este fármaco es útil tanto para las convulsiones generalizadas como para las convulsiones parciales en adultos y en niños. El VPA fue sintetizado por primera vez

El VPA es un compuesto aceitoso, fue utilizado como solvente, y fue en este contexto que Meurier y col.²⁴ descubrieron sus propiedades antiepilepticas accidentalmente en 1963, cuando fue utilizado como disolvente del producto cuya actividad anticonvulsiva quería evaluarse experimentalmente.



en 1882 por Burton.²⁵ El primer ensayo clínico de la sal sódica del VPA fue reportado en 1964 por Carraz y col. Este fármaco comenzó a comercializarse en el año 1967 en Francia y desde entonces se comercializa en más de 100 países para el tratamiento de la epilepsia.

En el Capítulo 4 se abordará con más detalle las propiedades del VPA, así como también los motivos de la elección de este fármaco para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Fármacos antiepilepticos de Segunda generación

Gracias a que en la década de los años 80 hubo un gran progreso en el conocimiento de la patofisiología de las enfermedades cerebrales y los mecanismos básicos asociados a la actividad de los fármacos, se generaron estrategias para el

Capítulo 2

diseño racional de fármacos basados en los eventos patofisiológicos básicos responsables de la epilepsia.²⁶

El comienzo de una nueva serie de FAEs ocurrió a partir del año 1993, luego de una gran pausa en el desarrollo de los mismos. Esta nueva serie incluye drogas como felbamato, gabapentina, lamotrigina, topiramato, levetiracetam, zonisamida, oxcarbazepina, tiagabina y vigabatrin.

Las estructuras de los FAEs de segunda generación se muestran en la figura 2.5. Excepto la gabapentina y la oxcarbazepina, las estructuras de estas moléculas son novedosas, no derivan de la modificación estructural de una droga preexistente y en su mayoría fueron desarrollados por screening aleatorio. La tiagabina y el vigabatrin fueron desarrollados mediante el diseño racional utilizando como estrategia la modulación del sistema gabaérgico.

Los fármacos de "segunda generación" son prescritos usualmente en combinación con otros fármacos antiepilépticos y son muy utilizadas en epilepsias refractarias.²⁷ Estos compuestos son utilizados actualmente por el 16 % de los pacientes epilépticos que reciben tratamiento con fármacos.²⁸

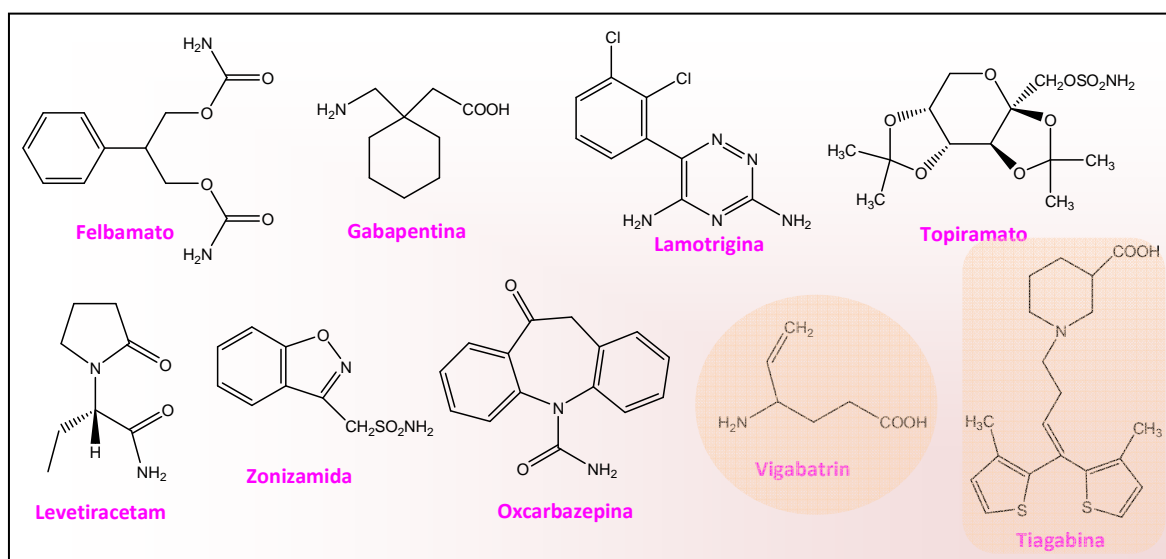
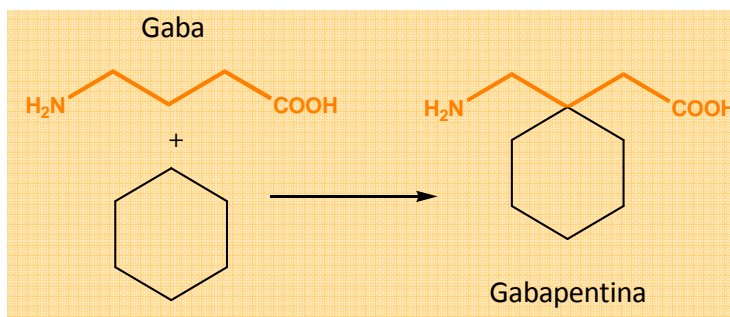


Figura 2.5. Estructuras de fármacos antiepilépticos de segunda generación. El vigabatrin y la tiagabina fueron desarrollados mediante el diseño racional de fármacos.

El Felbamato (FBM, Felbatol®) fue aprobado inicialmente en el año 1993 para tratar las convulsiones parciales en adultos con y sin generalización, y en las convulsiones generalizadas asociadas con el síndrome de Lennox-Gastaut en niños.²⁹ Este fue el primer "Fármaco antiepiléptico novedoso" aprobado desde que se aprobó el Ácido Valproico (1978). Pero debido a sus efectos adversos que se observaron después de su lanzamiento al mercado (1994), como la anemia aplásica

y falla hepática, asociados al uso del FBM se restringió su uso a pacientes con epilepsia severa, quienes no responden adecuadamente a otros fármacos antiepilépticos.³⁰

La Gabapentina (GBP) fue desarrollada a fines de la década de los años 70 como un compuesto relacionado al GABA. Estructuralmente la GBP combina un aminoácido inhibidor, el ácido γ -aminobutírico (GABA) a un anillo ciclohexano. Esta



sustancia se transporta activamente a través del intestino y de la barrera hematoencefálica por el mismo sistema transportador de aminoácidos semejante a L-leucina, L-valina y L-fenilalanina. La GBP actualmente está aprobada en 80 países para el tratamiento de convulsiones parciales.³¹

La Lamotrigina (LTG) fue desarrollada a principios de la década de los 70 a partir de un programa de screening aleatorios en la determinación de la actividad anticonvulsivante de una serie de compuestos que interferían con el metabolismo de folato. La Lamotrigina inhibe los canales de sodio sensibles al voltaje, estabilizando las membranas neuronales y modulando la liberación de transmisores presinápticos de aminoácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato. Este no sería el único mecanismo de acción de la LTG debido a que posee un espectro de acción antiepiléptica mucho más amplio que los anticonvulsivos que solo actúan inhibiendo canales de sodio.³²

El Topiramato (TPM) es un monosacárido derivado del D-enantiómero de la fructosa. El TPM bloquea canales de sodio voltaje dependientes, inhibe la anhidrasa carbónica, actúa como antagonista del receptor del ácido 2-(aminometil)fenilacético (AMPA)/kainato glutamato, inhibe al receptor GABA_A y aumenta la conductancia de algunos tipos de canales de potasio.³³

Así el Topiramato actúa prácticamente en todos los mecanismos involucrados en las crisis epilépticas. Lo cual le confiere la característica de ser un fármaco antiepiléptico de amplio espectro. El Topiramato es ventajoso en su amplio rango de eficacia. Sin embargo, el Topiramato no es preferido como medicamento de primera elección debido a sus potenciales efectos secundarios. Reacciones adversas comunes del Topiramato incluyen disfunción cognitiva. Parestesias de las yemas de los dedos y de los pies pueden ocurrir poco después que se inicia la medicación,

Capítulo 2

hecho probablemente relacionado con la inhibición de la anhidrasa carbónica. Serios efectos adversos incluyen nefrolitiasis en un 1%-5% de los pacientes, disminución de la agudeza visual o dolor ocular, además es un derivado sulfa y está contraindicado en pacientes alérgicos a las mismas.³⁴

El Levetiracetam (LEV) es un novedoso FAE que fue aprobado en 1999 en los Estados Unidos. El Levetiracetam ganó popularidad rápidamente debido a su fácil administración. Con la toma oral de dos veces al día, esta droga alcanza rápidamente, en tres dosis, los niveles terapéuticos necesarios.

El mecanismo de acción del levetiracetam es desconocido. Este no actúa por medio de los receptores típicamente afectados por medicaciones antiepilépticas. La droga se une a una proteína presináptica, SV2A, localizada en las vesículas sinápticas. Esta proteína probablemente está implicada en la fusión vesicular con la membrana presináptica y puede reducir la liberación de neurotransmisores.³⁵

La zonizamida (ZNS) es un fármaco antiepiléptico que ha sido desarrollado en Japón a fines de los años 70 mediante mediante la relación estructura actividad anticonvulsivante de derivados de benzisoxazoles.³⁶

Zonizamida contiene la estructura química de sulfonamida, excluyendo su uso en pacientes alérgicos a las sulfas. Esta produce su efecto anticonvulsivo por el bloqueo de canales de sodio y canales de calcio tipo T, estabilizando membranas neuronales. Aumenta la liberación de GABA, bloquea el ión K^+ evocado por glutamato y reduce la excitación sináptica mediado por glutamato. Zonisamida también posee una débil inhibición de la anhidrasa carbónica, pero esto no contribuye sustancialmente con sus propiedades anticonvulsivas.³⁷

La Oxcarbazepina (OXC) se encuentra registrada en más de 50 países. Esta droga fue desarrollada como una variante estructural de la carbamazepina, diseñada para eliminar el metabolito epóxido de la carbamazepina que causa efectos adversos. Carbamazepina y oxcarbazepina son distintas drogas, con diferentes rutas metabólicas, modos de acción y perfil de efectos adversos. Oxcarbazepina ejerce muchos de sus efectos a través del metabolito 10-monohidroxido (MHD), un metabolito activo que no está presente en la carbamazepina, actuando como profármaco del MHD. Oxcarbazepina bloquea canales de sodio voltaje dependiente estabilizando las membranas neuronales e inhibiendo la liberación de neurotransmisores excitatorios.³⁸

Diseño de Fármacos y Fármacos Antiepilépticos

El Vigabatrin (VGB) y la Tiagabina (TGB) son un ejemplo exitoso del desarrollo de *compuestos miméticos del GABA a través de la aplicación del diseño racional*. La estrategia utilizada en este caso está sustentada en propiciar un aumento de los niveles de GABA, principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro.

Tiagabina ejerce su efecto anticonvulsivante mediante un novedoso mecanismo que implica la inhibición de la recaptación de GABA dentro de las neuronas y la glia. La tiagabina no es prescrita comúnmente. Razones de ello son: la droga no es tan efectiva como otras, experimenta eliminación hepática, se necesitan varias semanas para alcanzar la dosis terapéutica, y puede causar serios efectos adversos. El uso de tiagabina puede causar un incremento de la actividad convulsiva. Nuevos tipos de convulsiones pueden desarrollarse, con un incremento en la incidencia del estatus epiléptico no convulsivo.³⁹

Por su parte el Vigabatrin inhibe irreversiblemente la enzima GABA transaminasa (GABA-T). Por lo tanto el VGB posee la capacidad de inhibición irreversible de la GABA-T encargada de catabolizar el GABA, en consecuencia se incrementa en el SNC el nivel de este neurotransmisor inhibitorio, con lo que origina un bloqueo de la actividad paroxística. No provoca alteración de otros sistemas de neurotransmisión.^{40,41.}

Tabla 2.2. Propiedades de los fármacos anticonvulsivantes de segunda generación

Fármaco	Vida Media	Mecanismo de acción	Eliminación	Efectos en enzimas hepáticas	Efectos Adversos
Felbamato	20-23 h	Antagonista del sitio de glicina en el receptor NMDA	Renal y hepática	Inducción e Inhibición	Riesgo de anemia aplásica, falla hepática y alergia.
Gabapentina	4-6 h	Desconocido, puede estar relacionado con los canales de calcio voltaje activados	Renal	Ninguno	Ninguno
Oxcarbazepina	4-9 h	Bloqueo de canales de sodio; posible contribución del efecto en canales de potasio y calcio.	Renal y hepática	Mínima inducción e inhibición de algunos subtipos	Reacción cruzada de hipersensibilidad a carbamazepina; riesgo de hiponatremia.

Capítulo 2

Zonizamida	24-60 h	Bloqueo de canales de sodio y calcio.	Hepática más que renal	Ninguno	No debe usarse en pacientes alérgicos a las sulfas o con antecedentes de nefrolitiasis.
Levetiracetam	6-8 h	Unión a proteína SV2A de la vesícula sináptica y a canales de calcio de alto voltaje, modulación de los receptores de GABA y glicina.	Renal, hidrólisis.	Ninguno	Riesgo de efectos adversos psiquiátricos.
Topiramato	15-23 h	Bloqueo de canales de sodio voltaje dependientes, inhibición de la Anhidrasa carbónica, antagonista receptor AMPA/kainato glutamato, modula la actividad GABA _a mediada por cloruros.	Renal más que hepática.	Inducción e Inhibición	No debe usarse en pacientes alérgicos a las sulfas o con antecedentes de nefrolitiasis. Efectos adversos potenciales incluyen deterioro cognitivo, glaucoma de ángulo abierto, acidosis metabólica, pérdida de peso.
Lamotrigina	15-35 h	Relacionada con la inhibición de canales de sodio sensibles al voltaje.	Hepática	Mínima inducción	Riesgo de alergia, particularmente con el uso concurrente de valproato.
Tiagabina	4-9 h	Inhibición de la recaptación de GABA	Hepática	Ninguna	Riesgo de actividad convulsiva
Vigabatrin	4-6 h	inhibe irreversiblemente la enzima GABA transaminasa (GABA-T)	Renal	Ninguna	Reducción concéntrica del campo visual. Efectos adversos menores como somnolencia, apatía, irritabilidad.

Nuevos fármacos antiepilépticos y fármacos antiepilépticos que son segunda generación de fármacos antiepilépticos ya existentes.

En la última década sólo cuatro nuevos fármacos han sido aprobados para su uso en clínica: Pregabalina en el año 2005, Rufinamida en el año 2007, Lacosamida aprobada en el 2008 y Acetato de Eslicarbazepina que fue aprobada en el año 2009. La Rufinamida y Lacosamida son fármacos antiepilépticos con estructuras químicas novedosas, no relacionadas estructuralmente con fármacos antiepilépticos existentes (figura 2.6), la lacosamida es un derivado quiral del aminoácido D-serina. Aún no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de estos fármacos, en clínica la rufinamida exhibe un amplio espectro de actividad anticonvulsiva y es utilizada como terapia de soporte en crisis parciales. Por su parte la lacosamida se utiliza en el tratamiento de las crisis parciales en adultos y exhibe otras actividades ya que es utilizada en el tratamiento del dolor neuropático diabético, fibromialgia y en profilaxis de migrañas.⁴²

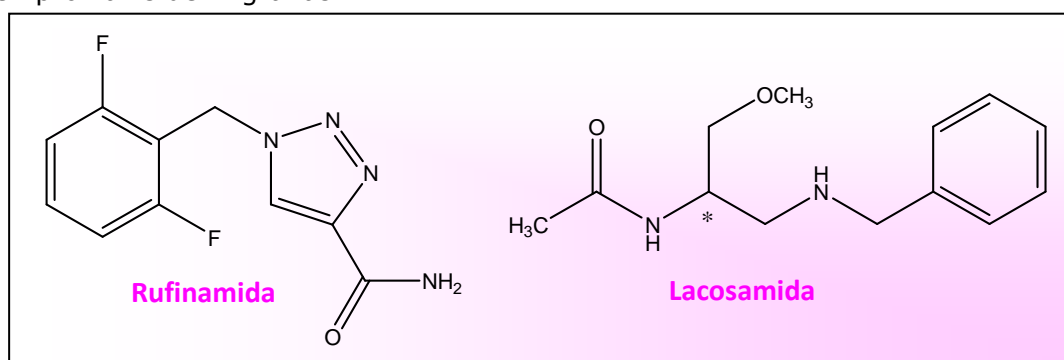
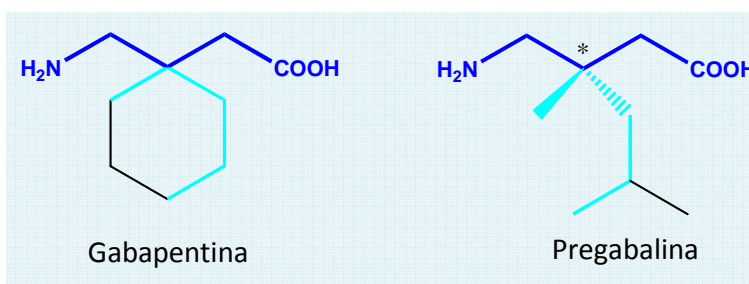


Figura 2.6. Estructuras de los compuestos Rufinamida y Lacosamida

Es interesante notar que dos de estos cuatro nuevos fármacos, la Pregabalina y el Acetato de Eslicarbazepina son derivados o análogos de FAEs existentes y pueden ser llamados *fármacos de segunda generación de fármacos antiepilépticos ya establecidos*.

La **pregabalina** es estructuralmente similar al gabapentin pero posee un mayor tiempo de vida media. A pesar de estar estructuralmente relacionada al ácido gamma amino butírico (GABA), esta droga no posee actividad GABA-érgica. La Pregabalina



Capítulo 2

se une a la subunidad alfa₂-delta de canales de calcio voltaje operados, reduciendo el influjo de calcio y debido a ello disminuye la liberación de varios neurotransmisores, incluyendo el glutamato.

La experiencia clínica de este fármaco no es muy amplia, ya que ha sido aprobado su uso hace solo cinco años atrás. Es frecuentemente indicada para tratamientos adicionales de convulsiones de inicio parcial en adultos, y en el tratamiento del dolor neuropático periférico.⁴³ La pregabalina es más potente que la gabapentina en los modelos preclínicos de epilepsia y posee una biodisponibilidad oral mucho mayor que esta. Esta droga es razonablemente bien tolerada a dosis iniciales de 600 g/día, sin embargo muchos pacientes sufren vértigo a dosis iniciales por encima de los 100-150 mg/día. La pregabalina se excreta renalmente, por ello es adecuada para pacientes con enfermedades hepáticas. No posee inducción o inhibición de enzimas hepáticas, lo cual es ventajoso ya que posee poco riesgo de interacción con otras medicaciones.⁴⁴

El **Acetato de Eslicarbazepina** (ESL) es la "tercera generación" de una familia de primera línea de FAEs representada por la carbamazepina (primera generación) y la oxcarbazepina (segunda generación). Como puede observarse de la estructura de ESL en la figura 2.7, ésta es un profármaco de la Licarbazepina (metabolito monohidroxilado de la carbamazepina) que es la entidad responsable de los efectos farmacológicos.

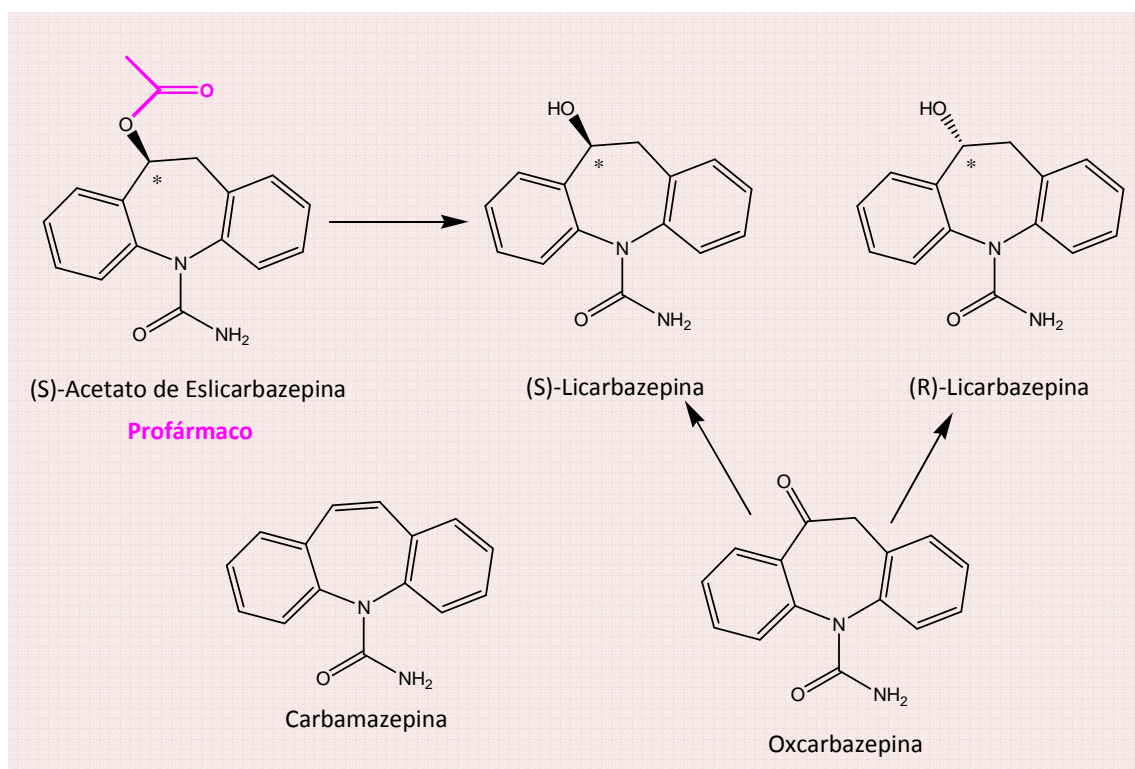


Figura 2.7. Estructuras derivadas de la Carbamazepina.

Estructuralmente la ESL comparte con la carbamazepina y oxcarbazepina el núcleo dibenzazepino con el sustituyente 5-carboxamida, pero es estructuralmente diferente en la posición 10,11. Esta variación molecular resulta en diferencias en el metabolismo lo cual le confiere al ESL mejor tolerabilidad por la disminución de efectos adversos y facilidad en la administración (dosis única por día).

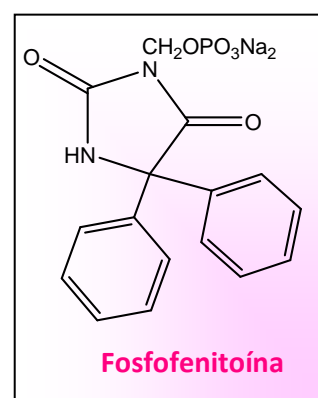
Así Oxcarbazepina es un compuesto mejorado de segunda generación de la carbamazepina ya que no es susceptible al metabolismo al cual es sometida la carbamazepina y esto resulta en una disminución de efectos adversos y de interacciones con otros fármacos. Sin embargo la oxcarbazepina no actúa como fármaco en sí mismo, sino mayormente como un profármaco de la licarbazepina, al igual que el acetato de eslicarbazepina, un profármaco de tercera generación de esta familia.

Nuevas formulaciones de Viejos Fármacos establecidos.

En la última década se dispusieron nuevas formulaciones de viejos fármacos que permiten tener más aceptación de los pacientes, tener horarios de dosificación más convenientes y poseer menores efectos adversos que la formulación original.

Fosfofenitoína

La Fosfofenitoína (Cerebyx®) es un *Profármaco* soluble en agua de Fenitoína. Ésta se convierte rápidamente en fenitoína, in vivo mediante las enzimas fosfatasa presentes en el hígado y en las células rojas de la sangre.⁴⁵ El tiempo medio de esta conversión es de 8-15 minutos y es independiente de las concentraciones plasmáticas de fosfofenitoína o fenitoína. Entonces, una vez introducido en el organismo, las propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y clínicas de la fosfofenitoína son idénticas a la fenitoína. Comparada con la fenitoína intravenosa, la fosfofenitoína ofrece un aumento de la flexibilidad y tolerabilidad. La fenitoína posee muy poca solubilidad en agua, para que pueda ser administrada intravenosa como tal, ésta debe disolverse en 40 % de propilenglicol y 10 % de etanol a pH 12. Esto requiere de una lenta infusión y frecuentemente el vehículo produce tromboflebitis, y puede contribuir a generar hipotensión y bradicardia. La fenitoína administrada por vía



Capítulo 2

intramuscular ocasiona un severo dolor, puede producir abscesos muscular estéril y es absorbida lenta e inciertamente. Todos estos problemas fueron resueltos con el desarrollo del profármaco fosfofenitoína.⁴⁶

La Fosfofenitoína está indicada para el tratamiento de adultos con convulsiones parciales o generalizadas donde sea indicada la administración parenteral. Como la fosfofenitoína se convierte rápidamente en fenitoína, su mecanismo de acción anticonvulsivante es el mismo que la fenitoína: inhibe canales de sodio sensibles al voltaje.

En la siguiente Tabla 2.3 se muestra una comparación de los dos fármacos.

Tabla 2.3 Comparación entre Fosfofenitoína y Fenitoína^a

	Fosfofenitoína	Fenitoína
Vía de Administración	i.v o i.m.	Sólo i.v.
Máxima velocidad de infusión i.v.	150 mg PE/min	50 mg/min
Tiempo en alcanzar la máxima concentración sérica	20 min	20 min
Efectos adversos	Irritación, parestesias, ataxia, somnolencia, mareo, hipotensión.	Dolor en el sitio de aplicación, quemaduras, flebitis, mareos, ataxia, somnolencia, hipotensión.
Solución compatible i.v.	Dextrosa o Salina	Salina.

^a i.v., intravenosa; i.m., intramuscular; PE, equivalentes de fenitoína.

Carbamazepina de Liberación Sostenida (Tegretol-XR®)

La Carbamazepina es un fármaco de primera elección en el tratamiento de convulsiones parciales y secundarias generalizadas tónico-clónicas. Sin embargo, su uso presenta inconvenientes debido a su corta vida media, por lo cual se requiere tomar una dosis tres o cuatro veces al día. Además, los niveles plasmáticos pueden fluctuar dando picos más importantes que resulten en un incremento de la frecuencia de sus efectos adversos y la inhabilidad de mantener concentraciones plasmáticas suficientes para controlar las convulsiones constantemente.⁴⁷

La formulación de Liberación Sostenida utiliza la tecnología de sistema oral de liberación osmótica (OROS®, del inglés Oral Osmotic Delivery System). Éste facilita la liberación continua del fármaco y da lugar a concentraciones plasmáticas

constantes de carbamazepina logrando un mejor perfil en el manejo de efectos secundarios. Mediante esta formulación se logra disminuir el número de tomas a sólo dos veces al día.⁴⁸

Ácido Valproico de Liberación Prolongada.

Abbott Laboratories desarrollo comprimidos de liberación prolongada de Ácido valproico bajo la forma de Divalproex sódico, (Depakote® ER). Ésta consiste en una matriz polimérica diseñada para la administración de una toma por día con respecto a la formulación del Depakote convencional.⁴⁹

Supositorios de Diazepam

Las benzodiazepinas son utilizadas como el principal tratamiento de emergencia en una convulsión aguda. El diazepam o el lorazepam se aplican intravenosamente cuando el paciente está en el hospital, cuando se administran benzodiazepinas a un paciente con estatus epiléptico después de que el paciente llega al hospital, disminuye significativamente la duración de la convulsión y la probabilidad de recurrencia de la misma. Los estudios demuestran que no existe diferencia en la eficacia entre la vía de administración intravenosa y rectal. Esta nueva formulación de diazepam puede ser administrada por un enfermero o cuidador a muchos pacientes con epilepsia refractaria o convulsiones frecuentes de forma aguda cuando sufran una crisis.⁵⁰

Fármacos en desarrollo

Según el último reporte de la EILAT IX, la cual es un resumen de las conferencias sobre nuevos fármacos antiepilépticos,⁵¹ los fármacos más promisorios que se encuentran en fase preclínica o clínica de desarrollo son: brivaracetam, carisbamate, 2-deoxy-D-glucose, ganaxolone, huperzine, JZP-4, propylisopropylacetamide, retigabine, T-2000, tonabersat y valroceamide. En la figura 2.8 se presentan las estructuras de estos compuestos.

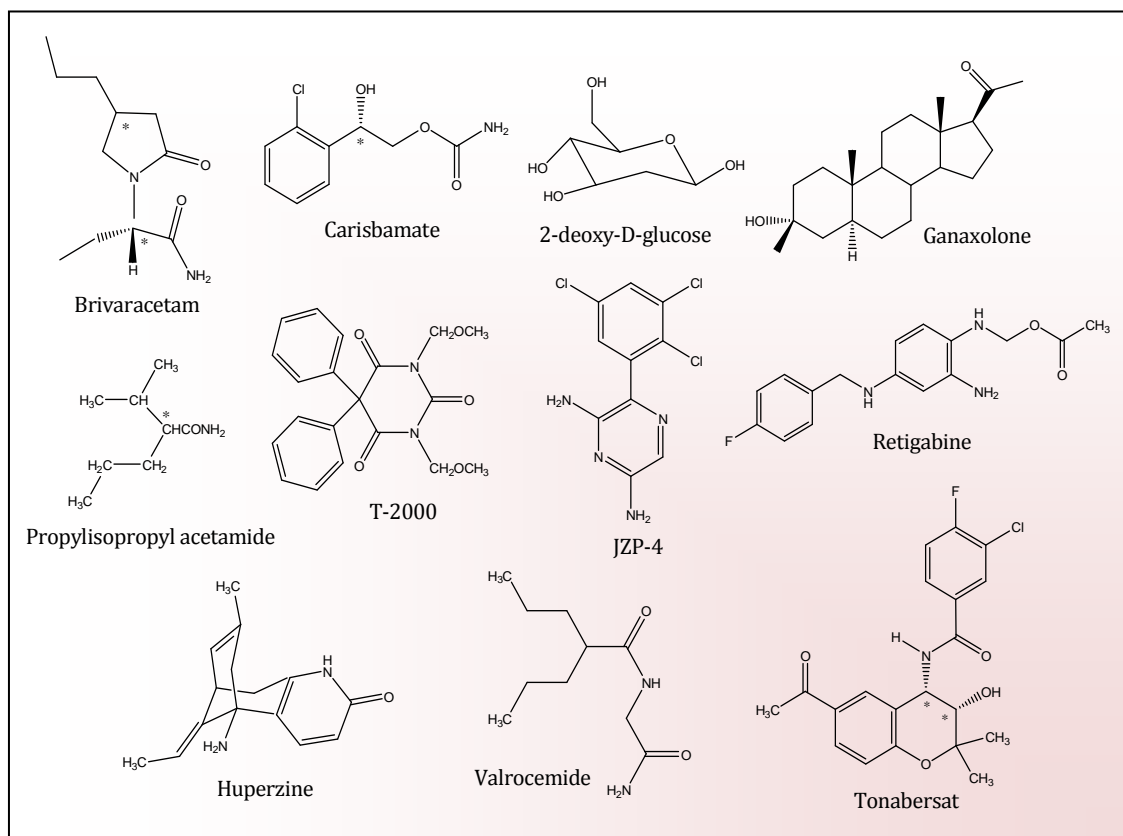


Figura 2.8. Estructuras de los antiepilépticos en desarrollo según el último EILAT IX.

Como puede observarse de las estructuras químicas, varios de estos fármacos en desarrollo, entre ellos el brivaracetam y JZP-4 están relacionados estructuralmente con fármacos antiepilépticos de segunda generación, el levetiracetam y lamotrigina respectivamente. El T-2000 es un profármaco del ácido 5,5-difenilbarbitúrico, miembros de una clase de drogas que han sido utilizadas por más de cien años como hipnóticos. Dos de las estructuras más novedosas son la retigabine y el ganaxalone debido a que poseen mecanismos de acción innovadores. Hay que destacar que tanto la valrocecimide como la propylisopropyl acetamide son derivados del ácido valproico, uno de los fármacos antiepilépticos que tiene casi 50 años de uso en clínica.

Esto nos muestra que los nuevos anticonvulsivantes son descubiertos a través de screening convencionales y/o modificaciones estructurales más que por un mecanismo de diseño racional conducido.

¿Son los nuevos fármacos antiepilépticos superiores a los fármacos antiepilépticos tradicionales?

Se generó mucho entusiasmo con la llegada de nuevos fármacos antiepilépticos, considerando especialmente el número de pacientes quienes tomaban combinaciones de fármacos antiepilépticos tradicionales y continuaban teniendo frecuentemente convulsiones acompañadas con intolerables efectos adversos.

A pesar de carecer de estudios clínicos que comparen, los nuevos y los tradicionales fármacos antiepilépticos, hay evidencia que sugiere algunas ventajas de los nuevos agentes. Gabapentina, Lamotrigina y Oxcarbazepina ha sido comparado cada una con Carbamazepina como monoterapia en convulsiones parciales y se ha encontrado tener mejor tolerabilidad, a pesar de no haber diferencias en cuanto a eficacia. Lamotrigina, Topiramato y Zonizamida han demostrado tener un amplio espectro de actividad con eficacia en convulsiones generalizadas así como también en convulsiones de inicio parcial, mientras que el Valproato era la única droga tradicional con este espectro de actividad. La mayoría de los nuevos fármacos antiepilépticos carecen de inducción de enzimas hepáticas y han mostrado no poseer interacción con otros medicamentos metabolizados hepáticamente al contrario de Fenobarbital, Fenitoína y Carbamazepina. Finalmente sólo Felbamato y Lamotrigina han demostrado poseer efectos adversos con potencial riesgo de vida, los cuales han sido documentados con Fenitoína, Carbamazepina y Valproato. Sin embargo, las nuevas medicaciones antiepilépticas, son significativamente más costosas que las drogas tradicionales y estudios específicos no muestran evidencias de superar costo-efectividad.⁵²

Capítulo 2

Conclusiones

Es probable que los Fármacos antiepilépticos de segunda generación de fármacos ya existentes actúen por un mecanismo de acción similar a sus compuestos de partida y esto no proporcione ningún incentivo de un nuevo mecanismo de acción. Sin embargo esta desventaja puede importar menos que la ventaja de poseer extensiva información acerca de la farmacocinética, problemas de toxicidad y farmacodinámicos asociados con su compuesto madre. Además el diseño de fármacos antiepilépticos de segunda generación representa un riesgo económico menor para la industria que el desarrollo de una entidad química completamente nueva con un nuevo mecanismo de acción.

El desarrollo de nuevos compuestos antiepilépticos con mayor selectividad y baja toxicidad sigue siendo un área importante de investigación en química medicinal. Un proceso de diseño racional de nuevos anticonvulsivos puede ser desarrollado de diferentes formas. La primera estrategia es la identificación de nuevos blancos de acción a través del conocimiento de los mecanismos moleculares de la epilepsia. Otra estrategia es modificar los fármacos y formulaciones ya existentes.⁵³ *Debido a que la mayoría de las drogas recientemente introducidas conservan significativos efectos nocivos, son los fármacos de primera generación, tales como el ácido valproico y la carbamazepina, a las cuales se aplica la estrategia de investigación de nuevos compuestos relacionados estructuralmente.*

Referencias del Capítulo 2

1. Escalona Arranz, J.C.; Carrasco Velar, R.; Padrón García, J.A. *Introducción al diseño racional de fármacos*. Ed. Universitaria, **2008**, Ciudad de La Habana.
2. Roberts, R.R., En *Serendipity. Accidental Discoveries in Science*. Wiley Science eds.; John Wiley & Sons Inc., New York, **1989**.
3. Patani, G.A.; LaVoie, E.J., *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 3147-3176.
4. Patrick G.L., Chapter 9: Drug design and drug-target interactions, En: *An Introduction to Medicinal Chemistry.*, 2nd Ed., Oxford University Press, New York, **2001**, 191.
5. Erlenmeyer, H.; Leo, M., *Helv. Chim. Acta*, **1932**, 15, 1171.
6. Hopfinger, A.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 7196.
7. Cerqueira Lima, P.; Golbraikh, A.; Oloff, S.; Xiao, Y.; Tropsha, A., *J. Chem. Inf. Model.*, **2006**, 46, 1253.
8. Patrick G.L., Chapter 13: Computers in Medicinal Chemistry, En: *An Introduction to Medicinal Chemistry.*, 2nd Ed., Oxford University Press, New York, **2001**, 379-374.
9. Kuntz, I.D. *Science.*, **1992**, 257, 1078.
10. Moon, J.B.; Howe, W.J., *Proteins*, **1991**, 11, 314.
11. Böhm, H.J., *J. Comput. Aided Mol. Design.*, **1992**, 6, 61-78.
12. Roche, O.; Schneider, P.; Zuegge, J.; Guba, W.; Kansy, M.; Alanine, A.; Bleicher, K.; Danel, F.; Gutknecht, E.-M.; Rogers-Evans, M.; Neidhart, W.; Stalder, H.; Dillon, M.; Sjögren, E.; Fotouhi, N.; Gillespie, P.; Goodnow, R.; Harris, W.; Jones, P.; Taniguchi, M.; Tsujii, S.; Von der Saal, W.; Zimmermann, G.; and Schneider, G., *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 137-142.
13. Drews, J. *Science*, **2000**, 287, 1960-1963.
14. Graul, A.I.; Sorbera, L.A.; Lozzo, J.; Serradell, N.; Level, L.; Prous, J.R., *Drug News. Perspect*, **2007**, 20, 17-44.
15. Steinhoff, B.J.; Kruse, R., *Brain Dev*, **1992**, 14, 144-149.
16. *Epilepsy Research*, **2009**, 83, 1-43.
17. Lennox, W.G., *JAMA*, **1945**, 129, 1069-1074.
18. Carl, W.; Bazil, M.D.; Pedley, T.A.; *Annu. Rev. Med.*, **1998**, 49, 135-162.
19. Arzimanoglou, A.; Ben-Menachem, E.; Cramer, J.; Glauser, T.; Seeruthun, R.; Harrison, M., *Epileptic Disord.*, **2010**, 12, 3-15.
20. Hauptmann, A., *Med. Wochenschr.*, **1912**, 59, 1907-1909.
21. Porter, R.J.; Cereghino, J.J.; Gladding, G.D.; Hessie, B.J.; Kupferberg H.J., Scoville, B.; White, B. G., *Clev. Clin. Q.*, **1984**, 51, 293.

Capítulo 2

22. *Drug Amendments Act*, Public Law, **1962**, 21 USC 355, EEUU, 87-781.
23. Rogawski M.A.; Porter, R.J., *Pharmacol. Rev.*, **1990**, 42, 223-286.
24. Meunier, H.; Carraz, G.; Meunier, Y.; Eymard, P.; Aimard, M., *Thérapie.*, **1963**, 18, 435-438.
25. Burton, B.S., *J. Am. Chem*, **1882**, 3, 385-395.
26. Mutani, R.; Cantello, R.; Gianelli, M.; Bettucci, D., *Epilepsy Res. Suppl.*, **1991**, 3, 23-28.
27. Brenner, G.M.; Stevens, C.W., *Antiepileptics drugs*. In: Pharmacology. Philadelphia, 2d ed, Elsevier eds., **2006**; 209-220.
28. Fisher, R.; Vickrey, B.G., Gibson, P., Hermann, B., Penovich, P., Scherer, A., Walker, S., *Epilepsy Res.*, **2000**, 41, 53.
29. Felbamate Study Group in Lennox-Gastaut Syndrome. Efficacy of felbamate in childhood epileptic encephalopathy (Lennox-Gastaut Syndrome). *N. Engl. J. Med.*, **1993**, 328, 29-33.
30. Sachdeo, R., Kramer, L.D.; Rosenberg, A.; Sachdeo, S., *Ann Neurol.*, **1992**, 32, 386-392.
31. Taylor, C.P., 2002. Gabapent: mechanism of action. In: Levy, R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S., Perucca, E. (Eds.), *Antiepileptic Drugs*, fifth ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 322—334.
32. Stratton, S.C.; Large, C.H.; Cox, B.; Davies, G.; Hagan, R.M., *Epilepsy Res.* **2003**, 53, 95-106.
33. White, H.S.; Brown, D.; Skeen, G.A.; *Epilepsia*, **1995**, 36, 39-40
34. Wasserstein, A.G.; Rak, I.; Reife, R.A.; *Epilepsia*, **1995**, 36, (Suppl. 3):S153.
35. Lynch, B.A.; Lambeng, N.; Nocka, K.; Kensel-Hammes, P.; Bajjellieh, S.M.; Matagne, A.; Fuks, B.; *Proc. Natl. Acad.*, **2004**, 101, 9861—9866.
36. Seino, M.; Miyazaki, H.; Ito, T. Zonisamide. *Epilepsy Res. Suppl.* **1991**, 3, 169-174.
37. Macdonald, R.L.; Duche, B. Zonisamide-mechanisms of action. In: Levy, R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S., Perucca, E. (Eds.), **2002**. *Antiepileptic Drugs*, fifth ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 867-872.
38. Malean, M.J.; Schmutz, M.; Wamil, A.W.; Olpe, H.R.; Portet, C.; Feldmann, K.F., *Epilepsia*, **1994**, 35, S5-9.
39. Uthman, B.M.; Rowan, A.J.; Ahmann, P.A., *Arch. Neurol*, **1998**, 55, 56–62.
40. Jung, M.J.; Palfreyman, M.G.; Vigabatrin. Mechanisms of action. In Levy, R. H.; Mattson, R.H.; Meldrum, B.S. eds. *Antiepileptic drugs*. 4ed. New York: Raven Press; **1995**, 903-913.
41. Rho, J.M.; Donevan, S.D.; Rogawski, M.A., *Ann Neurol*, **1994**, 36, 677-678.

42. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson, T. *Epilepsy Research*, **2007**, 73, 1-52.
43. French, J.A.; Kugler, A.R.; Robbins, J.L., *Neurology*, 2003, 60, 1631-1637.
44. Bialer, M. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2006**, 15, 637-647.
45. Browne, T.R.; Davoudi, H.; Donn, K.H., *Epilepsia*, **1989**, 30, 527-532.
46. Leppik, I.E.; Boucher, B.A.; Wilder, B.J.; Murthy, V.S.; Watridge, C.; Graves, N.M.; Rangel, R.J.; Rask, C.A.; Turlapaty, P., *Neurology*, **1990**, 40, 456-460.
47. Riva, R.; Albani, F.; Ambrosetto, G.; *Epilepsia*, **1984**, 25, 476-481.
48. Cramer, J.A.; Mattson, R.H.; Prevey, M.L., *JAMA*, **1989**, 261, 3273-3277.
49. Dutta, S.; Zhang, Y.; Selness, D.S.; Lee, L.L.; Williams, L.A.; Sommerville, K. W., *Epilepsy Res.*, **2002**, 49, 1-10.
50. Bazil, C.W.; Pedley, T.A.; *Annu. Rev. Med.*, **1998**, 49, 135-162.
51. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson, T.; White, H.S. *Epilepsy Research*, **2009**, 83, 1-43.
52. LaRoche, S. M.; Helmers, S. L., *JAMA*, **2004**, 291, 605-614.
53. Malawska, B. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2005**, 5, 69-85.

Capítulo 3

Profármacos

Introducción

A pesar de los esfuerzos y recursos que las compañías farmacéuticas y la academia han realizado para el desarrollo de nuevas entidades químicas (NEQ), recurriendo para ello a la utilización de diferentes procesos racionales, muy pocas de estas NEQ han logrado convertirse en fármacos útiles en clínica, debido particularmente a las interacciones impredecibles que han presentado con el sistema biológico.

Un estudio realizado con el objeto de identificar y cuantificar estos esfuerzos, dio como resultado que el 40 % de un grupo de 300 NEQ investigadas en humanos no llegan a cumplir con las tres fases clínicas y son retiradas sin llegar al mercado debido a serios defectos en su farmacocinética que se refleja, por ejemplo, en una pobre absorción oral, un extensivo metabolismo de primer paso, una desfavorable distribución o unión a proteínas plasmáticas, o una combinación de ellas entre otras causas. En el *Gráfico 3.1* se esquematizan proporcionalmente las razones de fallas en el diseño de fármacos evaluados en clínica.¹ Esto enfatiza la necesidad de entender los factores principales que afectan la farmacocinética versus la lipofilicidad del fármaco y su solubilidad.

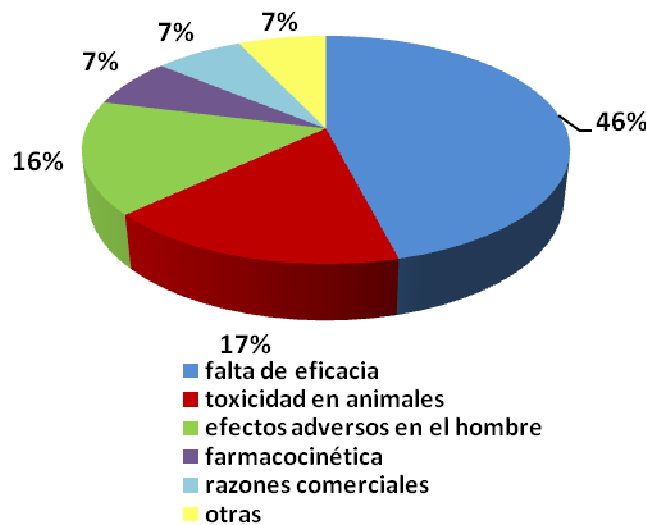


Gráfico 3.1. Razones de fallas en el diseño de Fármacos.¹

El diseño de **profármacos** ofrece una alternativa válida para incorporar a la terapéutica aquellos compuestos que por alguna causa no pudieron pasar las fases clínica I, II o III, o que habiéndolas pasado, en el posterior uso, se observan efectos adversos o limitaciones en la clínica. Es decir rescatar a estructuras activas en los modelos biológicos pero que presentaron inconvenientes en el uso en humanos. Esta problemática puede abordarse mediante modificaciones químicas

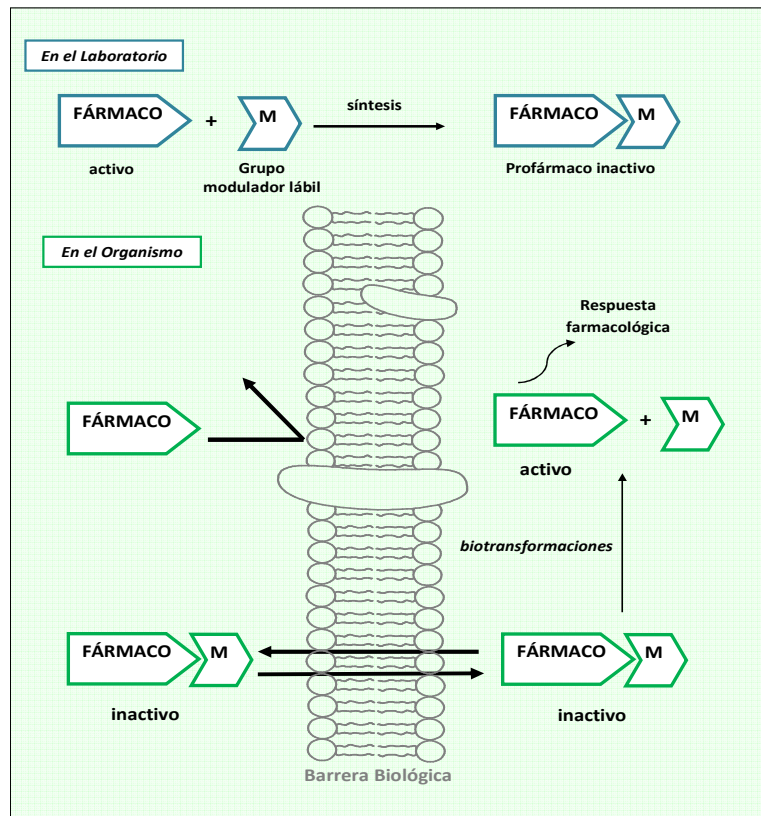
Capítulo 3

que le permitan aumentar la actividad terapéutica y superar además las limitaciones asociadas a las características físicas y químicas indeseables.

¿Qué es un Profármaco?

El término "Profármaco" fue introducido por primera vez en 1958 por Adrien Albert,² quien describió a los profármacos como compuestos farmacológicamente inactivos que necesitaban experimentar biotransformaciones para poder producir los efectos farmacológicos.

En el *Esquema 3.1* se representa gráficamente el proceso teórico mediante el cual se sintetiza en el laboratorio el profármaco, a la vez se esquematiza la metabolización que sufre este para que el compuesto farmacológicamente inactivo *in vitro* derive en el fármaco activo. Los profármacos son convertidos al fármaco activo en el organismo (*in vivo*) a través de reacciones que pueden ser tanto enzimáticas como no enzimáticas. Los profármacos son estructuras nuevas diseñadas por los químicos medicinales quienes haciendo uso de los conocimientos de las reacciones metabólicas las aplican en su diseño, orientado a la maximización de la eficacia del fármaco activo, con el objeto de superar problemas farmacocinéticos, tóxicos, de formulación y administración por medio de "cambios estructurales, los que traen aparejado modificaciones en sus propiedades fisicoquímicas".



Esquema 3.1. Esquema teórico de la Síntesis del profármaco y su biotransformación en el organismo

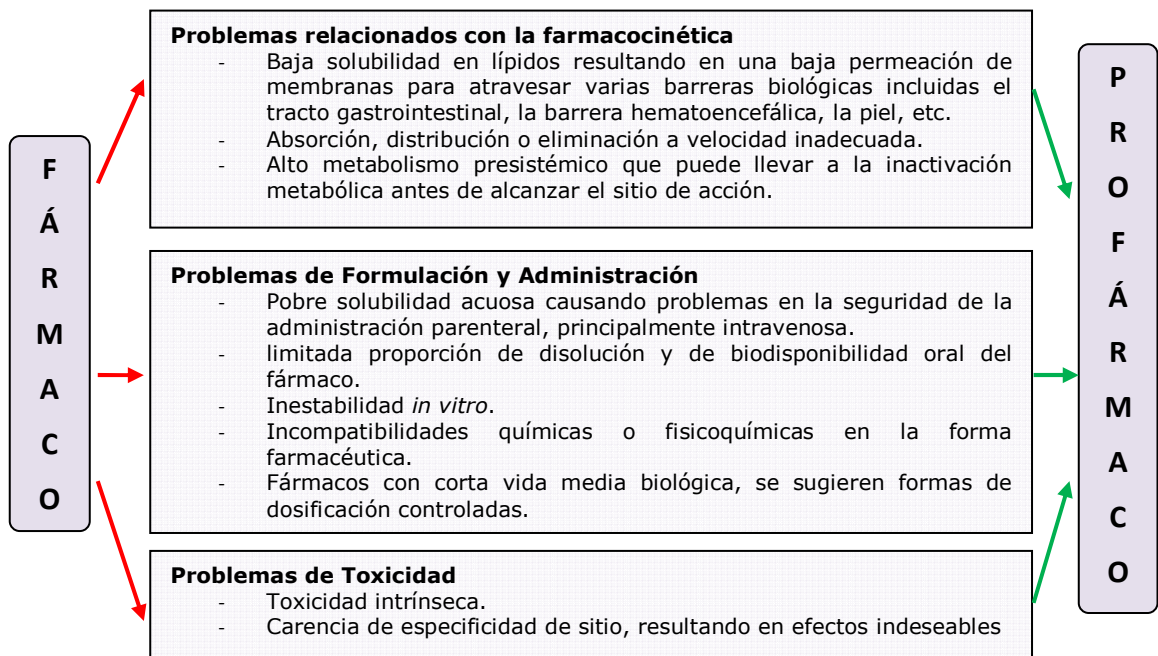
Glosario de términos utilizados en Química Medicinal

Un **profármaco** es cualquier compuesto que experimente biotransformación antes de exhibir sus efectos farmacológicos.

Los **profármacos** pueden verse como fármacos que contienen grupos protectores no tóxicos especializados, utilizados de manera transitoria para alterar o para eliminar características indeseables del fármaco de partida.

Doble profármaco o Pro-profármaco: Un doble profármaco es una molécula biológicamente inactiva la cual es transformada *in vivo* en dos pasos (enzimáticamente y/o químicamente) en especies activas.

Muchas de las fallas presentes en los fármacos, como se esquematiza en el *Esquema 3.2* son problemas vinculados a la farmacocinética, farmacotécnica y a los metabolitos tóxicos generados, los que pueden ser solucionados utilizando el diseño de profármacos.



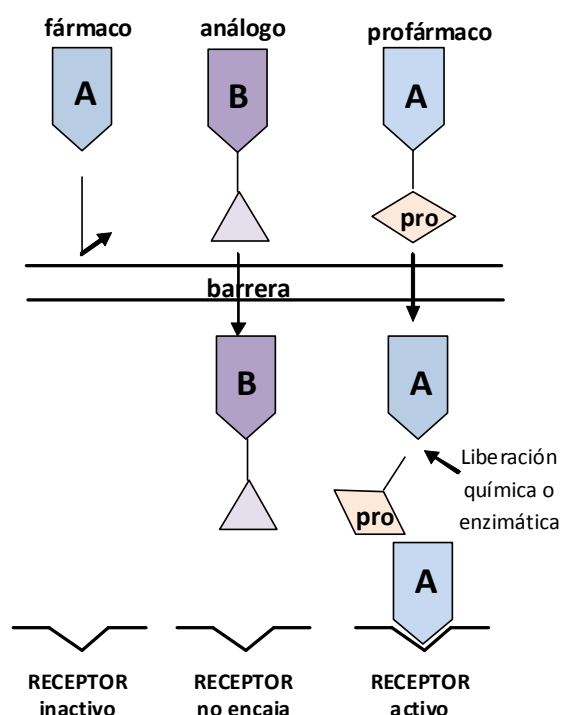
Esquema 3.2. Problemas que limitan la utilización de un fármaco que pueden resolverse con el diseño de profármacos.

Capítulo 3

En el desarrollo y descubrimiento de fármacos, como se introdujo en el Capítulo 2, la química medicinal se vale de numerosas metodologías. Lipinski y colaboradores³ notaron que el incremento en la complejidad y tamaño promedio de la molécula "fármaco" resulta en agentes que no llegan al sitio de acción, mientras que Veber⁴ y colaboradores observaron que el número de enlaces rotables también era importante. Con el aumento de tamaño, se incrementa el número de grupos donores y/o aceptores de hidrogeno, aumenta el valor de Log P, aumenta el número de enlaces rotables que ocasiona una disminución de la solubilidad en agua, se incrementa la unión a proteínas, y hay una alta probabilidad de que los compuestos sufran una rápida eliminación mediante metabolización o excreción por vías biliares. La *regla de los 5* de Lipinski³ determina que las estructuras más propensas a presentar problemas de solubilidad y/o permeabilidad son las que poseen:

- valores de log P mayores a 5
- pesos moleculares mayores a 500
- más de 5 grupos donores de enlaces hidrógeno (expresados como la suma de grupos NH y OH)
- más de 10 grupos aceptores de enlaces de hidrogeno (expresados como la suma de átomos de N y O)

A través de los profármacos, las modificaciones lábiles generadas en las moléculas resultan en propiedades adecuadas para que el fármaco ejerza su acción. Esto produjo que la academia y la industria farmacéutica hayan redescubierto los profármacos y que esta técnica comience a ser una parte integral del paradigma del descubrimiento de nuevos y más eficaces medicamentos. La evidencia más fuerte de esta conclusión es el incremento en el porcentaje de fármacos aprobados por la FDA en estos últimos años y muchos de los cuales son profármacos.



Esquema 3.3. Ilustración utilizada por Ferres⁵ para mostrar las diferencias potenciales entre un análogo y un profármaco en la actividad del receptor del fármaco.

La utilidad de esta técnica es incuestionable. Stella, V.J.⁶ hace notar que de un total de 43 nuevos fármacos aprobados por la FDA en el año 1993, 8 fármacos, o sea un 19% de ellos eran profármacos. Una evaluación sobre nuevas drogas aprobadas en el periodo 2001-2002, informa que de un total de 49 fármacos, 11 son profármacos (1 de estas nuevas entidades es un profármaco blando), observándose un *incremento del 20-22 % correspondiente a la categoría de profármacos*.

Estos números son sorprendentemente altos. La importancia que está adquiriendo en los proyectos de investigación y desarrollo el tema de los profármacos puede observarse en otro trabajo de Stella, V.J.⁷ "Produgs as Therapeutics", en el cual se analiza el patentamiento de profármacos en un periodo de 10 años, desde 1993 al 2003. Este informe es el resultado de la búsqueda de patentes aprobadas, siendo el criterio de selección de las mismas, la búsqueda por palabras claves que figuraran en el texto como : "profármaco", "derivados biorreversibles" o términos derivados de ellos, identificándose para dicho periodo 1396 patentes que contenían estas palabras claves.

En la siguiente *Tabla 3.1* se muestra el porcentaje de desarrollo de Patentes de Profármacos (1993-2003) divididos en áreas terapéuticas.

Área Terapéutica	% Patentes de Profármacos (1993-2003)
Cáncer	36.8
Objetivos definidos	14.9
Inmunología	10.3
Inflamación	17.6
Antimicrobianos (excluidos antivirales)	10.0
Antivirales	12.6
Sistema Nerviosa Central (SNC)	18.7
Cardiovascular	25.6
Hormonas	11.1
Oftálmico/Nasal/Cutáneo	1
Otras	4.6

Capítulo 3

Características de un Profármaco Ideal

1. Ser inactivo in vitro.
2. La unión Fármaco-Grupo modulador es covalente o salina.
3. Su bioactivación debe ser más rápida que otras reacciones metabólicas que degraden su estructura.
4. Ni el profármaco ni el grupo modulador deben ser tóxicos ni conducir a metabolitos tóxicos

Clasificación de profármacos

Los profármacos pueden ser clasificados de acuerdo a dos criterios:

- 1- Mecanismo involucrado en su activación
 - Por reducción, oxidación o hidrólisis
 - Por reacciones catabólicas o anabólicas
- 2- La función que desarrolla el modulador
 - Profármacos unidos a un transportador
 - Sistema químico de liberación específica
 - Terapia de anticuerpos unidos directamente a enzimas
 - Terapia de genes dirigidos a enzimas

Estrategias en el diseño de profármacos. Ejemplos.

En esta sección se expondrán algunos ejemplos de Medicamentos de uso en clínica actual, que son profármacos.

Profármacos que mejoran la permeabilidad a través de membrana.

Una de las estrategias para mejorar la absorción pasiva en el intestino de un fármaco es aumentar la lipofilidad del mismo. Los profármacos son muy útiles como recurso, cuando se desea enmascarar los grupos funcionales que son importantes para la unión al receptor, pero también dificultan el pasaje del fármaco a través de la membrana celular. En estos casos, se unen a dichos grupos, funciones químicas lábiles o fácilmente modificables en el organismo. A modo de ejemplo se observa que un grupo funcional como el ácido carboxílico juega un importante rol en la unión del fármaco a un receptor por medio de una unión iónica o por puentes de hidrogeno. Sin embargo la realidad es que un grupo ionizable dificulta el pasaje del fármaco a través de la membrana celular lipídica. Una de las

soluciones es proteger o "enmascarar" la función ácida convirtiéndola en un éster, el cual al ser menos polar puede atravesar la membrana lipídica celular y una vez que pasa al torrente sanguíneo, éste es hidrolizado a su forma ácida libre por las esterasas que se encuentran presentes en la sangre, y en ese lugar interactuar con el receptor o sitio de unión. No todos los ésteres son hidrolizados con la misma velocidad o rapidez y se debe probar un rango de ésteres para encontrar cual es el mejor para el lugar de acción u órgano en el que se está buscando que interactúe, siendo esta una ventaja porque puede permitir una localización selectiva. A partir de estas consideraciones, es posible diseñar y sintetizar ésteres más o menos susceptibles a hidrólisis, de acuerdo a lo que se busque, introduciendo grupos aceptores de electrones en la estructura que soporta la función alcohólica (por ejemplo: OCH_2CF_3 , $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{R}$, OCONR_2 , OAr). El efecto inductivo de estos grupos ayuda al mecanismo de hidrólisis transformando al alcohol en un mejor grupo saliente. Se debe tener precaución de no transformarlo en un éster demasiado reactivo o químicamente inestable con riesgo a que se hidrolice antes de que alcance el torrente sanguíneo.

El fármaco *candoxatrilat* (figura 3.1), es un inhibidor de proteasas, el cual debía ser administrado por vía intravenosa, dado que su alta polaridad no le permitía ser absorbido por el tracto gastrointestinal cuando es administrado oralmente. Se sintetizaron y evaluaron diferentes profármacos en donde la función éster era la variable del conjunto de compuestos. Se concluyó que el grupo etil éster era hidrolizado ineficientemente observándose que el mejor grupo saliente y más activo era el éster 5-indanil. El 5-indanol que se libera por la hidrólisis del profármaco además, no es tóxico.

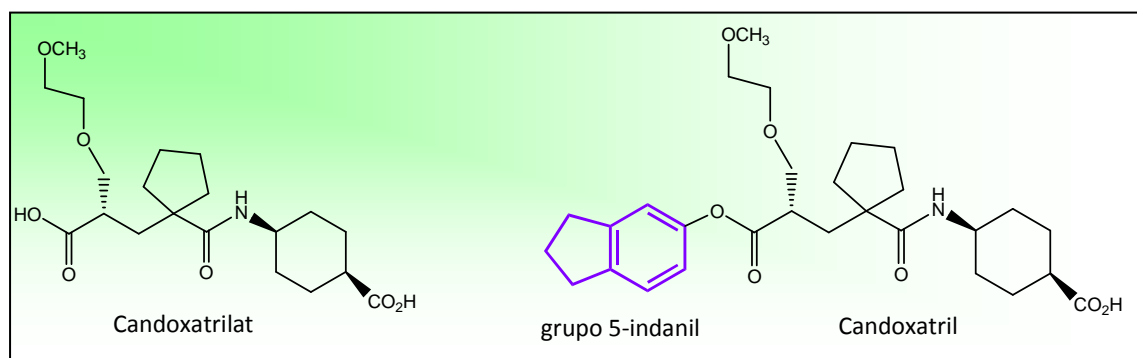


Figura 3.1. Profármaco inhibidor de proteasas.

Capítulo 3

La Ampicilina es antibiótico β -lactámico que tiene una corta vida media. En la búsqueda de compuestos donde se incremente la vida media, se preparó el metil éster de la ampicilina, el cual se metaboliza muy lentamente en humanos debido a su excesiva estabilidad. Para resolver este problema se recurrió a la preparación de aciloximetilésteres. Los profármacos derivados y que son utilizados en clínica son la pivampicilina y vacampicilina⁸ (figura 3.2) entre otros, los que han aumentado la permeabilidad a través de la membrana. Esta modificación hace que el hidroximetiléster, un derivado más reactivo químicamente libere una molécula de formaldehído, regenerando el grupo carboxilo.

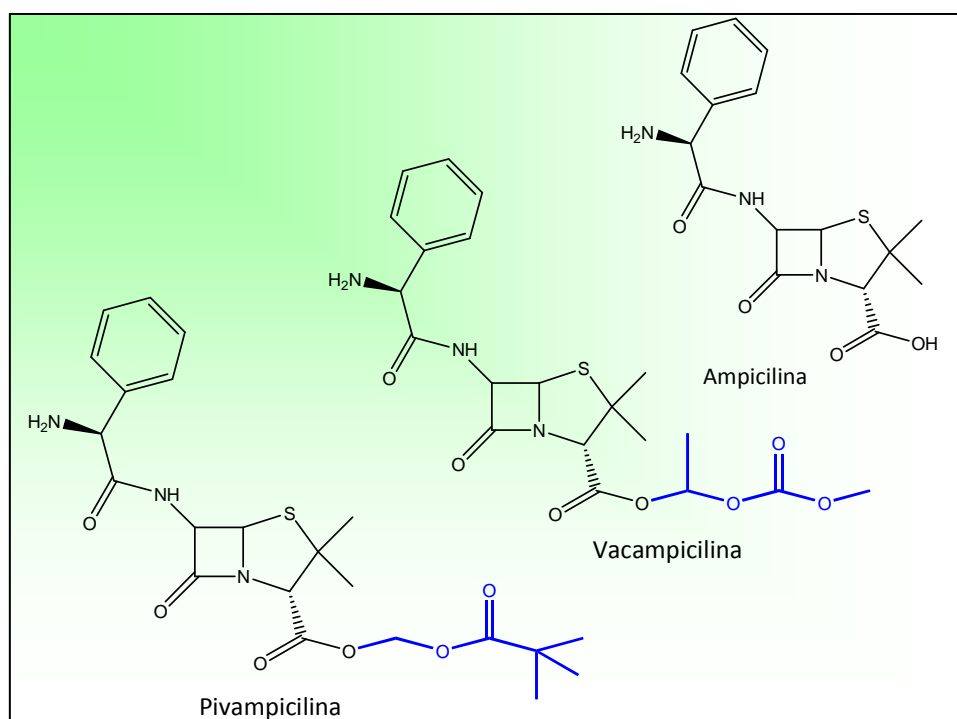


Figura 3.2. Profármacos del antibiótico Ampicilina.

Otro ejemplo de la funcionalización como profármaco de la función ácida es el caso de las estatinas, (figura 3.3) las cuales son inhibidoras de HMG-CoA (3-hidroxi 3-metil glutaril coenzima A) reductasa. El lovastatin y el simvastatin⁹ ven incrementadas su absorción oral a través de la formación de una lactona por ciclación intramolecular. La conversión de la lactona (profármaco) a ácido (fármaco) activo ocurre en el hígado. El uso de la forma de lactonas resulta significativo en cuanto a la absorción, permitiendo a dichos profármacos alcanzar el sitio de acción (el hígado) a altas concentraciones.

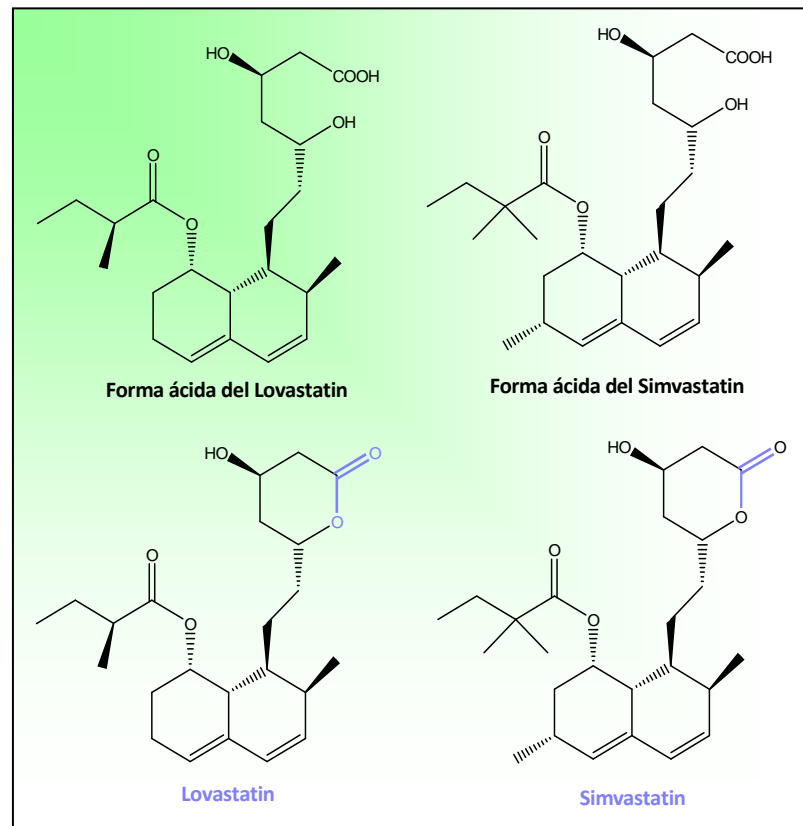


Figura 3.3. Mediante la formación del grupo lactona se mejora la absorción de las estatinas lovastatin y simvastatin.

Profármacos que mejoran la solubilidad acuosa.

El diseño de profármacos se ha utilizado para incrementar la solubilidad acuosa de los fármacos. Una inadecuada solubilidad acuosa es un factor importante que limita la biodisponibilidad, de acuerdo a que su administración sea parenteral, intramuscular, percutánea u oral. Estos son particularmente útiles para fármacos que deben administrarse intravenosamente ya que se deben utilizar altas concentraciones del fármaco en volúmenes pequeños. En tales casos, diseñar un profármaco puede ser una buena estrategia para mejorar tanto en el aspecto farmacodinámico como farmacocinético. Se pueden usar u optar por grupos moduladores cargados como grupos moduladores neutros. En el primer caso tenemos los ésteres de fosfatos, hemisuccinatos. Por ejemplo el éster succinato del Cloranfenicol (figura 3.4) incrementa la solubilidad en agua del cloranfenicol gracias a que posee un ácido carboxílico extra. Es muy importante notar que la hidrólisis del éster produce ácido succínico el cual está presente naturalmente en el organismo.

Capítulo 3

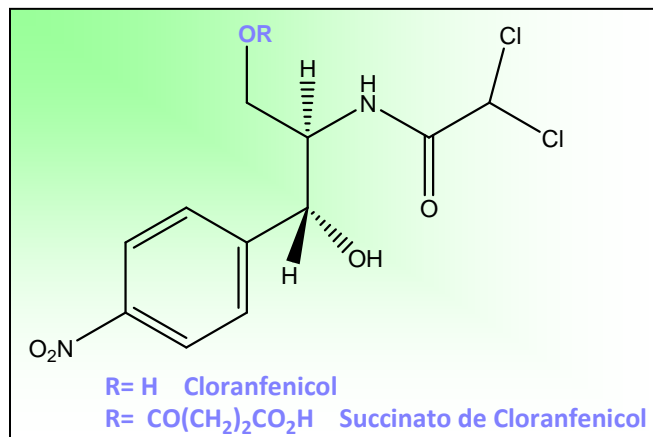


Figura 3.4. Profármacos del Cloranfenicol

Los profármacos diseñados para incrementar la solubilidad en agua se han utilizado para la prevención del dolor asociado con algunos inyectables, causado por la baja solubilidad del fármaco en el sitio de la inyección. Es así como el agente antibacteriano clindamicin es muy doloroso cuando es inyectado, pero utilizando un éster fosfato (figura 3.5) como profármaco, mejora su solubilidad y disminuye el dolor.

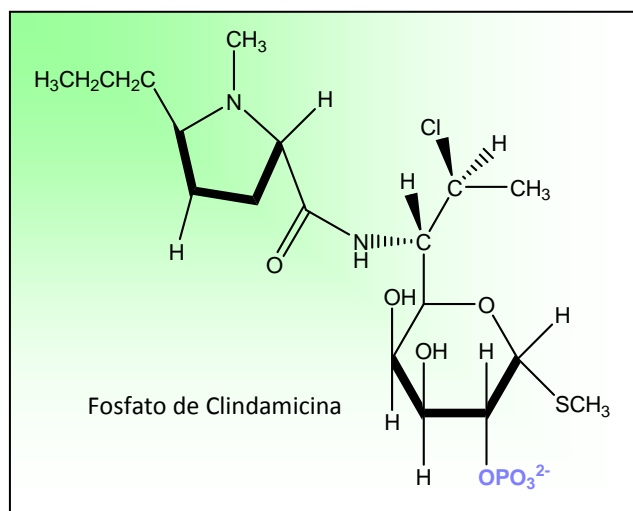


Figura 3.5 Profármaco de Clindamicina, el grupo fosfato aumenta la solubilidad en el sitio de inyección disminuyendo el dolor.

En el segundo caso, cuando se utilizan grupos moduladores neutros para aumentar la solubilidad del fármaco en agua, podemos nombrar los dioles, los polioles y los polímeros como los polietilenglicoles (PEG). Un ejemplo en la mejora de la solubilidad acuosa con grupos neutros, se observa en los profármacos de Paclitaxel,¹⁰ un anticancerígeno, esterificado con el PEG (figura 3.6).

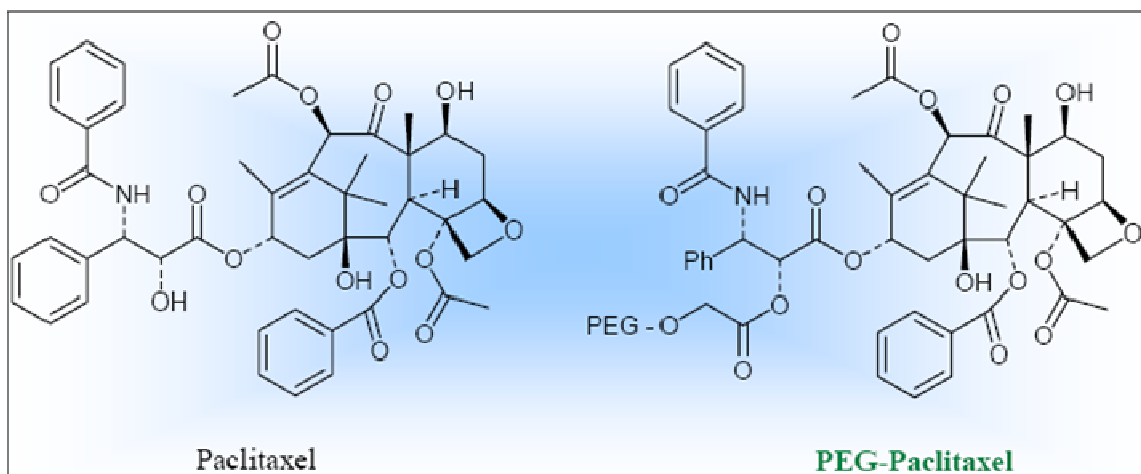


Figura 3.6. Fármaco Paclitaxel y su profármaco PEG-Paclitaxel mejorando la solubilidad acuosa.

El éster formado PEG-paclitaxel es mucho más soluble que el propio paclitaxel siendo una mejora para la administración intravenosa. En la Tabla 3.2 se puede observar que la solubilidad varía según el peso molecular del PEG que forma el éster. Estos profármacos formados son hidrolizados enzimáticamente liberando el fármaco de partida.

Producto	Solubilidad (µmol/ml)	Relación (*)
2' (paclitaxel)-PEG 5000	113,80	3924
2' (paclitaxel)-PEG 20000	9,59	330
2' (paclitaxel)-PEG 40000	3,06	105
paclitaxel	0,03	

Tabla 3.2. Solubilidad de Paclitaxel y sus profármacos en agua.
(*) Relación de solubilidades entre profármaco y paclitaxel.

Capítulo 3

Profármacos que mejoran la absorción intestinal mediada por transportadores

Uno de los profármacos más exitosos en este grupo es el Enalapril (figura 3.7). El Enalapril es un profármaco del Enalaprilat, fármaco antihipertensivo, de la clase de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) diácidos en donde una de las funciones ácidas esta enmascarada mediante una esterificación. El éxito logrado puede observarse en la mejora en la absorción intestinal del Enalaprilat que es del orden de un 3 % mientras su profármaco, el enalapril, la absorción llega al 20 %.

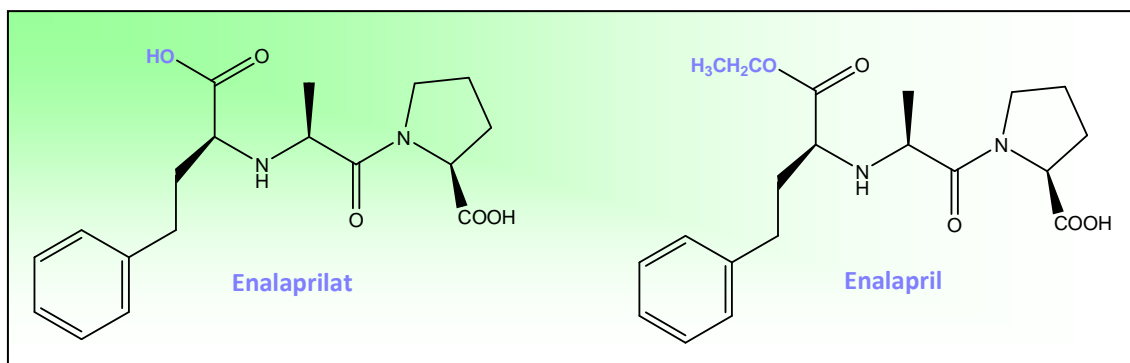


Figura 3.7. Profármaco del Enalaprilat. Esterificando una función ácido aprovecha los transportadores intestinales.

Este aumento de la absorción del Enalapril¹¹, se debe, además del aumento de lipofilia por formación del éster, a que es un sustrato fácilmente captado por los transportadores intestinales.

Los fármacos antivirales, análogos de nucleósidos, utilizados para el tratamiento de infecciones virales como el SIDA, presentan baja absorción por vía oral. Como ejemplo de profármacos en esta familia de compuestos, orientados a aumentar la absorción intestinal, tenemos el aciclovir, para el cual se desarrollo el profármaco Valaciclovir (figura 3.8) El cambio estructural consistió en generar una función éster con valina, lo que le incremento significativamente su solubilidad en agua, y aumento su biodisponibilidad oral hasta cinco veces más, respecto al aciclovir.¹²

Con el mismo propósito se desarrollo el profármaco de la zidovudina (AZT), utilizando el mismo aminoácido, la L-valina, obteniéndose el éster L-Val-AZT (figura 3.8).

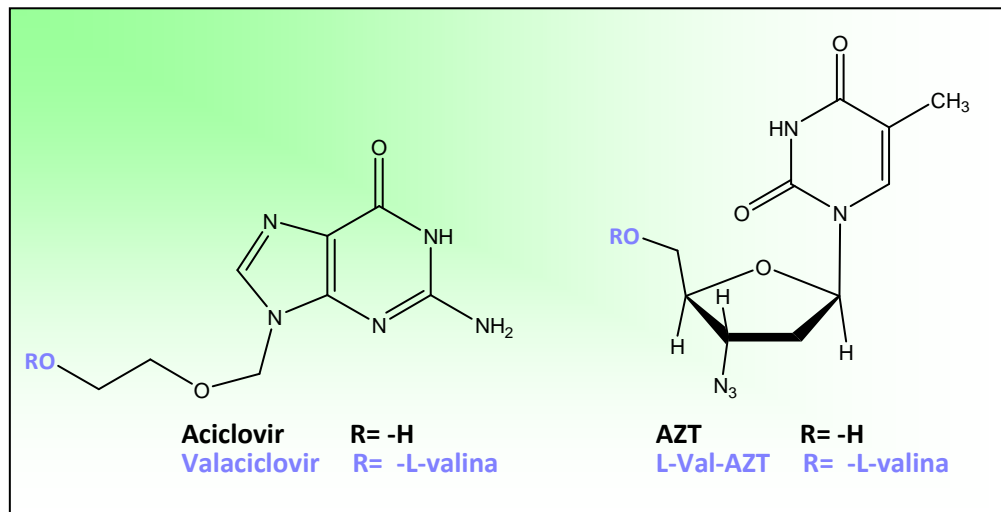


Figura 3.8. Profármacos de Antivirales esterificados con aminoácidos para aumentar la absorción intestinal.

Estudios *in vivo* en rata han demostrado que el aumento en la absorción intestinal se debe al co-transporte H^+ /dipéptido mediado por el transportador de péptidos 1 (PEPT1). Este transporte parece ser estereoselectivo para el aminoácido L-valina.¹³ Estos casos demuestran que cuando se pretende aumentar la absorción intestinal, recurriendo al uso de transportadores PEPT1, el uso de aminoácidos unidos a fármacos nucleosídicos, ha dado excelentes resultados en la terapia oral antivírica.

Profármacos que prolongan la actividad del fármaco en el organismo.

Los fármacos presentan una limitación relacionada con su tiempo de vida medio. Un recurso valido en el diseño de profármacos es diseñarlos buscando que exista una liberación prolongada del fármaco activo, con el objeto de lograr una dosis sostenida en el tiempo. En estos casos lo que se busca es una modificación estructural para controlar la biotransformación y de esa manera proteger y/o regular su rápida metabolización. Como ejemplo de este tipo de profármacos, es el caso del fármaco 6-mercaptopurina, un inmunosupresor útil en la protección de los injertos del donante y cuya función es suprimir la respuesta inmune del organismo. Presenta el inconveniente de ser eliminado del organismo muy rápidamente. Teniendo en cuenta este problema, se desarrollo el profármaco Azatioprina (figura 3.9) el cual se convierte lentamente en 6-mercaptopurina.

Capítulo 3

Debido a que la conversión del grupo tio-éter es química, esta puede ser regulada, por la electronegatividad del grupo unido al heterociclo.¹⁴

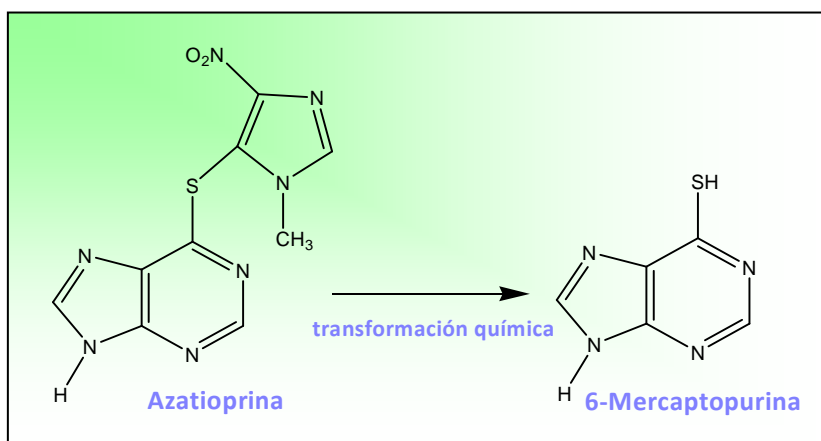


Figura 3.9. Azatioprina actúa como profármaco de 6-mercaptopurina.

Otro desarrollo orientado a mantener la concentración de un fármaco durante largos períodos es asociarlo deliberadamente a un grupo muy lipofílico. Esto significa que la mayor proporción del fármaco se almacena en tejido adiposo, y si el grupo lipofílico es removido lentamente, el fármaco es liberado constantemente a la circulación sanguínea por un largo periodo de tiempo. El agente antimalárico pamoato de cicloguanil es uno de estos desarrollos de profármacos (figura 3.10). La parte activa se une iónicamente a un anión con un grupo lipofílico grande.

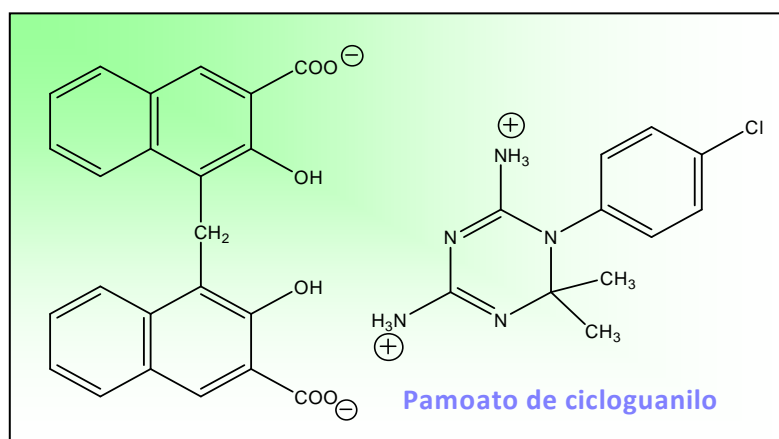


Figura 3.10. Pamoato de cicloguanilo, profármaco iónico o salino.

El bambuterol (figura 3.11), es un profármaco de un broncodilatador, la terbutalina. Los grupos fenólicos son funcionalizados como carbamatos. Este profármaco es hidrolizado por colinesterasas no específicas. Con esta modificación de los grupos fenólicos se logra una metabolización más lenta. Esto se vio reflejado en la

reducción de la dosis a administrar, se logró que pasara de tres administraciones a una sola dosis diaria.

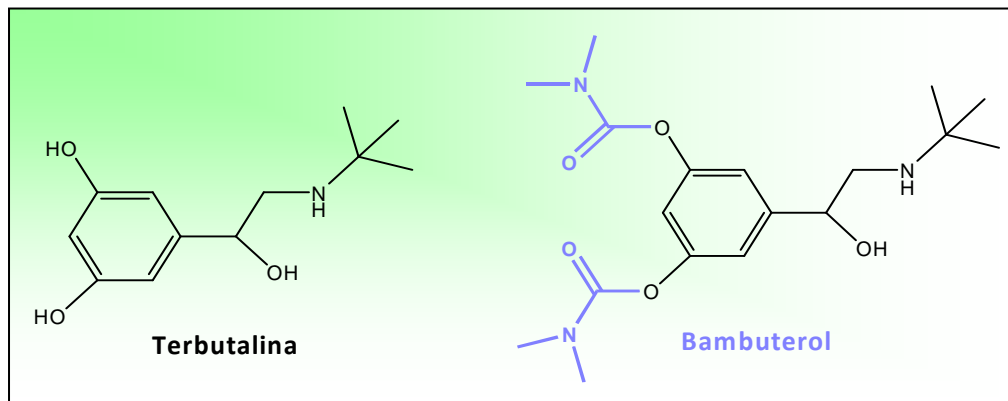


Figura 3.11. Profármacos diseñados para una metabolización más lenta que el fármaco de partida.

Profármacos que enmascaran la toxicidad del fármaco y efectos secundarios.

Los profármacos pueden ser utilizados para enmascarar los efectos colaterales y la toxicidad del fármaco. Un clásico ejemplo, el ácido salicílico, que es un buen analgésico, pero causa irritación gástrica a causa de la acidez del grupo fenólico presente en la molécula. Este inconveniente fue superado protegiendo el grupo fenólico por formación de un éster (figura 3.12). La aspirina o ácido acetilsalicílico fue introducido en 1899, en el organismo es hidrolizada por esterasas para liberar el fármaco activo.¹⁶

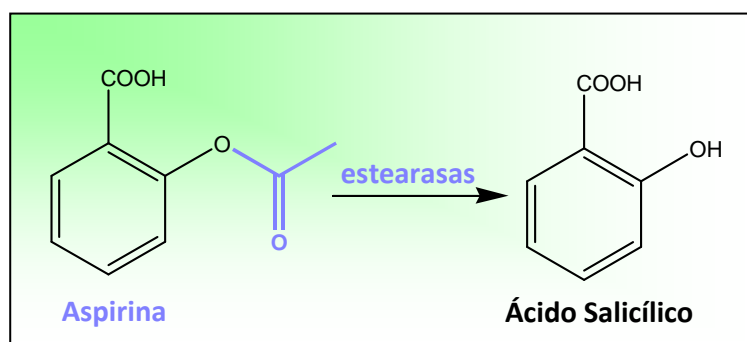
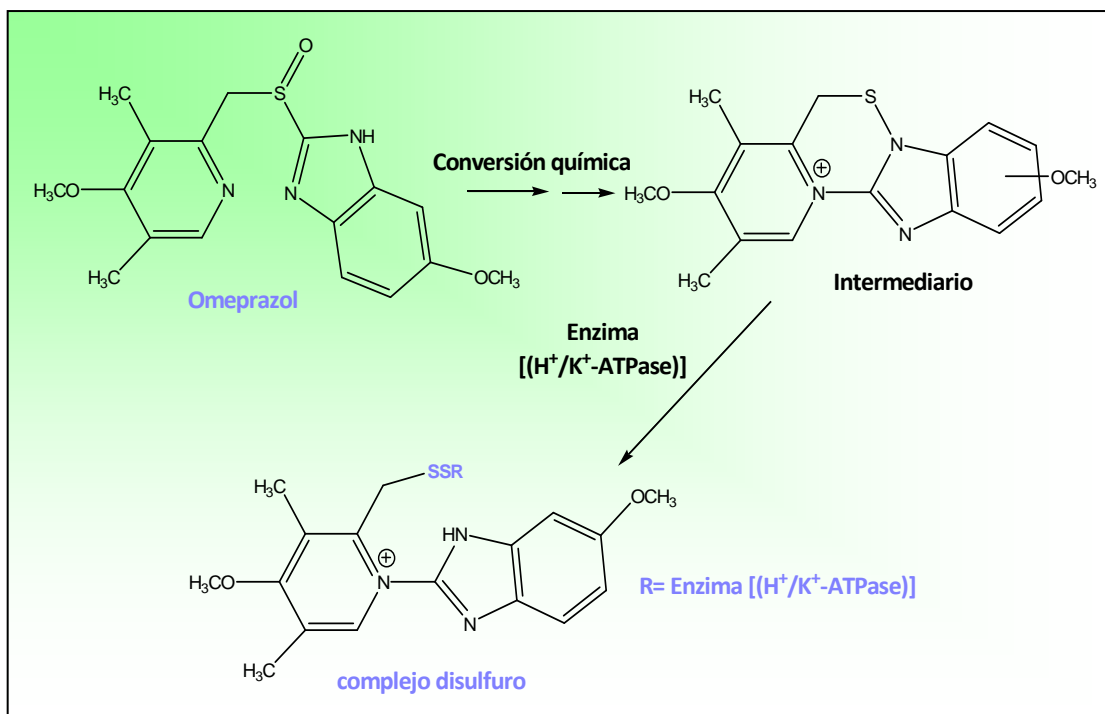


Figura 3.12. Ácido Acetilsalicílico y su profármaco.

Capítulo 3

Profármacos "suicidas"

Otro grupo de compuestos, no siempre reconocidos como profármacos son las moléculas inhibitoras llamadas "suicidas". Estos son profármacos los cuales por una activación metabólica, generan especies reactivas, cerca o en el sitio de acción, y el intermediario reactivo reacciona irreversiblemente con el receptor inactivándolo. Entre este tipo de compuestos tenemos el caso del Omeprazol y Lanzoprazol, los cuales son utilizados para el tratamiento de la acidez estomacal, son profármacos que se activan en el sitio de acción. El omeprazol es un inhibidor específico de la $(H^+/K^+)ATPasa$ gástrica.¹⁷ Bajo condiciones ácidas, el omeprazol es degradado químicamente a un intermediario reactivo capaz de atrapar un grupo sulfhidrilo en la $(H^+/K^+)ATPasa$. Esquema 3.4.



Esquema 3.4. Esquema mostrando la activación del omeprazol en un intermediario reactivo capaz de atrapar un grupo sulfhidrilo de la enzima generando un enlace disulfuro covalente con ésta.

Profármaco de un Profármaco

Famciclovir (figura 3.13), es un profármaco del Penciclovir el cual es a su vez es un profármaco. Penciclovir es pobremente absorbido debido a su polaridad. Famciclovir es menos polar y es más fácilmente absorbido. Luego el Famciclovir es metabolizado, principalmente en el hígado, para formar Penciclovir el cual es fosforilado en células infectadas con virus. Estas características hacen que se nombre como profármaco de profármaco.

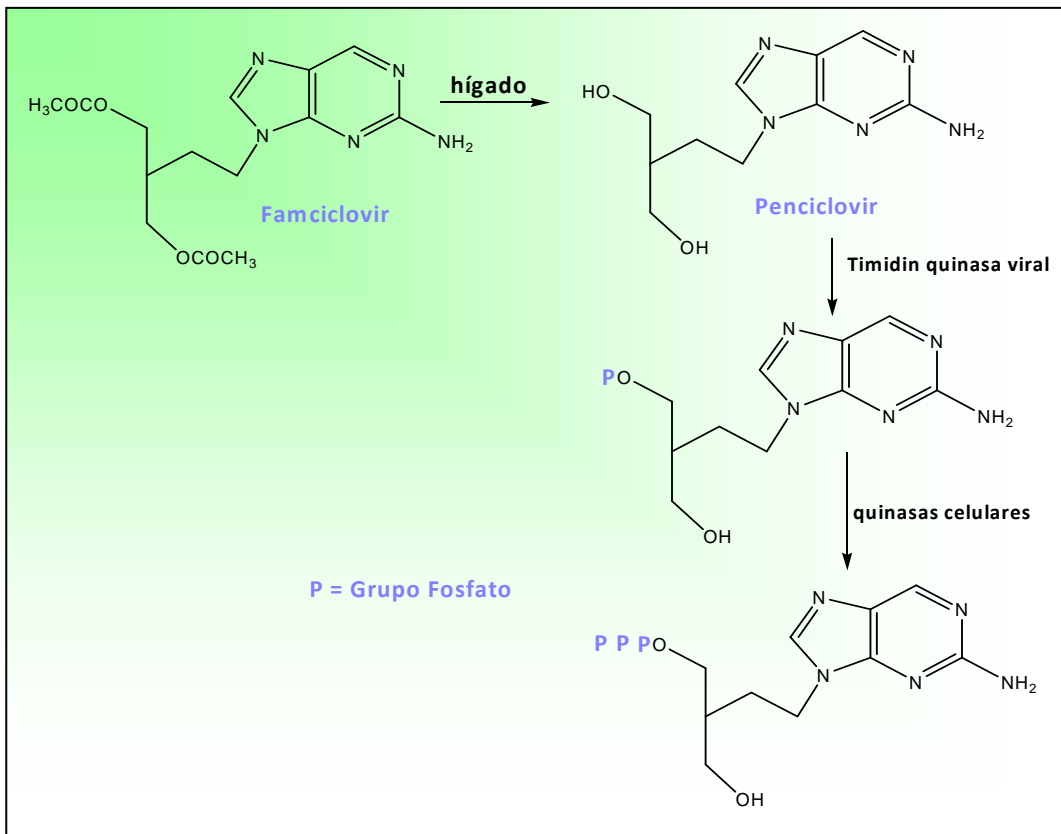


Figura 3.13. Famciclovir como un profármaco de Penciclovir.

Estrategias para liberar y localizar fármacos en el cerebro

La barrera hematoencefálica (BHE) es una barrera estructural y funcional compleja y muy difícil de atravesar si uno desea la localización de agentes terapéuticos en el sistema nervioso central (SNC). Debido a sus propiedades únicas, a menudo el pasaje a través de la BHE es el principal factor limitante para la localización de potenciales fármacos del SNC dentro del parénquima cerebral. De hecho, se estima que más del 98% de los fármacos de bajo peso molecular y prácticamente el 100% de los fármacos de alto peso molecular desarrollados para enfermedades del SNC no cruzan fácilmente la BHE.¹⁸ Muchos de los compuestos

Capítulo 3

farmacológicamente activos tienden a fallar tempranamente en su fase de desarrollo debido a que estas moléculas carecen de las características estructurales esenciales para el pasaje a través de la BHE. Los profármacos son considerados como una de las tecnologías potencialmente útiles al considerar estrategias para superar la BHE.

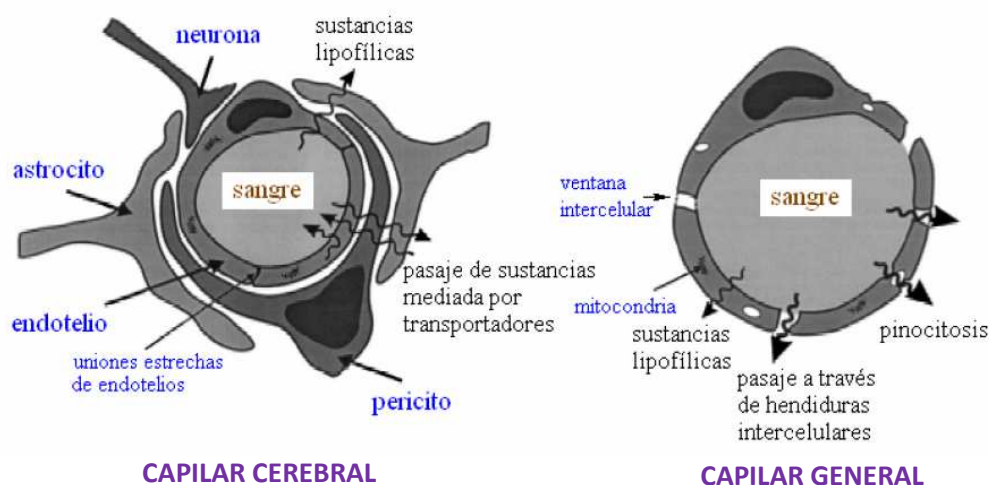
En esta sección se describe brevemente la naturaleza de la barrera hematoencefálica, los distintos tipos de mecanismos de transporte a través de la BHE cuyo conocimiento puede ser utilizado en las distintas estrategias orientadas a facilitar el paso de los fármacos a través de ella.

Barrera Hematoencefálica (BHE)

La BHE segrega al SNC de la circulación sistémica, y su principal función fisiológica es el mantenimiento de la homeostasis en el parénquima cerebral y la protección del cerebro contra sustancias químicas extrañas a ellas, consideradas xenobioticas y potencialmente dañinas.

En la actualidad se ha establecido claramente que la barrera hematoencefálica es una única barrera membranosa que separa estrechamente el cerebro de la sangre circulante. Los capilares del cerebro, así como la de la medula ósea, carecen de pequeños poros que permiten el pasaje en rápidos movimientos de los solutos de la circulación hasta los otros órganos.¹⁹

Estos capilares están envueltos en una capa de células endoteliales especiales que carecen de ventanas (espacios) intercelulares y están sellados mediante uniones muy estrechas por no decir herméticas. Estas células endoteliales, junto con los otros elementos perivascular, como los astrocitos y pericitos constituyen la barrera hematoencefálica (Esquema 3.5)



Esquema 3.5. Esquema de algunas diferencias que se observan entre capilar cerebral y capilar general.

Los capilares cerebrales están impedidos de realizar pinocitosis, así como el pasaje de sustancias a través de las hendiduras y ventanas intercelulares. Esto implicó que en los primeros estudios se pensara que el pasaje de sustancias en la BHE, se debía a un intercambio de solutos transcelularmente. Esto implicaba que solamente los solutos lipofílicos o solubles en lípidos son los que tenían acceso a través de las membranas del capilar endotelial de la BHE mediante un proceso de difusión pasiva. Pero los sucesivos avances en los estudios sobre el transporte a través de la BHE, como es el caso de los nutrientes, agentes neuroactivos y xenobióticos ha llevado a cambiar este concepto sobre la BHE. Además, las células endoteliales tienen una carga superficial negativa que repele los compuestos cargados negativamente. Estas células también tienen muchas mitocondrias, enzimas y varios sistemas para el transporte activo selectivo de nutrientes y otras sustancias hacia el interior y el exterior del cerebro.²⁰ Éste ya no es visto como una barrera de membrana estática de tipo lipóideo de células endoteliales, sino que es considerada como una interfase dinámica que tiene funciones fisiológicas para el transporte transmembranal específico y selectivo para muchos compuestos.

Tradicionalmente, varios desarrollos en química medicinal (por ejemplo, análogos lipofílicos de fármacos y profármacos, o interrupción de la BHE) y físicos basados en neurocirugía invasiva (por ejemplo: localización intersticial del fármaco), se han intentado para incrementar la localización de agentes terapéuticos en el cerebro. Un incremento en la información y entendimiento de la fisiología de la BHE ha permitido desarrollar estrategias racionales químicas y biológicas para la localización de fármacos.

Neurofármacos novedosos deben poseer características fisicoquímicas óptimas para permitir la difusión pasiva a través de la BHE por la vía transcelular, o poseer las características estructurales necesarias para servir de sustrato a uno de los sistemas de transporte endógenos de la BHE.

Por otra parte, nuevos conocimientos de los transportadores endógenos de la BHE, pueden ser utilizados en la reformulación racional de fármacos para utilizar un transporte activo. Sin embargo es importante reconocer que el grado de penetración de la BHE y la concentración resultante en el SNC son relativos a la potencia del fármaco. Aunque pueda penetrar dentro del SNC una pequeña cantidad de fármaco, si este es potente, pequeñas concentraciones unidas al receptor podrán lograr el efecto deseado.

Capítulo 3

Penetración de los fármacos a través de la BHE.

Pasaje de sustancias por difusión pasiva.

Para que el medicamento penetre libremente a través del endotelio cerebral, la hidrofobicidad de la molécula es un requisito importante. Para poder cruzar fácilmente por difusión pasiva la BHE en cantidades farmacológicamente significativas, un compuesto debe ser relativamente pequeño (tener un peso molecular menor que 500 Da), ser liposoluble y ser neutro o no poseer carga a pH fisiológico, y ser capaz de formar menos de ocho puentes de hidrógeno con agua.²¹ Además, las predicciones sobre la permeabilidad también incluyen el potencial de la molécula para adherirse a los iones de hidrógeno. Por lo tanto, la sustitución de grupos de unión de hidrógeno por grupos que no tienen afinidad por estos iones aumenta la lipofilidad de la molécula. Sin embargo, estos dos factores podrían reducir el tiempo de permanencia en el plasma debido a la rápida eliminación de las moléculas altamente lipofílicas y a la mala solubilidad de estas sustancias en los líquidos corporales.

Con un incremento en la lipofilidad, por ejemplo a través de profármacos formados por ésteres, se podría predecir un incremento en el acceso al SNC debido a la naturaleza más lipofílica de los profármacos. De hecho, uno puede lograr generalmente un mejor acceso al SNC a través de estos derivados lipofílicos. Sin embargo, este acercamiento altamente unidimensional no lleva generalmente a resultados terapéuticos más factibles. Solamente hay un número limitado de ejemplos que mejoraron la terapia en el SNC a través de la lipidización de las moléculas polares. El ejemplo más conocido y adecuado desde el punto de vista tecnológico, es la forma diacetilada de la morfina, la heroína.²² La heroína, siendo más lipofílica, atraviesa la BHE alrededor de 100 veces más que la morfina (figura 3.14).

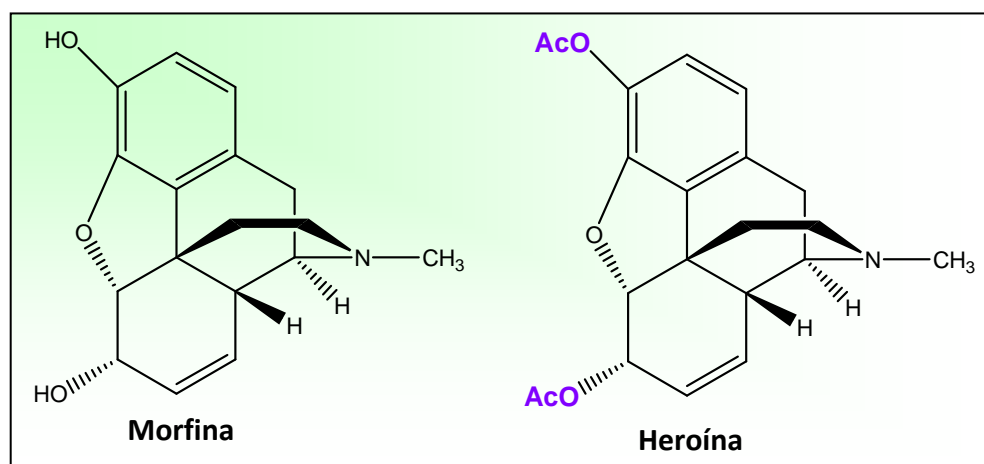
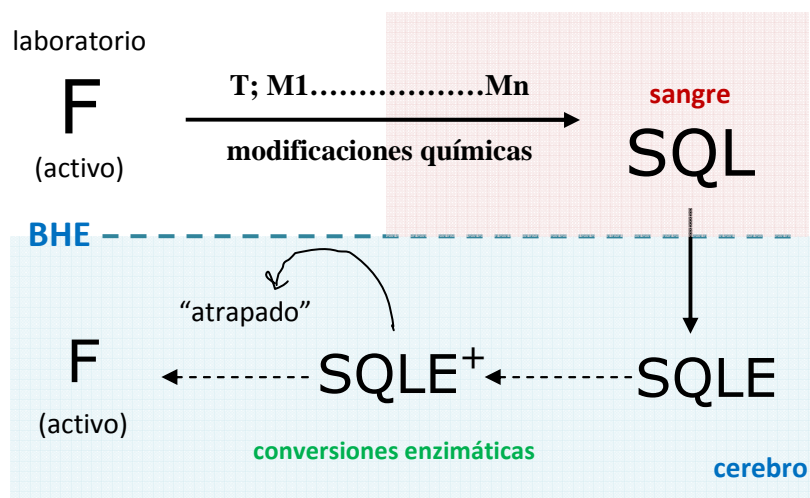


Figura 3.14. Morfina y su profármaco diacetilado.

Sistema Químico de Liberación Específica.

El Sistema Químico de Liberación Específica (SQLE) es un exitoso desarrollo de profármacos que utiliza el incremento de lipofilidad y también requiere pasos secuenciales de bioactivación para la conversión en el fármaco activo y dejar el intermediario "atrapado" en el cerebro. El término SQLE fue originalmente acuñado por Bodor y colaboradores²³⁻²⁵ para distinguir este sistema de los profármacos que típicamente requieren sólo un único paso de activación. Sin embargo, hoy en día, muchos otros profármacos son activados en múltiples pasos.

Los SQLE representan un diseño racional de fármacos sofisticados en el que se promueve un metabolismo secuencial. Además, no solamente localiza el fármaco en el lugar de acción, sino que se lo diseña con la intención de que se metabolice en un lugar determinado. Los SQLE son derivados químicos inactivos de un fármaco, obtenidos a partir de uno o más pasos de modificaciones químicas. La función de estas nuevas porciones unidas al fármaco es proveer el sitio específico o aumentar la liberación de dicho fármaco en el lugar de acción a través de transformaciones enzimáticas o químicas en varios pasos.

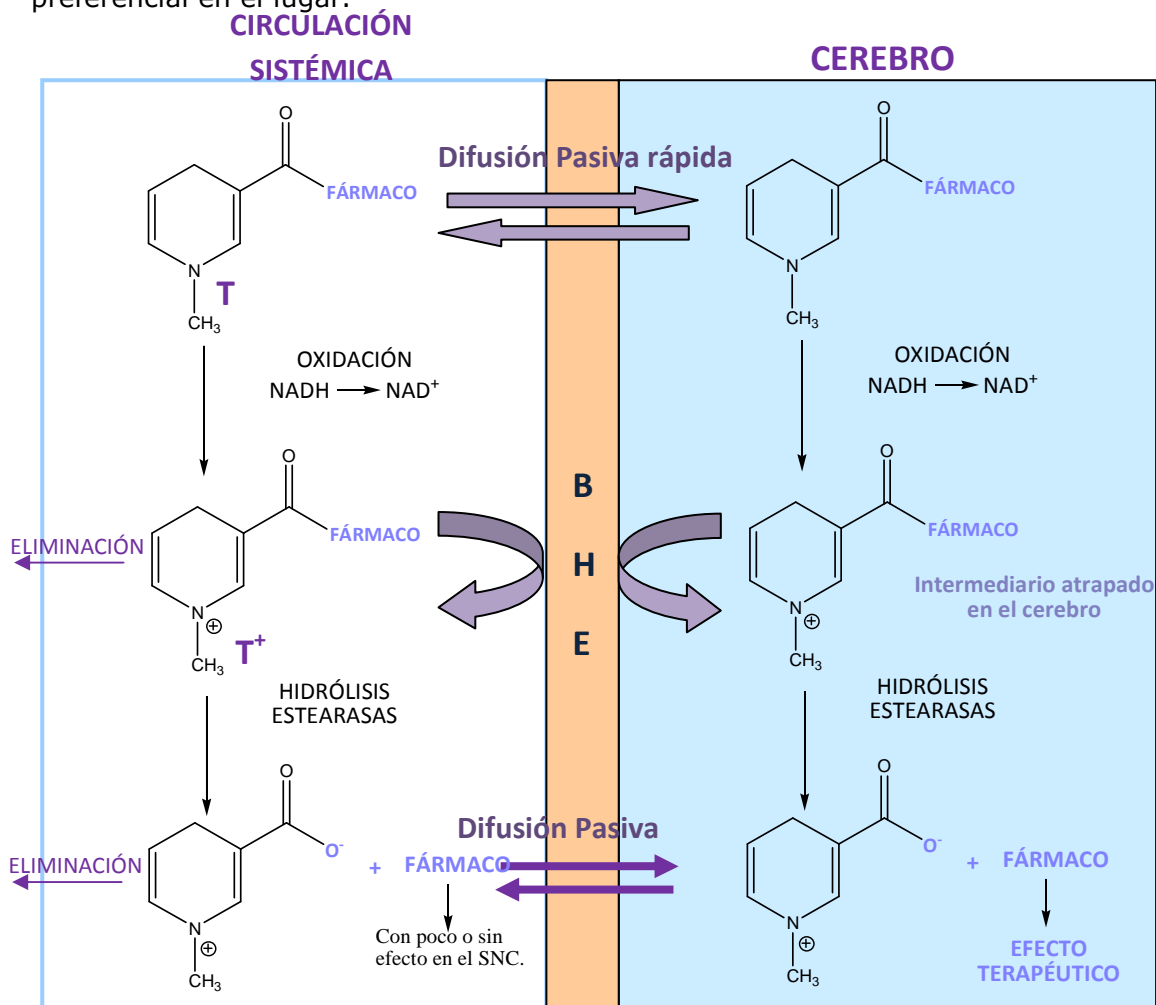


Esquema 3.6 Diseño del SQLE en el laboratorio a partir de F (fármaco activo). Al administrar el SQL, éste se localiza en el sitio de acción (cerebro) y mediante conversiones enzimáticas sufre distintas modificaciones, por ejemplo SQLE⁺ hasta liberar el F.

Entre ellos el sistema más estudiado es la estrategia basada sobre el sistema 1,4-dihidrotrigonelina ↔ trigonelina (donde la forma lipofílica 1,4-dihidro (T) es convertido *in vivo* a la forma cuaternaria hidrofílica (T⁺)) (Esquema 3.7) ha demostrado ser el más útil. Esta conversión tiene lugar fácilmente en todas partes del cuerpo porque este está muy estrechamente relacionada a un ubicuo sistema de coenzima NAD(P)H ↔ NAD(P)⁺ asociadas con numerosas oxidoreductasas y respiración celular. Debido a que la oxidación ocurre con una transferencia directa

Capítulo 3

de un hidruro sin generar intermediarios radicales altamente activos o reactivos, este proporciona un sistema que dirige el fármaco al sitio de acción no tóxico.²⁶ El complejo T-F (fármaco unido a la trigonelina) sintetizado, al ser administrado pasa la BHE por difusión pasiva y por las enzimas presentes en el cerebro pasa a la especie oxidada T⁺-F, éste al estar cargado, invierte la polaridad y no puede atravesar la BHE. Por lo tanto, va liberando el fármaco (F) de forma específica en el cerebro a medida que actúan las enzimas presentes en el mismo. Además, ya que el ión piridinio es rápidamente eliminado del cerebro, quizás por un mecanismo de transporte que elimina pequeños iones orgánicos,²⁷ la porción T⁺ formada durante la liberación final del fármaco activo F de la forma cargada T⁺-F, no se acumula dentro del cerebro. Además, cabe aclarar que el complejo que se oxida en la periferia es fácilmente eliminado del organismo debido a la adquisición de la carga, la cual aumenta mucho la solubilidad en el medio acuoso facilitando la eliminación. Con esto podemos deducir que con este tipo de diseño de profármacos no solamente se logra localizar el fármaco en el cerebro, sino que también sea preferencial en el lugar.



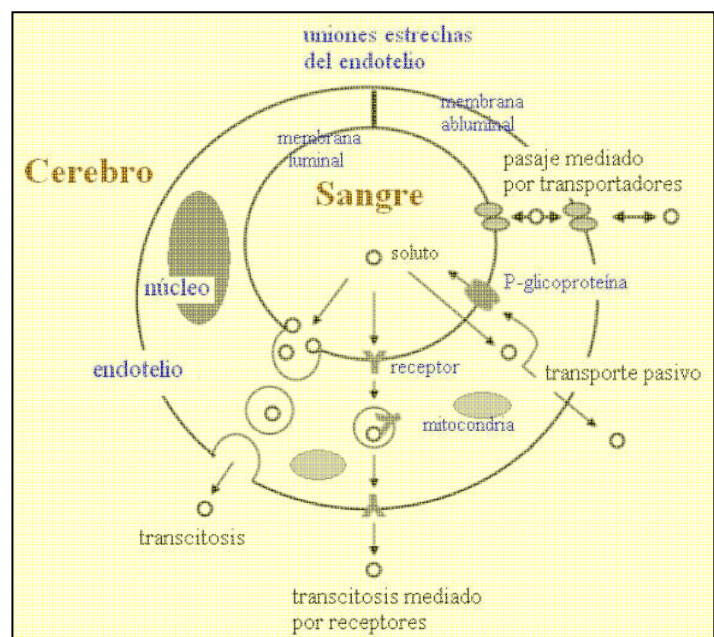
Esquema 3.7. Esquema del Sistema Químico de Liberación Específica.

Los SQLE han sido explorados con una amplia variedad de compuestos conteniendo grupos amino o hidroxilos, y se ha logrado un incremento considerable de la concentración de fármacos en el cerebro, por ejemplo, para zidovudina (AZT)²⁸, ganciclovir²⁹, y estradiol³⁰. Están siendo desarrollados métodos alternativos para generar intermediarios que queden "atrapados" en el cerebro. Por ejemplo, profármacos localizadores en el SNC utilizando grupos fosfatos, fosfonatos, y fosfinatos son intermediarios aniónicos atrapados están siendo estudiados en fase preclínica con diferentes grados de éxito³¹.

Pasaje de sustancias mediado por transportadores presentes en la BHE.

La combinación de las uniones estrechas de los endotelios en los capilares cerebrales, con un atenuado transcitosis, condiciona a las sustancias que deben pasar la BHE ya sea por: difusión pasiva o el pasaje mediado por transportadores (Esquema 3.8).

El pasaje mediado por los transportadores requiere que el sistema de transporte esté presente tanto en la membrana luminal como en el abluminal para un eficiente pasaje de sustancias. El rol primario de las enzimas transportadoras es regular y suministrar al cerebro de los nutrientes esenciales y de los electrolitos.



Esquema 3.8. Distintos tipos de mecanismos de transporte presentes en la BHE

En la BHE se han encontrado los siguientes sistemas de transporte de^{32,33}:

- * Glucosa y monosacáridos estructuralmente relacionados.
- * Electrolitos.
- * Aminoácidos
- * Ácidos monocarboxílicos.
- * Péptidos.
- * Vitaminas y
- * Nucleósidos.

Capítulo 3

Uno de los objetivos en el diseño de profármacos para localizar fármacos en el SNC es aprovechar la presencia y selectividad de los distintos transportadores mencionados. También existe otro tipo de transportadores que participan en la eliminación de sustancias desde el SNC. Así, la función de la glicoproteína-P puede funcionar como una bomba de aflujo para los compuestos desde el cerebro³⁴ y por consiguiente contribuir a las células endoteliales como otra barrera que protege al cerebro pero en este caso por una eliminación eficiente o incrementada.

Sistema de transporte de Aminoácidos.

Otra forma de solucionar el problema de la permeabilidad de membrana es diseñar un profármaco que pueda tomar ventaja de los transportadores de proteínas que se encuentran en la membrana celular, como por ejemplo los transportadores responsables de ingresar los aminoácidos dentro de la célula. El *LAT1 (Large neutral amino acid transporter)* es un sistema de transporte expresado en la membrana luminal y abluminal de las células de los capilares endoteliales, y transporta eficientemente L-aminoácidos neutros dentro del cerebro. El mejor ejemplo de profármacos que utiliza el LAT1 es la Levodopa (figura 3.15).

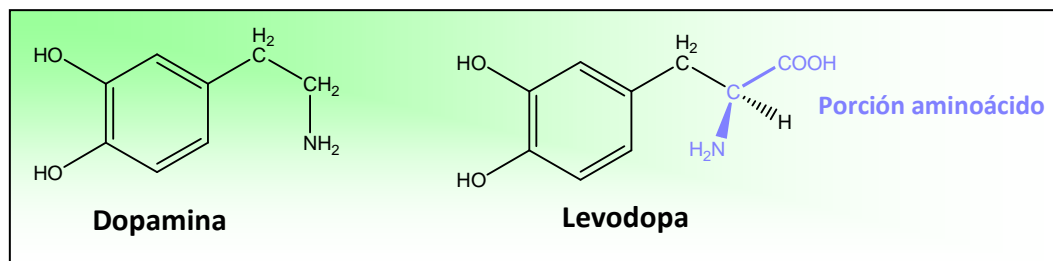
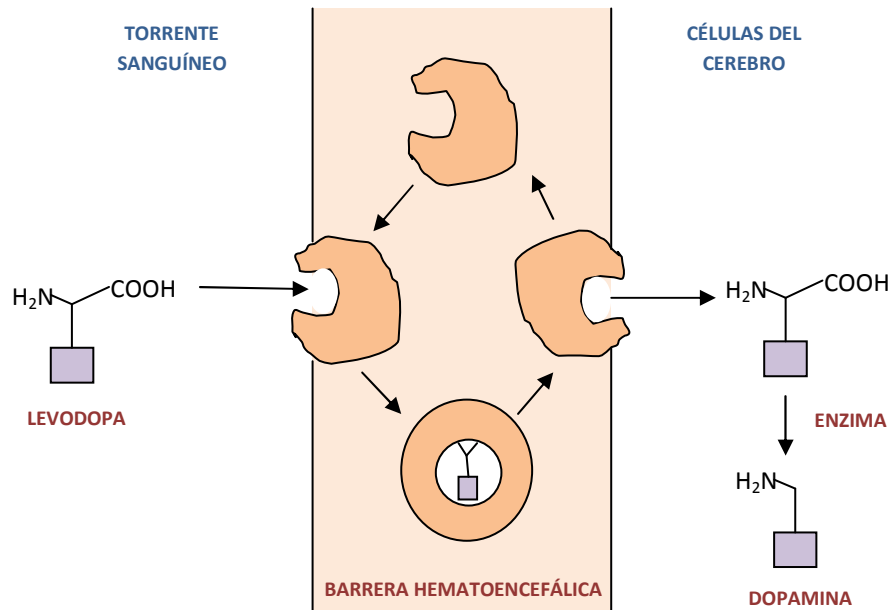


Figura 3.15. Dopamina y su derivado aminoácido Levodopa.

Levodopa es un precursor metabólico del neurotransmisor dopamina utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, enfermedad debida principalmente a la deficiencia de este neurotransmisor, por más de 30 años. La Dopamina no puede ser utilizada por sí misma ya que es demasiado polar para atravesar la barrera hematoencefálica. La Levodopa es aún más polar y parece ser un profármaco inútil. Sin embargo la levodopa es un aminoácido y por lo tanto es reconocido por las proteínas transportadoras de aminoácidos y es transportada a través de la membrana celular (Esquema 3.9).



Esquema 3.9. Transporte de Levodopa a través de la barrera hematoencefálica.

Una vez que cruza la membrana celular, la enzima descarboxilasa remueve el grupo ácido y genera la dopamina. El profármaco levodopa permite producir en el sistema nervioso central cantidades adecuadas de dopamina³⁵.

Sistema de transporte de hexosas.

Debido a un dinámico transporte de nutrientes esenciales hacia el cerebro y la salida de metabolitos de desecho desde éste, en muchos casos, estos procesos están mediados por un número de transportadores específicos que requiere un gasto energético. Esta demanda de la energía en el cerebro está provista casi exclusivamente por la glucosa, la cual es transportada a través de un transportador de glucosa llamado GLUT1 (*glucose transporter-1*). Estos se encuentran en la membrana luminal de las células endoteliales de los capilares del cerebro, estos transportadores toman y transportan desde el plasma la D-glucosa y la manosa, pero no la L-glucosa³⁶. Se estima que el consumo de la glucosa en el cerebro abarca aproximadamente el 30% del consumo total en el cuerpo. Esto está reflejado en que la velocidad de transporte en el proceso de captación en la BHE de los transportadores de hexosas. Este transporte es de 15 a 3000 veces mayor con respecto a otros transportadores, tales como transportadores de ácidos monocarboxílicos, aminoácidos neutros, etc.

Capítulo 3

Algunos compuestos como el L-serinil- β -D-glucósido unidos a la encefalina (Figura 3.16) han demostrado que son transportados a través de la BHE y produce un efecto prolongado de la analgesia después de la administración intraperitoneal en ratones³⁷. Siendo el GLUT1 responsable de transportar estos profármacos de glucopéptidos hacia el SNC. Estos resultados hacen posible que uno pueda diseñar profármacos que utilicen dichos transportadores de glucosa, usando glucosilaciones para transportar sustancias con actividad en el SNC, pero que presentan dificultades para atravesar la BHE.

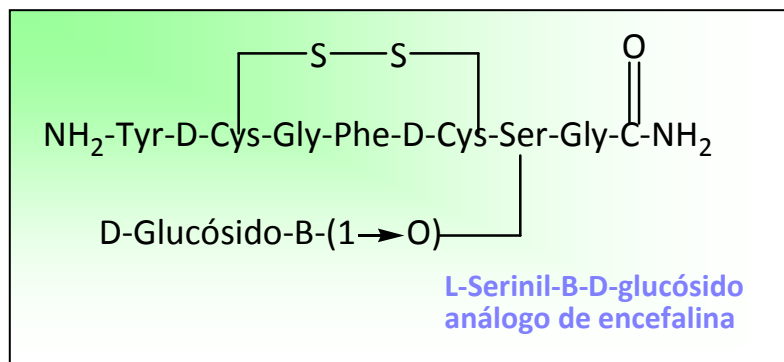


Figura 3.16. *Compuestos que atraviesan la BHE utilizando el sistema de transportadores de hexosas.*

Profármacos de fármacos anticonvulsivos

En esta sección se tratará de describir algunos ejemplos del diseño de profármacos aplicados tanto a fármacos anticonvulsivos, como así también, a la formación de profármacos a partir de sustancias que poseen actividad anticonvulsivante *in vitro* pero que tienen un pobre acceso al cerebro cuando son administrados sistémicamente *in vivo* por su carácter hidrofílico como es el ácido nípecótico.

Profármacos de Fenitoína.

La fenitoína es un antiepiléptico que es utilizado ampliamente en clínica a pesar de que fue descubierto hace más de 6 décadas. Como se menciona en el Capítulo 2, uno de los profármacos de uso en clínica de la fenitoína es la fosfofenitoína que logra tener una mayor biodisponibilidad por vía intramuscular o intravenosa. Sin embargo, debido a su baja solubilidad tanto en el agua como en lípidos, la fenitoína muestra una errática biodisponibilidad cuando es administrado oralmente. Se han diseñado profármacos de la fenitoína a través de las distintas estrategias mencionadas anteriormente para mejorar tanto la biodisponibilidad

como la localización en el cerebro. Uno de ellos es el derivado de la dihidropiridina de 3-(hidroximetil)-fenitoína en el cual se aplicó el diseño del SQLE³⁸ (figura 3.16).

Otras estrategias aplicadas a la obtención de mayor disponibilidad de la fenitoína se han obtenido por

coadministración de lípidos o por profármacos a través de la formación de un éster fosfato disódico y de varios grupos amino conteniendo ésteres acilos de 3-(hidroximetil)-fenitoína. En un intento para mejorar la biodisponibilidad oral de la fenitoína, se han preparado distintos derivados fenitoína-lípido conjugados³⁹ uniendo la 3-(hidroximetil)-fenitoína (figura 3.17) mediante el uso de un grupo espaciador como el ácido succínico con diacilglicéridos en posición 2 (**1**) y en posición 1 (**2**), también se preparó un derivado similar al **1** pero cambiando el grupo espaciador, el ácido succínico por el ácido butírico (**3**) y un profármaco sin un grupo espaciador ya que el glicerol es reemplazado por el ácido 3-hidroxi-2-hidroximetil-propiónico el cual permite la formación directa de un éster (**4**).

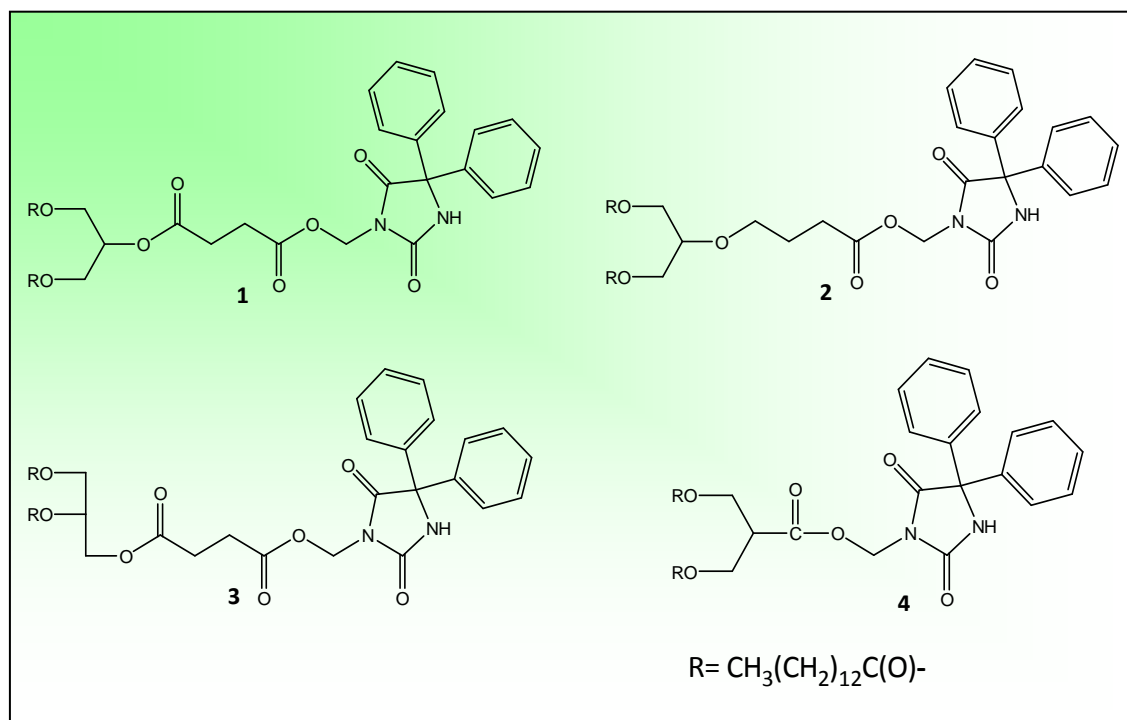
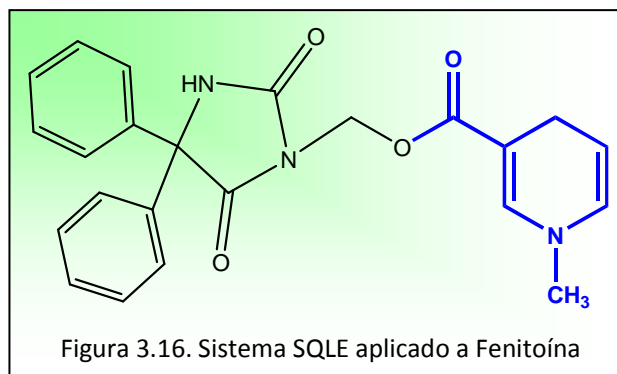


Figura 3.17. Estructuras de los distintos profármacos de la fenitoína para mejorar la biodisponibilidad oral. Se han preparado mediante el uso de grupos espaciadores (**1**, **2**, **3**) o sin ello (**4**). El diacilglicérido está formado por dimiristoil-glicerol con el grupo hidroxilo libre en posición 2 excepto para la formación del profármaco **2** que tiene el hidroxilo libre en la posición 1.

Capítulo 3

Profármacos de Carbamazepina

Como se introdujo en el Capítulo 2 la Oxcarbazepina y el Acetato de Eslicarbazepina son profármacos de la Carbamazepina, uno de los FAEs de primera elección para el tratamiento de las convulsiones parciales y tónico-clónicas. El desarrollo de estos profármacos ha permitido disminuir y en algunos casos eliminar los efectos adversos tales como náuseas, cefaleas, vértigos, diplopía y erupciones, que son atribuidos en parte a la formación de un metabolito tóxico, el 10,11-epóxido de la CBZ. Eslicarbazepina comparte con la CBZ y la OXC los núcleos dibenzapinas llevando el sustituyente 5-carboxamida, pero son diferentes estructuralmente en las posiciones 10 y 11. Estos compuestos mantienen la alta capacidad anticonvulsivante, previniendo la formación de epóxidos (metabolitos tóxicos) y evitando la producción innecesaria de enantiómeros o diastereoisómeros de metabolitos y de sus conjugados (figura 3.18).

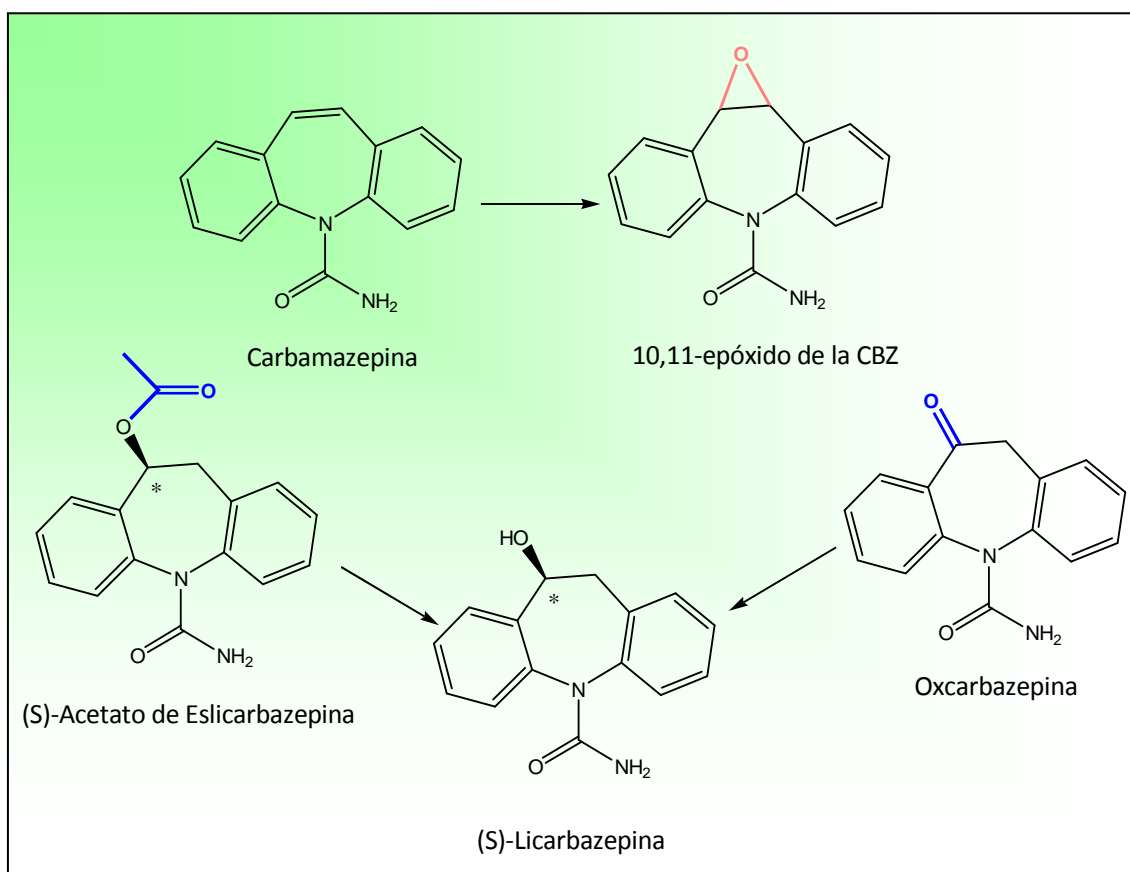


Figura 3.18. Profármacos de carbamazepina y su metabolito activo (S)-Licarbazepina.

Profármacos del Ácido Nipecótico

El ácido nipecótico es uno de los inhibidores más potentes in vitro de la recaptación neuronal del ácido γ -amino butírico (GABA) como en las células gliales. Por tal efecto podría ser útil en el tratamiento de los desordenes tanto para la enfermedad de Parkinson como para el tratamiento de la epilepsia. Desafortunadamente, el ácido nipecótico es un compuesto altamente polar lo cual hace que la penetración a través de la BHE sea muy pobre. En el intento de localizar el ácido nipecótico en el cerebro se han preparado profármacos⁴⁰ por formación de ésteres utilizando nutrientes esenciales, tales como la glucosa, galactosa o la tirosina (figura 3.19) con la idea de aprovechar el mecanismo de transporte activo presente en el cerebro para estos nutrientes.

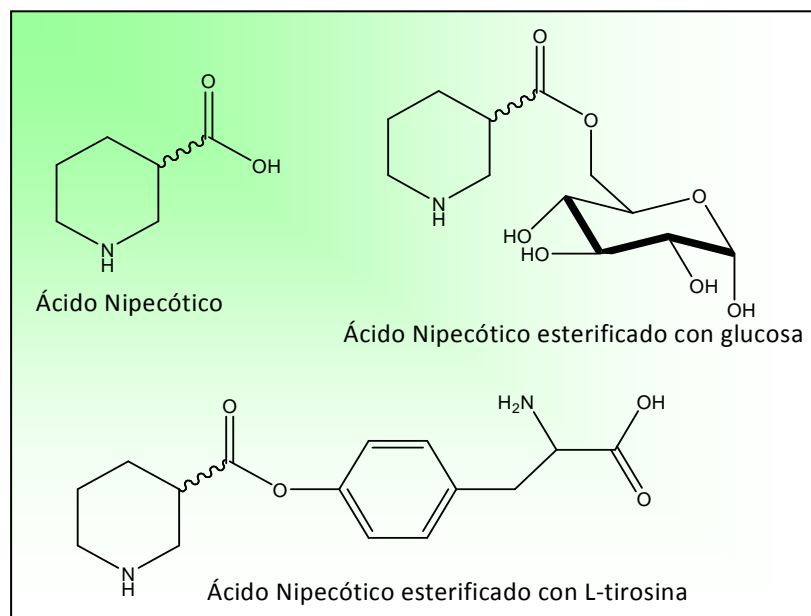


Figura 3.19. Profármacos del Ácido Nipecótico

Profármacos de Ácido Valproico

Una de las formas de evitar los efectos tóxicos que derivan del uso del Ácido Valproico (VPA) podría ser la disminución de la dosis administrada por medio de la localización del VPA en el cerebro mediante el diseño de profármacos. El diseño y la preparación de profármacos de VPA han tomado impulso desde los comienzos de la década de los noventa. Debido al grupo funcional presente en el VPA, los mayores esfuerzos se han enfocado o limitado en la preparación de amidas y ésteres de VPA. Muchos de ellos realmente llegaron a liberar el VPA en el organismo actuando como un verdadero profármaco de VPA. Otros en cambio presentaron actividad

Capítulo 3

anticonvulsivante pero sin atribuir dicho efecto al VPA dando a suponer que se trataría de una sustancia antiepiléptica original.

Se ejemplifican algunos profármacos del VPA y si bien aun no están en la fase de comercialización, muchos de ellos se encuentran en etapa de ensayos clínicos.

Se diseñaron varios profármacos mediante la formación de monoésteres del VPA (figura 3.20). Un estudio de tres de ellos, valproato de etilo (Etil-VPA), valproato de tricloroetilo (Tricloroetil-VPA) y valproato de valproilo (Valproil-VPA)⁴¹ reveló que estos compuestos sufren una rápida y completa conversión en VPA después de la administración *i.v.* en perros. Pero la administración por vía oral del valproil-VPA presentó una biodisponibilidad parcial. Según los autores, estos profármacos no presentaron actividad anticonvulsivante en ratones quizás debido a una rápida bioconversión en VPA no rindiendo un perfil de liberación sostenida del VPA en el plasma.

En otro estudio donde analizan cinco profármacos de VPA⁴² por formación de ésteres con alcoholes alifáticos (figura 3.20) los cuales son: valproato de n-propilo (Propil-VPA), valproato de n-butilo (Butil-VPA), valproato de isobutilo (Isobutil-VPA), valproato de isoamilo (Isoamil-VPA) y el valproato de n-hexilo (Hexil-VPA), se encontraron que sufrían biotransformaciones completas los compuestos Propil-VPA, Butil-VPA y Hexil-VPA y biotransformaciones parciales los restantes en perros por la administración *i.v.* De los cinco ésteres solamente el Propil-VPA demostró actividad anticonvulsivante.

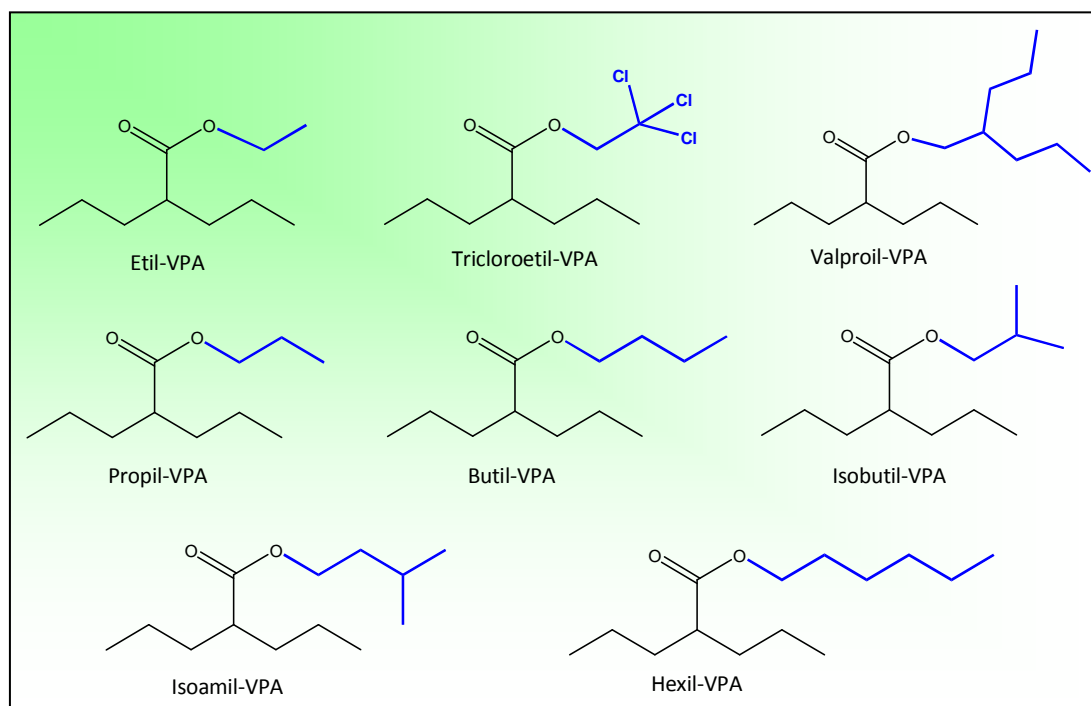


Figura 3.20. Monoésteres preparados a partir de VPA y alcoholes alifáticos.

Profármacos diseñados para liberar lentamente VPA en la circulación general tratando de lograr un aumento en la vida media del VPA son los ésteres de azúcares (glucosa y xilitol) preparados por Armand y col.⁴³ (Figura 3.21). Estos compuestos han demostrado poseer propiedades antiepilépticas propias, independientemente de la liberación del VPA. Asimismo, relacionan que el efecto de dichos ésteres del azúcar está relacionado a su liposolubilidad (a mayor valor de ésta mayor actividad). Así, el valproato de glucosa que es hidrosoluble es menos potente con respecto al valproato de dimetilidexilitol. Se encontraron resultados similares con los ésteres de VPA preparados con el manitol y con el di-O-isopropilidenmanitol los cuales mostraron efectos anticonvulsivantes no atribuibles al VPA ni al manitol haciendo suponer que estos derivados no actúan como profármacos del VPA sino que se trataría de una sustancia antiepiléptica original. Un estudio posterior sobre los compuestos relacionados a dichos ésteres⁴⁴ ha revelado que la variación en la posición del puente isopropilideno afecta la propiedad antiepiléptica.

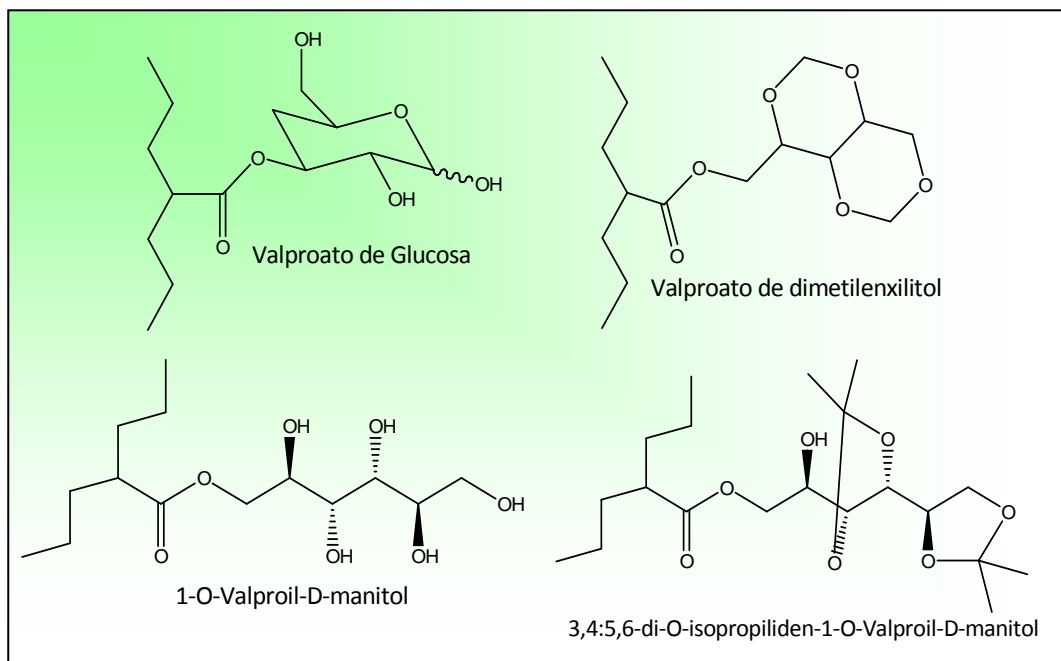


Figura 3.21. Profármacos del VPA utilizando un azúcar o derivados.

El DP-VPA (SPD421) es un novedoso fármaco anticonvulsivo conteniendo Ácido valproico unido covalentemente a un fosfolípido, (Figura 3.22) que se encuentra en desarrollo para el tratamiento de las convulsiones parciales y generalizadas. Se diseñó el DP-VPA para que pueda penetrar en el SNC, donde luego, mediante la acción de la enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂), libera VPA en el sitio de la convulsión. Existen estudios que demuestran que la actividad de las enzimas

Capítulo 3

fosfolipasas esta incrementada en neuronas asociadas con actividad epileptiforme antes de una convulsión. Se anticipa que el incremento en la lipofilidad del DP-VPA, comparada con el VPA, facilitará su pasaje a través de la barrera hematoencefálica y proveerá de una fuente de VPA para que sea localizado en el momento de la descarga epileptiforme. Esta localización puntual, regulada por la demanda permitirá un efectivo control de las convulsiones con baja exposición sistémica al VPA, de forma tal que reduzca el riesgo de efectos adversos⁴⁵.

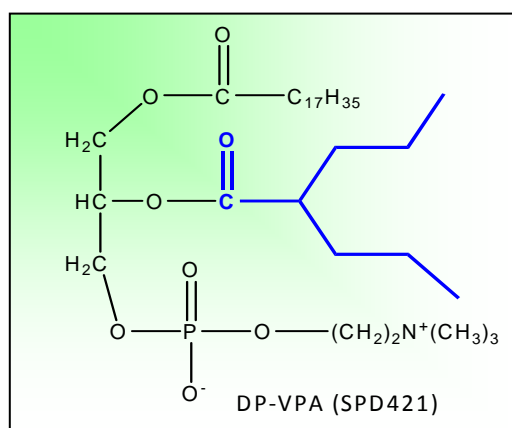


Figura 3.22. Profármaco del VPA y fosfolípido que se libera en un sitio específico.

Nueva tecnología en el diseño de Profármacos: Terapias de profármacos dirigidos por genes y anticuerpos.

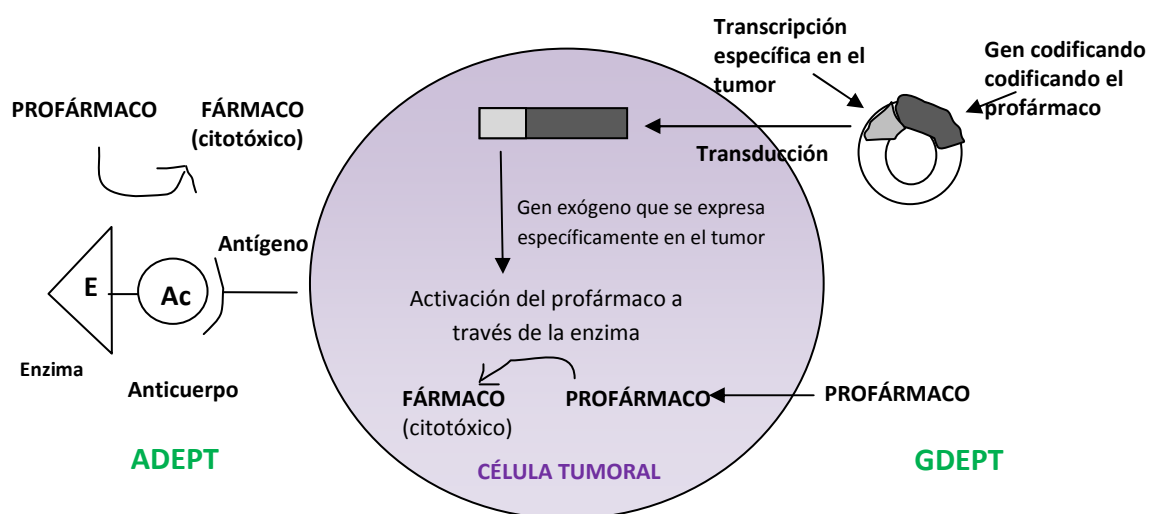
Paul Ehrlich, Premio Nobel de 1908, acuñó el término “bala mágica” para describir fármacos o terapias que selectivamente actúen en su sitio de acción con la mínima exposición para el resto del organismo. Él fue uno de los primeros en hablar acerca de un “receptor” en términos moleculares. Además, él también estudió el rol del metabolismo de fármacos en la activación de los mismos, en su gran trabajo sobre arsenicales. Efectivamente, el concepto de Ehrlich de bala mágica y su trabajo, fueron los precursores lo que hoy en día es la Terapia de Profármacos anticuerpo-enzima dirigida (ADEPT), Terapia de Profármacos gen-enzima dirigida (GDEPT) y profármacos en general.

La mayor parte de las enzimas endógenas tienen una generalizada distribución, la cual disminuye las posibilidades para una activación selectiva y, consecuentemente los blancos para el potencial uso de profármacos en el SNC. La activación de profármacos más selectiva en tejidos blancos puede ser alcanzada por enzimas exógenas que bioconvierten al profármaco y son localizadas a través de anticuerpos monoclonales, o generadas desde genes que codifican una enzima exógena. Estos desarrollos son los que se refieren a ADEPT y GDEPT, y son también conocidos como “terapia de genes suicida”, debido a que estas enzimas no son

regeneradas para un uso futuro (Esquema 3.10). Ambas son estrategias muy útiles para dirigir los profármacos hacia determinados blancos, especialmente hacia varios tipos de tumores⁴⁶.

Es posible dirigir los fármacos a células específicas a través de sus específicos ligandos de superficie utilizando la terapia de profármacos enzima dirigida por anticuerpo (ADEPT). Este desarrollo está siendo utilizado extensivamente para dirigir fármacos a células tumorales empleando una enzima que no está presente normalmente en el fluido extracelular o en la membrana celular, conjugada con un anticuerpo tumoral el cual la localiza en el tumor a través de la interacción del anticuerpo con un antígeno. Primeramente se administra el anticuerpo conjugado con la enzima, luego se eliminan de la circulación sistémica los anticuerpos conjugados que no se han unido, para después administrar el profármaco, el cual es específicamente activado por la enzima conjugada. La unión enzima anticuerpo conjugado asegura que el profármaco es convertido en el fármaco citotóxico sólo en el sitio del tumor de forma tal que se reduce la toxicidad sistémica. Un ejemplo de este desarrollo es la utilización de la enzima citosina deaminasa para generar 5-fluorouracil desde el profármaco 5-fluorocitosina, se incrementa 17 veces la localización del fármaco en el sitio del tumor en comparación a la administración del 5-fluorouracil solo.

El desarrollo de la GDEPT ha sido permitido gracias a la biología molecular que ha desarrollado la habilidad de transfectar células con genes suicidas. Estos genes suicidas codifican enzimas no humanas las cuales son utilizadas para convertir los profármacos en agentes citotóxicos. Las células son genéticamente modificadas para codificar genes específicos que se activan con la administración de un profármaco apropiado. Típicos genes suicidas incluyen la enzima timidin quinasa del herpes simple o la citosina deaminasa de la *Escherichia coli*.



Esquema 3.10. Esquema de ADEPT y GDEPT en un sitio de activación específico.

Capítulo 3

Conclusiones

El Mercado mundial para la prescripción de fármacos neuroterapéuticos se expandirá al menos en dos dígitos durante los próximos años para sobrepasar la marca de 28 mil millones de euros del año 2009. Esto se debe a los recientes avances en biotecnología y en las ciencias farmacéuticas, los cuales han ampliado enormemente el número de fármacos que están en desarrollo para el tratamiento de los desórdenes del sistema nervioso central (SNC)⁴⁶.

La barrera hematoencefálica presenta una barrera estructural y funcional importante para los fármacos que tienen blancos farmacológicos dentro del cerebro. Es por ello que una opción potencial para mejorar la llegada del fármaco al SNC está en la utilización de la tecnología de los profármacos, los cuales ya se han convertido en una parte integral de los procesos del diseño y de la localización el fármaco.

Por otra parte, se ha estimado que entre el 5-6% de todas los fármacos comercializados en todo el mundo son profármacos.

Sin embargo existe una fuerte creencia que justifica la idea de que los profármacos tienen el gran potencial para la localización de los fármacos en el SNC. Un mejor entendimiento de la biología molecular proporcionará ciertamente más claridad en los mecanismos de enzimas y de transportadores endógenos que existen en la BHE. Asimismo, un mejor entendimiento de la naturaleza multidimensional del diseño de profármacos, cuando localizamos profármacos dentro del SNC, es de crucial importancia para desarrollar profármacos del SNC.

Referencias del Capítulo 3

1. Kennedy, T., *Drug Discov. Today*, **1997**, 2, 436-444.
2. Albert, A., *Nature*, **1958**, 182, 421-422.
3. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J., *Adv. Drug Deliv Rev* **1997**, 23, 3-25.
4. Veber, D.; Johnson, S.R.; Cheng, H.Y.; Smith, B.R.; Wrad, K.W.; Kopple, K.D.; *J. Med Chem*, **2002**, 45, 2615-2623.
5. Ferres, H., *Drugs of Today*, **1983**, 19, 499-538.
6. Stella, V.J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1996**, 19, 111-114.
7. Stella, V.J., *Expert. Opin.*, **2004**, 14, 277-280.
8. Ehrnebo, M.; Nilsson, S.O.; Boreus, L.O., *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1979**, 7, 429-451.
9. Corsini, A.; Bellosta, S.; Baetta, R.; Fumagalli, R.; Paoletti, R.; Bernini, F., *Pharmacol. Ther.*, **1999**, 84, 413-428.
10. Greenwald, R.B.; Pendri, A.; Bolikal, D.; Gilbert, C.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 2465-2470.
11. Friedman, D.I.; Amidon, G.L., *Pharm. Res.*, **1989**, 6, 1043-1047.
12. Beauchamp, L.M.; Orr, G.F.; De Miranda, P.; Burnette, T.; Krenitsky, T.A., *Antiviral Chem. Chemother.*, **1992**, 3, 157-164.
13. Han, H.; De Vruh, R.L.; Rhie, J.K.; Covitz, K.M.; Smith, P.L.; Lee, C.P.; Oh, D.M.; Sadee, W.; Amidon, G.L., *Pharm. Res.*, **1998**, 15, 1154-1159.
14. Ding, T.L.; Benet, L.Z., *Drug. Metab. Dispos.*, **1979**, 7, 373-377.
15. Tunek, A.; Levin, E.; Svensson, L. A., *Biochem. Pharmacol.*, **1988**, 37, 3867-3876.
16. Barnett, H.J.M. et al., *Acetylsalicylic Acid*, Eds. Raven, New York, **1982**, 278.
17. Im, W.B.; Sih, J.C.; Blakeman, D.P.; McGarth, J.P., *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 4591-4597.
18. Pardridge, W.M., *Drug Discov. Today*, **2002**, 7, 5-7.
19. Lai, C.H.; Kuo, K.H., *Brain Res. Rev.*, **2005**, 50, 258-265.
20. Pascual-Garvi, J.M.; González-Llanos, F.; Prieto-Arribas, R.; Cerdán, S.; Roda, J.M., *Rev Neurol*, **2004**; 38, 565-81.
21. Pardridge, W.M., *Drug Discov. Today*, **2007**, 12, 54-61.
22. Oldendorf, W.H.; Hyman, S.; Braun, L.; Oldendorf, S.Z., *Science*, **1972**, 178, 984-986.
23. Bodor, N.; Buchwald, P., *Pharmacol. Ther.*, **1997**, 76, 1-27.
24. Bodor, N.; Buchwald, P., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1999**, 36, 229-254.
25. Prokai, L.; Prokai-Tatrai, K.; Bodor, N., *Med. Res. Rev.*, **2000**, 20, 367-416.

Capítulo 3

26. Brewster, M.E.; Estes, K.S.; Perchalski, R.; Bodor, N., *Neurosci. Lett.*, **1988**, 87, 277-282.
27. Palomino, E.; Kessel, D.; Horwitz, J.P., *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 622-625.
28. Brewster, M.E.; Anderson, W.R.; Webb, A.I., *Antimicrob Agents Chemother.*, **1997**, 41, 122-128.
29. Brewster, M.E.; Raghavan, K.; Pop, E.; Bodor, N., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **1994**, 38, 817-823.
30. Estes, K.S.; Brewster, M.E.; Simpkins, J.W.; Bodor, N., *Life Sci.*, **1987**, 40, 1327-1334.
31. Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J., *The AAPS Journal*, **2008**, 10.
32. Drewes, L.R.; Betz, A.L. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1993**, Plenum Press, New York.
33. Pardridge, W.M., *Physiol. Rev.*, **1983**, 63, 1481-1535.
34. Loscher, W.; Potschka, H., *Prog. Neurobiol.*, **2005**, 76, 22-76.
35. Baas, H.; Zehrden, F.; Selzer, R.; Kohnen, R.; Loetsch, J.; Harder, S., *Clin. Pharmacokinet.*, **2001**, 40, 383.
36. Anderson, B.D., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1996**, 19, 171-202.
37. Polt, R.; Porreca, F.; Szabo, L.Z.; Bilsky, E.J.; Davis, P.; Abbruscato, T.J.; Davis, T.P.; Harvath, R.; Yamamura, H.I.; Hruby, V.J. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1994**, 91, 7114-7118.
38. Shek, E.; Murakami, T.; Nath, C.; Pop, E.; Bodor, N., *J. Pharm. Sci.*, **1989**, 78, 837-843.
39. Scriba, G.K.; Lambert, D.M.; Poupaert, J.H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **1995**, 47, 197-203.
40. Bonina, F.P.; Arenare, L.; Palagiano, F.; Saija, A.; Nava, F.; Trombetta, D.; De Caprariis, P., *J. Pharm. Sci.*, **1999**, 88, 561-567.
41. Badir, K.; Haj-Yehia, A.; Vree, T.B.; Van der Kleijn, E.; Bialer, M., *Pharm. Res.*, **1991**, 8, 750-753.
42. Hadad, S.; Vree, T.B.; Van der Kleijn, E.; Bialer, M., *J. Pharm. Sci.*, **1992**, 81, 1047-1050.
43. Armand, V.; Louvel, J.; Pumain, R.; Ronco, G.; Villa, P., *Epilepsy Res.*, **1995**, 22, 185-192.
44. Redecker, C.; Altrup, U.; Hoppe, D.; Hense, T.; Kreier, A.; Rabe, A.; Dusing, R.; Speckmann, E.J., *Neuropharmacology*, **2000**, 39, 267-281.
45. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Loiseau, P.; Perucca, E. EILAT VI, *Epilepsy Research*, **2002**, 51, 31-71.
46. Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J., *The AAPS Journal*, **2008**, 10, 92-102.

Capítulo 4

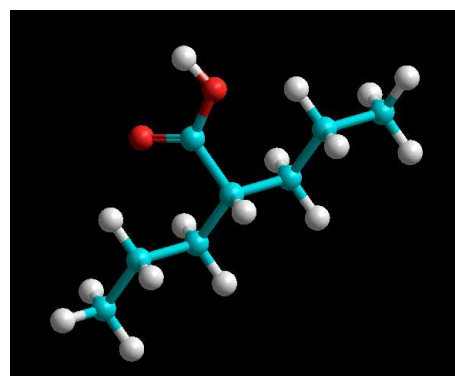
Ácido Valproico y *Myo*-inositol

Introducción

En coincidencia a lo expuesto en el Capítulo 2, donde se expuso las serias limitaciones que presentan los fármacos anticonvulsivos actualmente en uso en clínica, tales como problemas de toxicidad, pérdida de vocabulario, inducción al suicidio, farmacorresistencia, etc., se observa la realidad de proponer compuestos orientados a una mejora de la actividad y seguridad de los mismos. Una alternativa válida, como integrante de un país subdesarrollado, es la de abordar desde el ambiente académico, el tema de profármacos. No sólo por la tendencia mundial a hacer uso de ese recurso cuando un compuesto presenta un buen perfil farmacológico pero posee alguna de las características enunciadas en el Capítulo 3, sino, por las características socio-económicas de nuestra región. Nuestros países no cuentan con los recursos económicos y desarrollos tecnológicos que permitan hacer un desarrollo completo de un nuevo fármaco. Motivo por el cual se aborda el tema de desarrollo de profármacos. Enunciado este marco de trabajo, lo que se propuso para el desarrollo de un profármaco anticonvulsivo, fue considerar como estructura anticonvulsiva, sobre la cual trabajar, al Ácido Valproico. Por otro lado, en la búsqueda de un transportador eficaz, no tóxico sobre el cual se pudiera asociar el Ácido Valproico, se tuvo en cuenta para ello la experiencia sobre esta temática que existe en la Cátedra de Química Medicinal, especialmente por la patente sobre fármacos (US 7763650, Julio 2010) realizada por dicho grupo, siendo la primera aprobada en los más de 100 años de existencia de la Carrera de Farmacia de la UNLP. Esta circunstancia, incluido lo que se presentará más adelante, motivó a que se optara por usar el *myo*-inositol como transportador. Estos requerimientos enunciados anteriormente, serán expuestos más extensamente en el presente capítulo.

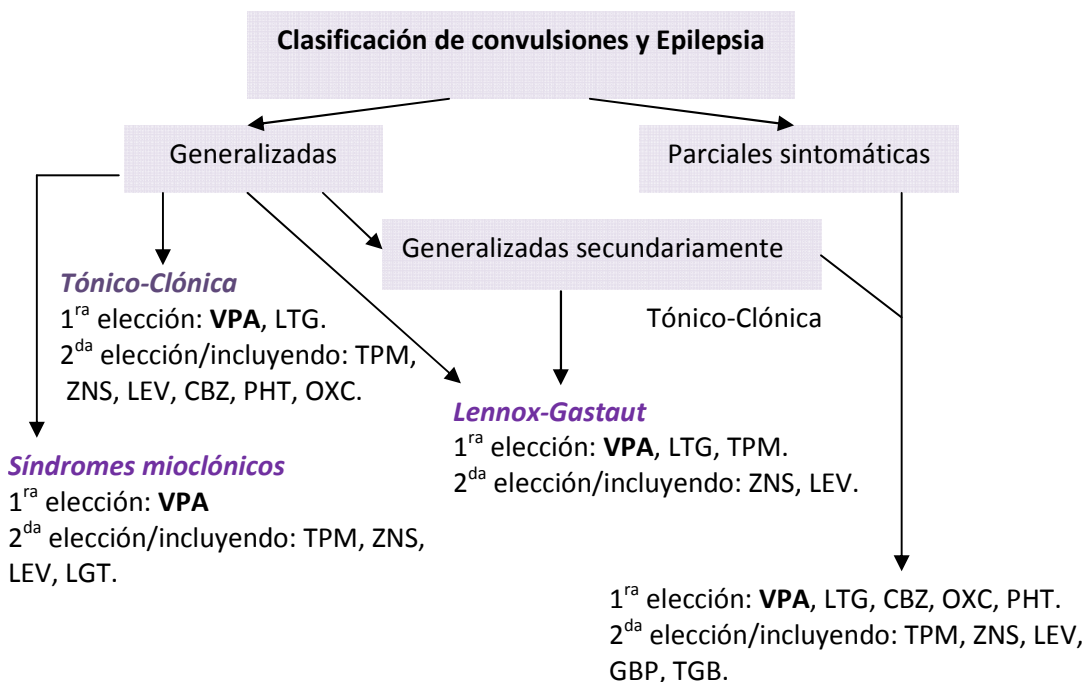
Elección del fármaco: Ácido Valproico (VPA)

El Ácido Valproico (VPA) es un anticonvulsivante único. Su simple estructura de ácido graso ramificado difiere marcadamente de las estructuras de anillos heterocíclicos comunes de los otros anticonvulsivos. A pesar de numerosos estudios, el fundamento de su actividad continúa aun hoy desconocido. Burton fue el primero en sintetizar este ácido en 1882. No se conocía su uso en clínica hasta que su actividad anticonvulsiva fue descubierta



fortuitamente (serendipity) en 1963. Fue Meunier, quien trabajando en el laboratorio de Carraz, uso el ácido N-dipropilacético (ácido valproico) como vehículo para disolver un compuesto que estaba siendo ensayado su actividad anticonvulsiva. Los resultados que obtuvieron llevaron a que se testeara el ácido valproico confirmando que éste protegía contra las convulsiones inducidas por el pentilenetetrazol (PTZ). Los primeros ensayos clínicos de la sal de sodio del VPA fueron reportados en 1964 por Carraz. El VPA fue comercializado en Francia en el año 1967 con el nombre de Depakene® y luego fue comercializado para el tratamiento de la epilepsia en Estados Unidos en el año 1978. Desde su comercialización en el año 1967 en Francia y la aprobación por la FDA en 1978, el VPA fue establecido en el mundo (en más de 100 países) como uno de los FAEs más usados en el tratamiento de las convulsiones parciales y generalizadas tanto en niños como en adultos. Su amplio espectro de eficacia antiepiléptica está reflejado en los modelos preclínicos *in vivo* e *in vitro*.

El VPA es considerado como un FAE de primera elección para muchas formas de las epilepsias generalizadas tanto idiopáticas como sintomáticas (Esquema 4.1).¹ Estos síndromes, al estar asociados con múltiples tipos de convulsiones, incluyendo convulsiones tónico-clónico, convulsiones mioclónicas y de ausencia, la prescripción de un FAE de amplio espectro como el VPA presenta una clara ventaja para el tratamiento de esta situación.²



Esquema 4.1. En el esquema se muestra la estrategia de tratamiento con FAEs, puede observarse que el VPA es un FAE de primera elección para muchas formas de epilepsia. (TPM: Topiramato, ZNS: Zonizamida, LEV: Levetiracetam, CBZ: Carbamazepina, PHT: Fenitoína, OXC: Oxcarbazepina, LTG: Lamotrigina, GBP: Gabapentin, TGB: Tiagabina).

A pesar de los efectos beneficiosos, la terapia con VPA no está librada de los efectos adversos ya que éste está asociado principalmente a dos efectos secundarios que son la hepatotoxicidad y la teratogenicidad. Para tratar de resolver este problema muchos autores han estudiado los distintos derivados del VPA, siendo estos: metabolitos del VPA, análogos del VPA, variación en el grupo funcional. A pesar del intento de encontrar un compuesto derivado del VPA más activo, no se ha logrado obtener un metabolito o un análogo del VPA con un índice protectivo (IP) superior.³

Elección del fármaco líder

Las razones para elegir al VPA como fármaco antiepiléptico para el diseño y síntesis de potenciales profármacos son las siguientes:

- Desde el punto de vista químico es una molécula estructuralmente muy simple, posee un grupo funcional que es un ácido monocarboxílico lo cual permite fáciles pero limitadas transformaciones químicas a otras funciones.
- Posee amplio espectro de actividad anticonvulsivante. El VPA es un fármaco antiepiléptico de primera elección para el tratamiento de convulsiones parcial y generalizada, tanto para niños como en adultos.⁴
- A diferencia de otros fármacos antiepilépticos el VPA podría ejercer efectos antiepileptogénicos.⁵
- Aunque posee efectos adversos como todos los otros FAEs, es relativamente uno de los más seguros y ya lleva más de 5 décadas de uso clínico.

Los resultados de los datos clínicos revelan que cuando se compara la efectividad del VPA con los distintos FAEs clásicos en tres distintos tipos de convulsiones (convulsiones parciales y tónico-clónico generalizado, convulsiones mioclónicas y convulsiones generalizada de ausencia) se observa una clara ventaja del VPA con respecto a los otros FAEs (ver Tabla 4.1).⁶

Fármaco	Epilepsia Humana							
	Convulsiones Parciales		Convulsiones parciales envolviendo conv. generalizadas	Convulsiones Generalizadas				
	Simples	Complejas		a) Conv. tónico-clónica	Conv. de ausencia	Conv. mio-clónica	Sind. Lennox Gastaut	Sind. de West
CBZ	+++	+++	+++	+++	NE	NE	NE	NE
PHT	+++	+++	+++	+++	NE	NE	NE	NE
PB	+++	+++	+++	+++	NE	++	NE	NE
PRM	+++	+++	+++	+++	NE	++	NE	NE
VPA	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++
ESM	NE	NE	NE	NE	+++	++	NE	NE
BNZ ^b	++	++	++	++	+	+	++	+

Tabla 4.1.- Espectro de actividad clínica en FAEs clásicos o de primera generación. Eficacia anticonvulsivante o antiepiléptica: +, baja; ++, media; +++, alta; NE, no efectivo. a) comprende convulsiones tónico-clónico generalizadas, convulsiones tónicas generalizadas y convulsiones clónicas generalizadas; b, pérdida de eficacia durante un tratamiento crónico. Abreviaturas: CBZ, carbamazepina; PHT, fenitoína; PB, fenobarbital; PRM, primidona; VPA, ácido valproico; ESM, etosuccimida; BNZ, benzodiacepina.

Este estudio que presenta el VPA es igualado solamente por las benzodiacepinas en cuanto a la amplitud del espectro de la actividad. A su vez, se puede apreciar la ventaja del VPA con respecto a las benzodiacepinas ya que éstas pierden eficacia durante un tratamiento crónico.⁷

La ventaja del VPA en cuanto a la amplitud del espectro de actividad antiepiléptica con respecto a otros FAEs no solamente se limita a los FAEs clásicos mencionados en la tabla anterior ya que ninguno de los FAEs clínicamente aprobados durante la década de los noventa presentan una actividad antiepiléptica o anticonvulsiva tan amplia como el VPA.⁸ En la tabla 4.2. puede observarse las actividades anticonvulsivantes de los FAEs novedosos y del VPA en los modelos de epilepsia humana.

Fármaco	Eficacia clínica			
	Convulsiones parciales	Convulsiones generalizadas		
		Tónico-clónica	ausencia	mioclónica
Ácido Valproico	E	E	E	E
Lamotrigina	E	E	E	E
Topiramato	E	E	I	E
Oxcarbazepina	E	E	-	I
Felbamato	E	E	I	E
Vigabatrin	E	-	NE	NE
Tiagabina	E	E	NE	NE
Gabapentin	E	-	NE	NE
Levetiracetam	E	-	-	I
Zonisamida	E	E	E	E

Tabla 4.2.- Espectro de actividad clínico del VPA y FAEs de segunda generación. Los efectos son indicados por E, efectivo; I, datos inconsistentes; NE, no efectivo; -, datos no disponibles (o no encontrados). Abreviaturas: VPA, ácido valproico; LTG, lamotrigina; TPM, topiramato; OXC, oxcarbazepina; FBM, felbamato; VGB, vigabatrin; TGB, tiagabina; GBP, gabapentina; LEV, levetiracetam; ZNS, zonisamida.

Propiedades fisicoquímicas del VPA

VPA (ácido 2-propilpentanoico) es un líquido incoloro con un punto de ebullición de 221-222 °C a 1 atm. Su peso molecular es de 144,21. Es levemente soluble en agua (1,3 mg/ml) y muy soluble en solventes orgánicos. Presenta una absorción ultravioleta máxima a 213 nm con un coeficiente de extinción molar de 86. El pK_a del VPA es de 4,8.

EL VPA es usado generalmente como su sal sódica. El Valproato de Sodio es un sólido blanco cristalino y es altamente higroscópico. Su peso molecular es de 166,19. Es extremadamente soluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos polares como metanol y acetona. Las sales de calcio y magnesio del VPA son insolubles en agua.

Farmacocinética

El VPA se absorbe con rapidez y por completo después de la administración oral convencional (exceptuando las formulaciones de liberación prolongada). La concentración plasmática máxima se llega a alcanzar entre una a cuatro horas. El grado de fijación a proteínas plasmáticas suele ser de 90%, pero la fracción fija se reduce (hasta 70%) al incrementarse la concentración total del VPA dentro de los

límites terapéuticos. El VPA casi no se excreta sin cambios por orina o heces. Cuando se proporciona a dosis terapéuticas, la mayor parte del medicamento se convierte en el éster conjugado del ácido glucurónico, en tanto que el resto queda a cargo del metabolismo mitocondrial (tanto oxidación β como oxidación ω). Algunos de estos metabolitos, en particular el ácido 2-propil-2-pentenóico y el ácido 2-propil-4-pentenóico, (figura 4.1) son anticonvulsivos casi tan potentes como el compuesto de partida; sin embargo solo el primero (ácido 2-en-valproico) se acumula en plasma y en el encéfalo en un grado potencialmente importante. La vida media del VPA es de 15 hs.

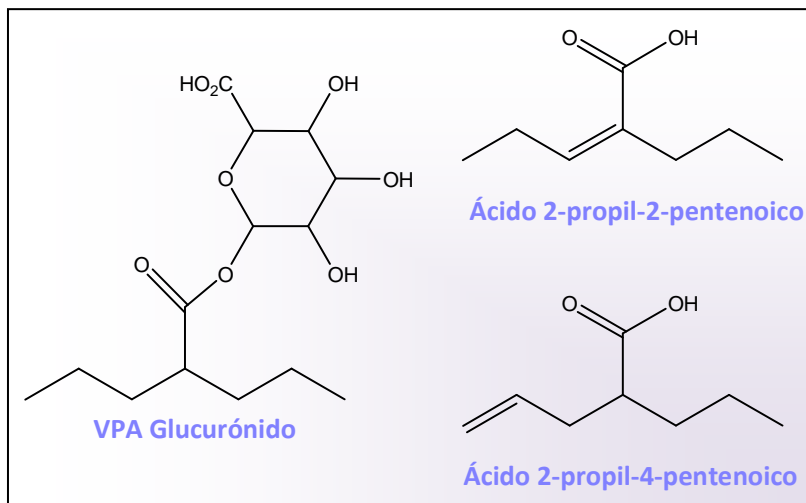


Figura 4.1. Metabolitos del VPA.

Actividad del VPA en modelos experimentales

Estudios experimentales en ensayos clásicos de determinación de la actividad anticonvulsiva reportan que el VPA presenta protección frente a las convulsiones ocasionadas por el MES y PTZ test (estos ensayos se detallan en el Capítulo 6) en ratas, conejos y perros con un índice terapéutico (DL_{50}/DE_{50}) de 4 a 8 veces. En general VPA es más efectivo contra las convulsiones inducidas por PTZ (un modelo de crisis de ausencia) que por las convulsiones inducidas en MES (un modelo de crisis generalizadas tónico-clónicas). El VPA también es efectivo en otros modelos de convulsiones generalizadas. Por ejemplo, a dosis de 40 a 400 mg/kg i.p. (intraperitoneal), este protege contra las convulsiones inducidas por bicuculina, ácido kaínico, estricnina, ovabaína y nicotina.⁹ Así estos ensayos sugieren que el VPA tiene máxima efectividad en crisis de ausencia y muy buena eficacia contra convulsiones tónico-clónicas.

Mecanismo de acción.

Aunque el VPA posee una estructura de un simple ácido carboxílico ramificado, presenta un amplio espectro de actividad contra diferentes tipos de convulsiones. Aún su mecanismo de acción no fue dilucidado por completo pero es claro que envuelve una combinación de varios tipos de mecanismos que se describen a continuación.

- Efectos sobre excitabilidad o inhibición.

Experimentos sobre los cultivos de neuronas de ratones indican que las respuestas neuronales a la glicina o a los aminoácidos excitatorios, tales como el glutamato, no son alterados por el VPA en concentraciones clínicamente relevantes.¹⁰ Sin embargo, se logró demostrar que el VPA suprime las respuestas del glutamato y mucho más potentemente a la despolarización pasajera evocada por NMDA en la neocorteza de rata.¹¹ Los autores sugieren que la excitación mediada por la atenuación de los receptores de NMDA es un esencial modo de acción para el efecto anticonvulsivante del VPA. Esta perspectiva está comprobada por un número de trabajos que usaron diferentes preparaciones para el estudio de respuestas sinápticas mediadas por NMDA, un subtipo de los receptores del glutamato.¹⁰ En todos los estudios, el VPA bloqueó estas respuestas, indicando que el antagonismo de los receptores de NMDA mediados por la excitación neuronal puede ser un importante mecanismo del VPA.

- Efectos sobre los canales iónicos.

El VPA ha demostrado que reduce los potenciales de acción de la descarga de alta frecuencia repetitiva en neuronas centrales a concentraciones menores que aquella necesaria para deprimir la actividad neuronal normal. Se ha sugerido que este efecto puede estar envuelto críticamente en la acción anticonvulsivante del fármaco sobre las convulsiones generalizadas tónico-clónica.

✓ Canales de sodio.

El VPA demora totalmente la recuperación de los canales de sodio de la inactivación, lo cual sería consistente con una reducción de la conductancia del sodio. Estudios usando preparados de invertebrados también indicaron que el VPA tiene un efecto inhibitorio directo sobre los canales de sodio sensibles al voltaje.¹⁰ Sin embargo, el concepto de que el principal efecto anticonvulsivante del VPA está

mediado por retardar la recuperación de la inactivación de los canales de sodio voltaje dependiente, ha sido cuestionado.

✓ *Canales de potasio.*

Un efecto activador sobre la conductancia del potasio ha sido muy discutido como un potencial mecanismo de acción del VPA aunque tal efecto solamente ha sido demostrado a altas concentraciones de este fármaco. Experimentos previos usando varios subtipos de los canales de potasio del cerebro de un vertebrado, expresados en los oocitos de *Xenopus laevis* han demostrado que el efecto del VPA sobre las corrientes de potasio es demasiado pequeño para ser significativo en su mecanismo de acción anticonvulsivante.¹²

✓ *Canales de calcio.*

Con respecto a los canales de calcio, los fármacos anti-ausencia tales como la etosuccimida y dimetadiona (el mayor metabolito activo de la trimetadiona) han demostrado que bloquean la activación de los canales de calcio de tipo-T dependientes del uso en las neuronas talámicas, los cuales están implicados en la generación de la actividad "spike-wave" con la epilepsia de la ausencia. Sin embargo, el VPA no afecta esta corriente T en las neuronas talámicas, aunque es tan efectivo como la etosuccimida en el bloqueo de las convulsiones de ausencia. En contraste de las neuronas talámicas, el VPA ha demostrado que bloquea los canales de calcio de bajo umbral T en las neuronas ganglionares periféricas.¹³

- Efectos bioquímicos.

El estudio del mecanismo de acción del VPA desde el punto de vista bioquímico está muy estudiado en relación al sistema gabaérgico. Hay reportes que datan desde 1969 de que el VPA eleva los niveles de ácido γ -aminobutírico (GABA) cerebral en los roedores y que el periodo de elevación de los niveles de GABA coincide con la protección contra las convulsiones. Estos y más resultados han hecho que el estudio del efecto de VPA sobre el sistema gabaérgico ocupe un lugar muy importante.¹⁴ Es importante destacar que, aunque el VPA actúa sobre los niveles de GABA, está claro que el amplio efecto anticonvulsivante del VPA se debe a más de un mecanismo y que son distintos a las que presentan los denominados fármacos GABA miméticos (tiagabina y vigabatrina) que afectan selectivamente al sistema gabaérgico siendo estos inactivos contra las convulsiones generalizadas de ausencia y en mioclónica, en contraste al VPA.

✓ *Efectos sobre el sistema GABA.*

Existen controversias sobre el efecto del VPA en el sistema gabaérgico así, como efecto bioquímico agudo, se ha demostrado que el VPA aumenta los niveles

en el cerebro del neurotransmisor inhibitorio GABA probablemente inhibiendo a la enzima semialdehído succínico deshidrogenasa, aumentando los niveles del cerebro de semialdehído succínico, un metabolito que inhibe la enzima GABA aminotransferasa previniendo así el catabolismo de GABA.¹⁵

Aunque existe una evidencia sustancial de que el VPA aumenta los niveles del GABA a dosis clínicamente relevantes,¹⁶ tanto el mecanismo y el significado funcional de dicho incremento en los niveles de GABA en el cerebro es todavía una materia de debate. El aumento de los niveles de GABA presináptico inducido por VPA puede ser explicado por 3 mecanismos diferentes:

- Un efecto inhibitorio de VPA sobre la degradación de GABA.
- Un aumento en la síntesis del GABA.
- Un incremento de GABA en las terminaciones nerviosas mediante un efecto indirecto.

Usos clínicos.

Tratamiento de la epilepsia.

El mayor uso de VPA es en la terapia farmacológica de convulsiones epilépticas. Los estudios clínicos y extensas experiencias clínicas en las últimas décadas han demostrado que el VPA es efectivo en el tratamiento de varios tipos de convulsiones. Así, el VPA es utilizado como monoterapia o como adyuvante junto a otros FAEs. El VPA también ha demostrado eficacia en el tratamiento de espasmos infantiles (Síndrome de West), Síndrome de Lennox-Gastaut, convulsiones febriles y en el estado epiléptico. Debido a su amplio espectro de actividad anticonvulsivante y su tolerabilidad, el VPA está establecido como fármaco de primera elección en pacientes con un amplio rango de tipos de convulsiones.¹⁷

Otras indicaciones clínicas.

En adición al tratamiento de la epilepsia, el uso de VPA está en aumento para el tratamiento de otras enfermedades, entre ellas se incluyen desorden bipolar, migraña, desórdenes psiquiátricos y dolores neuropáticos. El VPA ha mostrado ser efectivo en pacientes con desórdenes bipolares y esquizoafectivo, incluyendo a aquellos que son resistentes al litio y a la carbamazepina.¹⁸ Además, la acumulación de evidencias da cuenta de que el VPA puede tener un espectro de eficacia más amplia con respecto al litio en cuanto al tratamiento de manía atípica y en la manía secundaria ya que el segundo aparece como poco eficaz clínicamente. El VPA reduce indirectamente la actividad de la quinasa 3-glicógeno sintetasa (GSK-3), una proteína quinasa multifuncional implicada en la fosforilación de un importante

número de factores de transcripción y proteínas citoesqueléticas.¹⁹ El VPA, CBZ y la GBP también son considerados efectivos para el tratamiento de dolores neuropáticos crónicos. En la migraña, el VPA ha mostrado ser efectivo en el tratamiento profiláctico en varios ensayos clínicos controlados.

En la actualidad se desarrollan numerosas investigaciones acerca del efecto antitumoral del VPA, el cual es el único inhibidor de la enzima histona deacetilasa (implicada en el desarrollo de las células tumorales) clínicamente disponible. Se ha

demostrado que el VPA es un potente agente antiproliferativo en células cancerosas estrógeno sensibles en cáncer de mama.²⁰ Además se ha demostrado que el VPA y los VPA-análogos modulan la célula del tumor induciendo apoptosis de la proliferación y de la diferenciación, y disminuyen el

La acetilación de histonas nucleosomales juega un importante rol en la expresión de genes y por consiguiente afecta la función, diferenciación, y proliferación de la propia célula. El estado de acetilación de las histonas se determina por la actividad de las enzimas llamadas Histona Acetiltransferasa (HAT) e Histona Deacetilasa (HDAC). Se ha identificado una actividad alterada de HAT y HDAC en varios tipos de cáncer.²²

potencial de metástasis y la angiogénesis.²¹ Un número de estudios in vitro demuestran que los tipos de células tumorales susceptibles a VPA están aumentando constantemente. Lo más importante es la actividad antineoplástica fuerte que demuestra el VPA en células cancerosas quimiorresistentes. Por esta razón, varios ensayos clínicos y estudios preclínicos están investigando actualmente la efectividad del VPA como un agente anticancerígeno en monoterapia o en combinación con otros regímenes terapéuticos.

Efectos adversos.

El VPA es bien tolerado en la mayoría de los pacientes. Pero como todo fármaco no está libre de los efectos adversos. En comparación con otros FAEs utilizados ampliamente el VPA posee menores efectos neurológicos y dermatológicos, así por ejemplo, el VPA presenta menor frecuencia de erupciones cutáneas que la fenitoína, fenobarbital y primidona mientras que la tolerabilidad y la seguridad parece ser similares a la que presenta la carbamazepina. Así, los efectos adversos más comunes que puede presentar el tratamiento con el VPA son: temblores relacionados con la dosis, aumento del peso debido a la estimulación del apetito, alopecia (usualmente temporal) e irregularidades menstruales incluyendo amenorrea. Sin embargo, el VPA está asociado con dos severos, aunque raros efectos tóxicos que son la hepatotoxicidad y la teratogenicidad. La hepatotoxicidad fatal tiene una incidencia de aproximadamente 1 en 15.000 y ocurre más frecuentemente en pacientes menores a dos años de vida y que reciben politerapia.

Con respecto a la teratogenicidad, este efecto hace que se generen anomalías congénitas tales como dismorfismo facial, defectos del tubo neural y múltiples malformaciones. Estos efectos parecen estar relacionados con la dosis.

Estudios de la relación Estructura-Actividad²³ marcaron elementos estructurales de la molécula de VPA que son responsables de su actividad anticonvulsiva así como de su teratogenicidad y hepatotoxicidad, considerando que la teratogenicidad asociada al VPA se debe al ácido carboxílico y la ramificación del VPA (figura 4.2. marcado en azul) y que la hepatotoxicidad del VPA es debida a metabolitos con un doble enlace terminal (figura 4.2 marcado en verde), por ejemplo 4-ene-VPA o 2,4-diene-VPA.

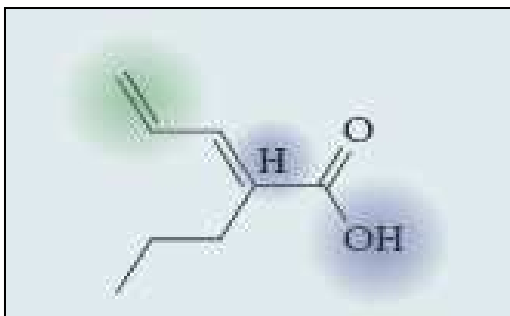


Figura 4.2. Requerimientos estructurales para el VPA asociados a su teratogenicidad y hepatotoxicidad.

El *Diseño Racional de Fármacos* aplicados en el campo de los profármacos, necesita contar con un conjunto apreciable de derivados posibles. A mayor número de derivados, mayor será la información que nos aporta, lo cual permitiría llegar a conclusiones basadas en una mayor certeza.

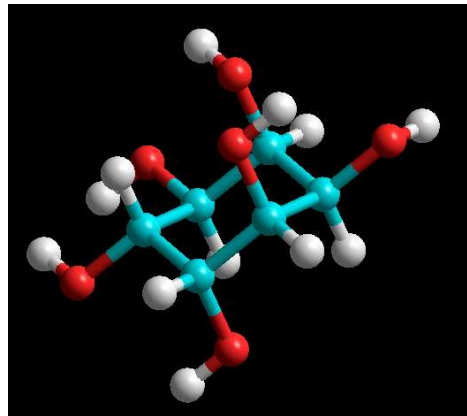
El diseño de fármacos de segunda generación del VPA es motivado por principios farmacocinéticos y farmacodinámicos que apuntan a: 1) aumentar el pasaje al cerebro; 2) mejorar la potencia anticonvulsiva comparada con el VPA; 3) eliminar la teratogenicidad; y /o 4) evitar la formación de metabolitos tóxicos responsables por la hepatotoxicidad asociada al VPA.

Además del análisis racional científico y clínico antes expuesto, existe un fuerte incentivo económico para el desarrollo de fármacos de segunda generación del VPA. Con ventas mundiales anuales que exceden el billón de dólares, el VPA es un blanco particularmente muy atractivo para futuros desarrollos.^{23,24}

Elección del modulador: *Myo*-inositol

Porque *myo*-inositol?

El diseño de profármacos es una metodología muy compleja dada la cantidad de variables biológicas que se encuentran involucradas. Cuando se diseña un profármaco, es importante asegurar que el profármaco sea efectivamente convertido en fármaco una vez absorbido o localizado en el sitio de acción. Un profármaco ideal es aquel que reúne distintos requerimientos siendo uno de ellos, que el grupo modulador no sea tóxico y tampoco sus metabolitos.



Para ello como grupo modulador se eligió al *myo*-inositol, una molécula fisiológica que posee transportadores a nivel de la membrana hematoencefálica. Debido a la naturaleza fisiológica del *myo*-inositol se justifica el uso del mismo como grupo modulador del Ácido Valproico, con el propósito de localizar este fármaco en el lugar de acción.²⁵ Además es un poliol, este hecho nos permite la síntesis dirigida de uno a seis ésteres del ácido valproico adicionándole la ventaja de que los mismos sean hidrolizados in vivo por las esterasas presentes en el organismo.

A su vez los ésteres del VPA unidos al *myo*-inositol podrían favorecer el pasaje de VPA a través de la barrera hematoencefálica con respecto al VPA por dos motivos, i) valiéndonos del transportador del *myo*-inositol presente en el cerebro ii) el incremento de la hidrofobicidad de la molécula formada al ser convertidos los OH en funciones ésteres. Por estos motivos, se decide plantear la preparación de ésteres de ácido valproico utilizando el *myo*-inositol como grupo modulador, destacándose que si se logra que los profármacos diseñados cumplan con estas características enunciadas, estaríamos ante una disminución real de la dosis terapéutica, y se lograría disminuir los efectos adversos que posee el ácido valproico.

Inositoles

Los inositoles o ciclitoles son derivados del ciclohexano en los cuales un hidrógeno de cada carbono ha sido reemplazado por un grupo hidroxilo. Así el Inositol o ciclohexano-1,2,3,4,5,6-hexol es un compuesto químico cuya fórmula es $C_6H_{12}O_6$ o $(-CHOH-)_6$.

Los seis grupos hidroxilos secundarios del Inositol pueden acomodarse para dar nueve estereoisómeros en los cuales puede variar desde no contar con un grupo

axial hasta tener tres grupos axiales. Los prefijos utilizados para referirnos a los mismos son: *scyllo-* (no posee OH axial), *myo-* (posee 1 OH axial); *neo-*, *epi-*, *D-chiro-*, *L-chiro-* (poseen 2 OH axial); *cis-*, *muco-*, y *allo-* (poseen 3 OH axial). De estos, cinco estereoisómeros (*scyllo*, *myo*, *D-chiro*, *L-chiro* y *neo*) se encuentran en la naturaleza y los cuatro estereoisómeros restantes (*allo*, *cis*, *epi* y *muco*) son estructuras no naturales provenientes de síntesis (figura 4.3)²⁶.

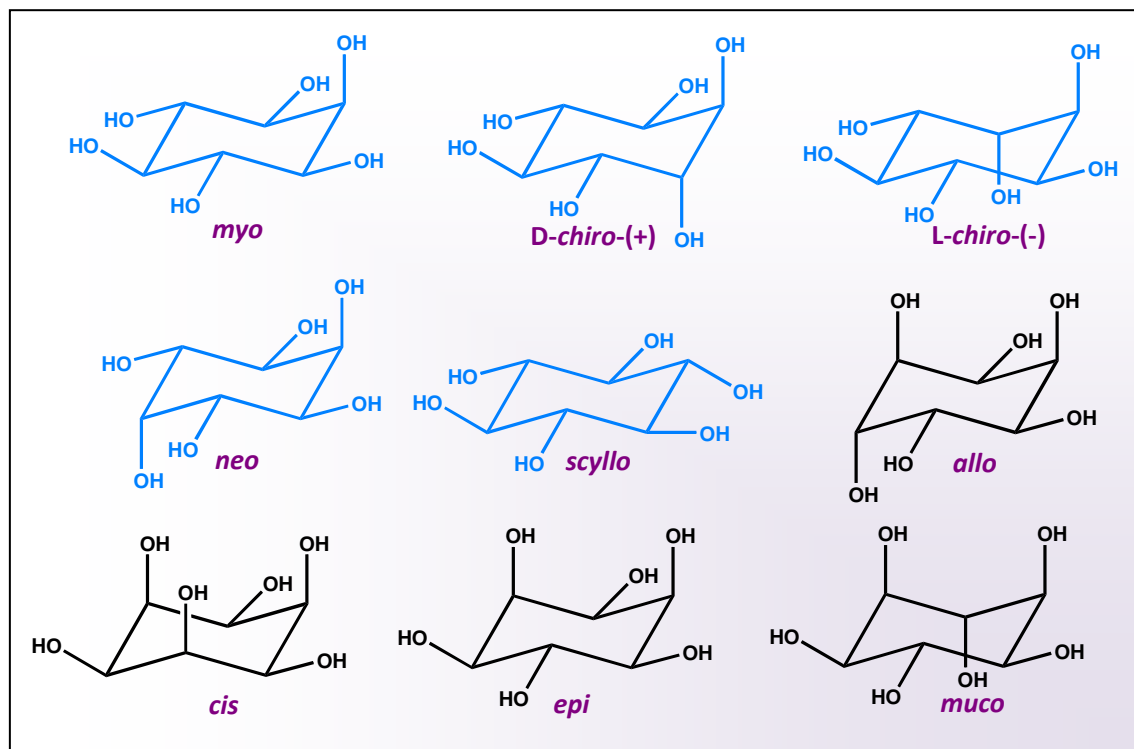


Figura 4.3. Nueve estereoisómeros del inositol. Los de color azul son inositoles naturales. El *D-chiro*-inositol y el *L-chiro*-inositol son enantiómeros (ópticamente activos).

De estos nueve estereoisómeros, siete son ópticamente inactivos o meso y dos formas son ópticamente activas (*D-chiro* y *L-chiro*). A pesar de que varios inositoles se encuentran en la naturaleza, el más abundante es el *myo*-inositol y es el único estereoisómero que se encuentra en los fosfolípidos. Se desconoce la razón por la cual la naturaleza ha seleccionado la estructura *myo-* para sus moléculas, uno de los argumentos más fuerte sugiere a que es el único estereoisómero que contiene un solo hidroxilo axial con lo cual poseería el número correcto de sitios estereoselectivos para un ataque enzimático.²⁷

Myo-inositol

El *Myo*-inositol fue primeramente aislado como un compuesto químico en 1850 y luego se encontró que es uno de los nueve estereoisómeros del compuesto:

ciclohexano-1,2,3,4,5,6-hexol. *Myo*-inositol es el más abundante de estos isómeros y convencionalmente se lo nombra inositol. El *myo*-inositol es un compuesto ampliamente distribuido en plantas y animales. Es un factor de crecimiento para animales y microorganismos. El *myo*-inositol está presente en todos los tejidos animales, con niveles más altos en el corazón y en el cerebro, éste es parte de todas las membranas (revestimientos externos) de las células y tiene la función de ayudar al hígado a procesar las grasas así como a contribuir al funcionamiento de los músculos y los nervios. La dieta alimentaria provee alrededor de 1 g/por día de *myo*-inositol. Otros 4 g/día son sintetizados a partir de glucosa. Las relativamente altas concentraciones de inositol en el cerebro, fueron reconocidas en 1934, sugiriendo una importancia funcional. Desde 1940 se ha demostrado que los lípidos de inositol son marcadamente activos metabólicamente y, más recientemente, que ellos son componentes de un sistema de señales de transducción mediado por fosfoinositol. La concentración de inositol en células neurales es aproximadamente de 2 a 500 veces más alta que en plasma. Alguna vez, el *myo*-inositol, fue clasificado como miembro del complejo de vitaminas B, sin embargo, como éste es producido por el cuerpo humano desde la glucosa, no es un nutriente esencial. Así mismo juega un rol muy importante como base estructural de segundos mensajeros en células eucariotas.

Se obtiene comercialmente del licor de maíz, porque el *myo*-inositol está presente como hexafosfato de *myo*-inositol (InsP₆, ácido fítico) en el maíz. El ácido fítico es uno de los fosfatos de *myo*-inositol más antiguos que se conocen y ha demostrado ser un agente anticancerígeno promisorio.²⁸

El *myo*-inositol (***cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-ciclohexanohexol**) es entonces un *meso*-ciclohexano hexol, y por lo tanto posee un plano de simetría con 5 grupos hidroxilos ecuatoriales y un grupo hidroxilo axial. El carbono donde se encuentra unido el hidroxilo axial se nombra como C-2 y los restantes carbonos del anillo deben ser numerados desde el C-1 al C-6 comenzando por alguno de los contiguos al C-2 como C-1 y siguiendo alrededor del anillo en forma horaria o antihoraria. De acuerdo con la regla, la numeración antihoraria en un inositol sustituido asimétricamente conduce a un prefijo configuracional D, y una numeración horaria da un inositol sustituido a un prefijo L. La elección del prefijo es determinado normalmente dando preferencia a aquella que resulte de darle la numeración más baja a los sustituyentes. De esta manera el plano de simetría del *myo*-inositol pasa a través del C-2 y C-5. La sustitución de uno de los pares de carbono simétricamente relacionados C-1, C-3 y C-4, C-6 da lugar a los enantiómeros D y L. La sustitución de C-2 y/o C-5 da lugar a un producto *meso*. Dado que el *myo*-

inositol es una molécula meso es indistinto de donde se inicie la numeración. Pero al introducir un sustituyente, por ejemplo en la posición 1, nos encontramos con la formación de dos productos (Figura 4.4). Así, la fosforilación sobre el O-1 (oxígeno del grupo hidroxilo del carbono 1) del *myo*-inositol genera el 1D-*myo*-inositol-1-fosfato, mientras que en la fosforilación sobre el O-3 altera la numeración de los átomos de carbono, invirtiendo el C-1 al C-3, generando el 1L-*myo*-inositol-1-fosfato. Precisamente, el sustituyente ocupa la menor numeración posible. Además, se puede observar que los dos derivados son 1-fosfatos.²⁹ El símbolo Ins es usado principalmente para el *myo*-inositol con la numeración de la configuración 1-D a menos que el prefijo L esté indicado explícitamente.³⁰

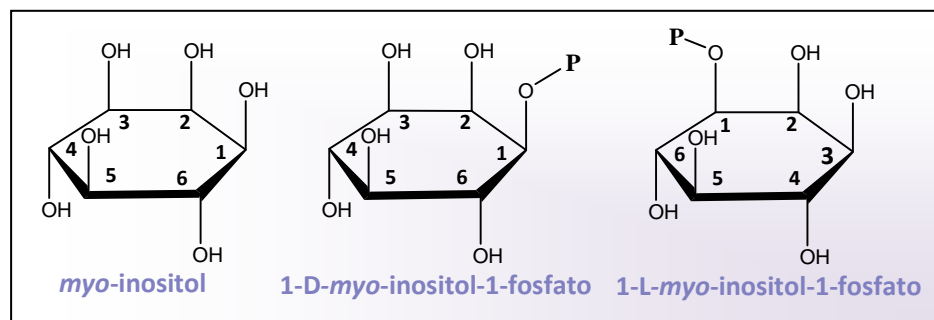


Figura 4.4. Formación de enantiómeros por sustitución de un grupo fosfato (P) el sentido de la numeración cambia según donde se posicione el sustituyente.

Función fisiológica del *myo*-inositol

El *myo*-inositol ha sido identificado como uno de los principales osmolitos en cerebro. Éste es acumulado en varios órganos del cuerpo, especialmente en el cerebro, retina y medula renal, y cumple la función de un osmolito no perturbante protegiendo a las células de los efectos perturbadores de altas concentraciones intracelulares de electrolitos. El *myo*-inositol es acumulado dentro de las células a través de un cotransportador de alta afinidad Na^+/myo -inositol (SMIT).³¹

En caso de una intensa excitación neuronal, se produce un influjo de Na^+ , Ca^{++} , y Cl^- que conduce el flujo de agua hacia el interior y causa hinchazón celular. Se conoce que la elevación sostenida de electrolitos intracelulares disturba el normal funcionamiento de varias enzimas. En esos casos, las células, incluidas las células neuronales, acumulan altas concentraciones de pequeños osmolitos orgánicos, los cuales no perturban el comportamiento de las enzimas. Los osmolitos orgánicos están compuestos por aminoácidos (glutamina, glutamato y taurina), metilaminas (glicerofosforilcolina y creatinina) y polioles (*myo*-inositol). Se ha probado que ellos cumplen un importante rol en la osmoregulación del cerebro en los mamíferos.

Biosíntesis del *myo*-inositol.

En humanos la mayor parte del *myo*-inositol es tomado de las plantas y sólo una pequeña fracción es biosintetizado.

Existen tres fuentes principales de *myo*-inositol intracelular:

1) síntesis de novo desde glucosa-6-fosfato catalizada por la enzima *myo*-inositol-1-fosfato sintasa y por la enzima inositol monofosfatasa; 2) por "reciclado" en el ciclo del fosfatidilinositol y 3) captación desde el fluido extracelular.

1) La síntesis de novo es posible en plantas y animales por la isomerización de la D-glucosa-6-fosfato catalizada por la L-*myo*-inositol-1-fosfato-sintasa (D-*myo*-inositol 3-fosfato sintasa).³² Luego el L-*myo*-inositol-1-fosfato [Ins(3)P] por la acción de la monofosfatasa específica da lugar al *myo*-inositol libre y a un fosfato inorgánico (Figura 4.5).

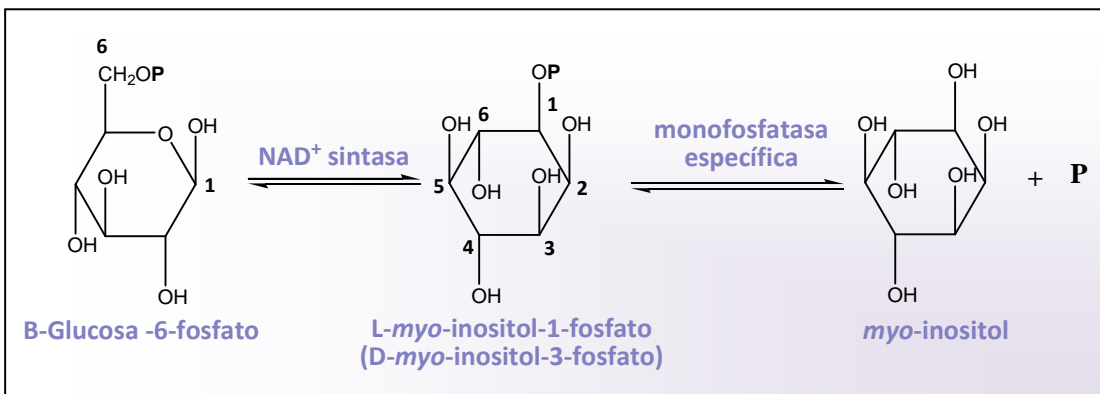


Figura 4.5. Biosíntesis de novo de *myo*-inositol.

El *myo*-inositol así formado, con citidín-difosfato (CDP) y el diacilglicerol (DAG) en presencia de la enzima transferasa se genera un fosfolípido llamado fosfatidilinositol (PtdIns). Este fosfolípido puede estar en constante estado de equilibrio con otros fosfatidilinositales, con uno o dos grupos hidroxilos fosforilados adicionales tal como en la posición 4 o 5 del *myo*-inositol (figura 4.6).

2) En el ciclo de reciclado el *myo*-inositol libre es generado por una monofosfatasa específica a partir de fosfatidilinositol (PdIns), el cual proviene de la hidrólisis por la enzima Fosfolipasa C generando Diacilglicerol (DAG) y *myo*-inositol-1-fosfato [Ins(1)P] (figura 4.6 y 4.8).

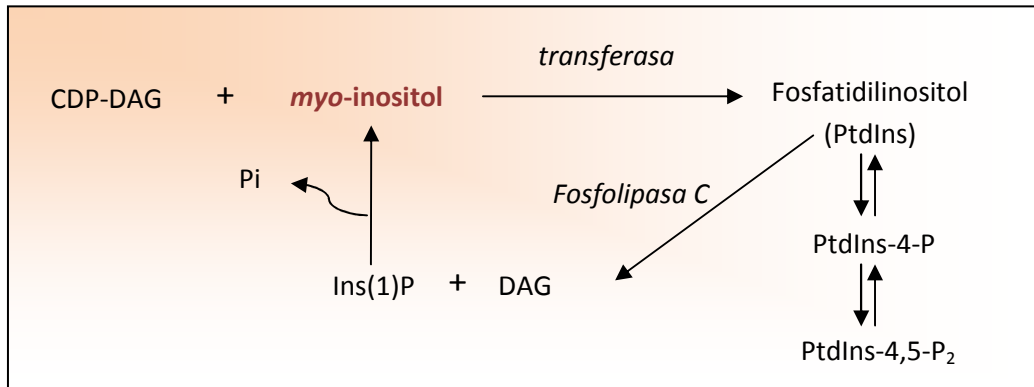


Figura 4.6. Cascada de reciclado de myo-inositol. (Pi: Fósforo inorgánico)

3) La fuente más importante de *myo*-inositol extracelular proviene de la dieta alimenticia. El *myo*-inositol extracelular es recaptado por las células principalmente a través de transportadores asociados a membranas celulares, el transportador más importante es el cotransportador *myo*-inositol sodio dependiente 1 (SMIT1), el cual utiliza el gradiente electroquímico de Sodio a través de la membrana plasmática para importar inositol.³³

Fosfatos de *Myo*-inositol

La química y biología de los Fosfatos de Inositol comenzaron a ser áreas de intensa investigación durante las últimas tres décadas debido a su implicancia en varios procesos de señalización celular.³⁴ Los Fosfatos de Inositol y sus derivados son compuestos notablemente versátiles, cruciales para la información y transducción en organismos vivos. Existen al menos 26 *myo*-inositol fosfatos diferentes, 8 fosfoinositol lípidos y varios glicoconjugados conocidos en la naturaleza.

Los fosfatidilinositoles por la acción de las enzimas específicas dan lugar a los productos llamados *myo*-inositol fosfatos (InsP_n, donde el n puede ser del 1 al 6). Entre ellos el más importante es el D-*myo*-inositol 1,4,5-trifosfato (Ins[1,4,5]P₃) que se genera a partir del PtdIns(4,5)P₂, (PIP₂) por la acción enzimática de la fosfolipasa C (PLC) y actúa como un segundo mensajero (Figura 4.7).

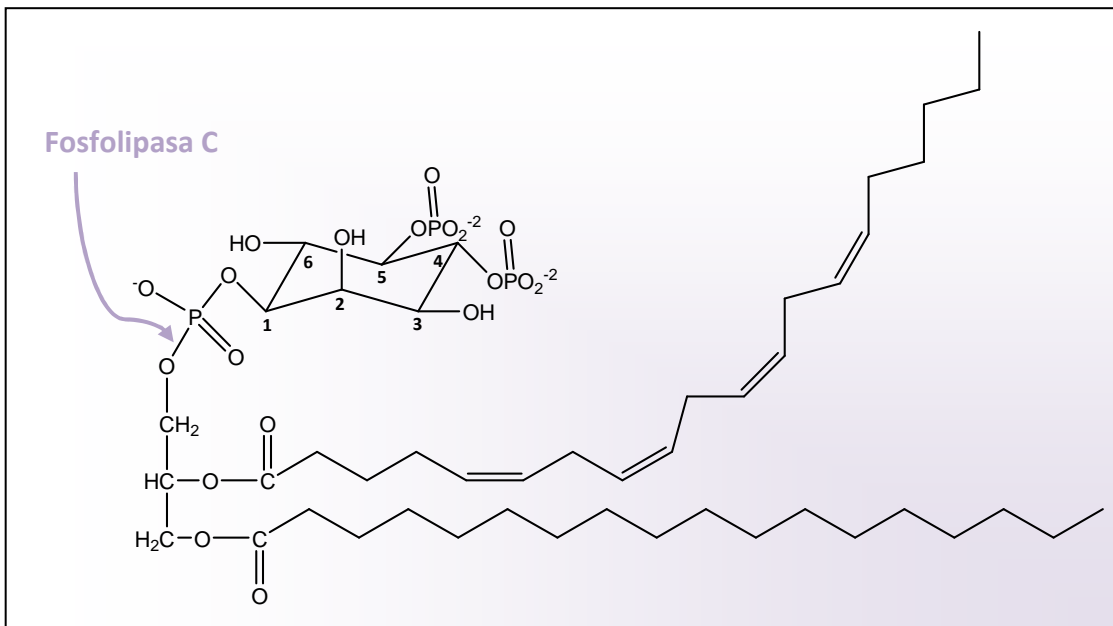


Figura 4.7. Lugar de ataque del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ por la fosfolipasa C, una vez hidrolizado da lugar al diacilglicerol (DAG) y al $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

Cuando se descubrió que el $\text{Ins}[1,4,5]\text{P}_3$ actuaba como una importante molécula movilizadora del calcio intracelular, varios *myo*-inositol fosfatos fueron identificados en seres vivos, y presentaron propiedades de ligandos bioactivos.³² Numerosos son los trabajos en donde se mencionan los distintos *myo*-inositol fosfatos y el rol fisiológico que cumplen. Así el D-*myo*-inositol 1,3,4,5-tetrafosfato ($\text{Ins}[1,3,4,5]\text{P}_4$), se ha sugerido que actúa como segundo mensajero movilizándolo los iones calcio de fuentes extra o intracelulares. El D-*myo*-inositol 3,4,5,6-tetrafosfato fue identificado como un mediador, el cual desacopla la secreción del cloruro del ión calcio intracelular en las células epiteliales intestinales.³⁵

$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, como segundo mensajero

El D-*myo*-inositol 1,4,5-trifosfato ($\text{Ins}[1,4,5]\text{P}_3$) (figura 4.8) es uno de los componentes fisiológicos fundamentales, dado que interviene en la movilización del calcio intracelular desde los compartimentos del retículo endoplásmico. Su importancia radica en que el calcio actúa como un mensajero intracelular, transmitiendo informaciones dentro de las células para regular las actividades celulares. Así, por ejemplo, el ión calcio interviene en las diversas respuestas celulares como en la contracción muscular, fertilización, proliferación, secreción de proteínas, metabolismo, diferenciación celular como así también en la apoptosis (muerte celular programada).³⁵

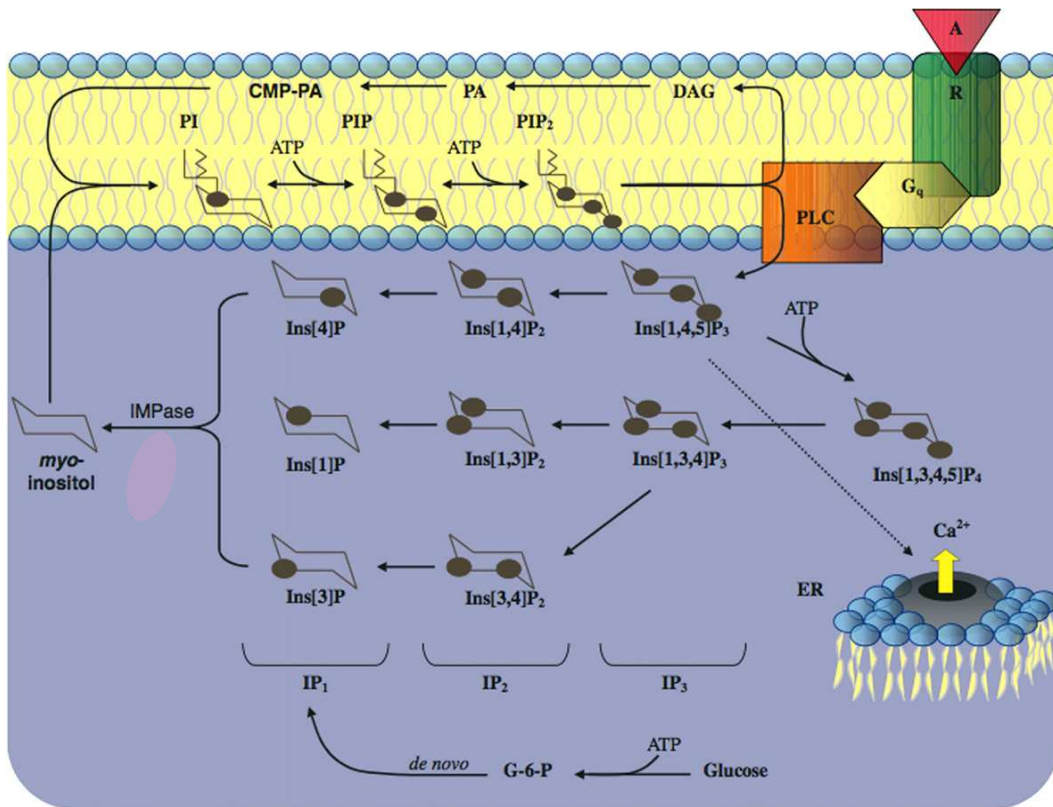


Figura 4.8. Sistema de segundos mensajeros de Fosfatidilinositol. (ciclo PI). Los círculos oscuros muestran la localización de cada molécula de fosfato en el anillo de myo-inositol.

Derivados del myo-inositol con actividad biológica

Desde el descubrimiento que el D-myoinositol 1,4,5-trifosfato actúa como segundo mensajero, un gran número de myo-inositol fosfatos relacionados han sido encontrados en sistemas vivos y distinguidos también como metabolitos bioactivos. De todos los 63 posibles regioisómeros (15 meso y 24 pares enantioméricos) del myo-inositol fosfatos (InsP1-InsP₆),³⁶ más de la mitad fueron encontradas en la naturaleza y otros fueron preparadas por distintas rutas sintéticas. Los análogos del myo-inositol fosfatos fueron sintetizados con la finalidad de encontrar propiedades biológicas novedosas. Entre esas modificaciones podemos encontrar análogos deshidroxilados en las distintas posiciones, así se han preparado el D-2-deoxi-Ins(1)P, DL-2-deoxi Ins(1,4,5)P₃, DL-6- deoxi-Ins(1,4,5)P₃, 1D-2,3,6-trideoxi-Ins(1,4,5)P₃.³⁷

El compuesto D-3-deoxifosfatidil-*myo*-inositol-1-[(R)-2-metoxi-3-octadeciloxi-propil hidrogen fosfato] (figura 4.9), inhibe la activación de la proteína Akt. La proteína Akt interviene en la prevención de apoptosis. La PI3-quinasa fosforila al grupo hidroxilo en la posición 3 del *D*-inositol de la PtdIns. Éste PtdIns-3-P se une al Akt causando la traslocación de Akt del citoplasma a la membrana plasmática. La fosforilación de Akt causa que éste se libere de la membrana plasmática y se relocalice en el núcleo. En donde fosforila otras proteínas como Bad (inhibidor de apoptosis), etc. A través de este mecanismo regula la proliferación de la célula y promueve la supervivencia celular. Esta es una novedosa estrategia para inhibir la activación de la proteína Akt a través del uso del D-3-desoxifosfatidil-*myo*-inositol, el cual no puede ser fosforilado en la posición 3 como pasa usualmente en la molécula del *myo*-inositol.³⁸

Este tipo de compuestos representa una nueva clase de compuestos anticancerígenos potenciales con un mecanismo de acción novedosa.

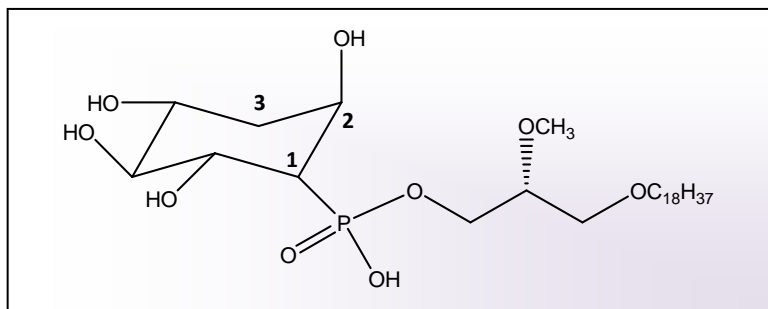


Figura 4.9. D-3-deoxifosfatidil-*myo*inositol-1-[(R)-2-metoxi-3 octadeciloxi propilhidrogen fosfato], un análogo deoxilado con un potencial actividad anticancerígena.

El *myo*-inositol hexanicotinato, es un éster de la niacina (o vitamina B3) que consiste en seis moléculas de ácido nicotínico y una de inositol (figura 4.10).³⁹ La niacina ha sido ampliamente utilizada por décadas para el tratamiento de la hiperlipidemia. Sin embargo, su uso es limitado debido a sus efectos adversos tales como sudoración asociada con la liberación inmediata de niacina, y hepatotoxicidad asociada con las formulaciones de liberación prolongada de niacina. El hexanicotinato de inositol es utilizado como un sustituyente para el tratamiento convencional con niacina. Se cree que el mecanismo de acción del hexanicotinato de inositol es el mismo que la niacina pero el hexanicotinato de inositol aparentemente está libre de los efectos adversos agudos, el cual se piensa que se

debe a la liberación sostenida de niacina in vivo a través de la hidrólisis enzimática del éster.⁴⁰

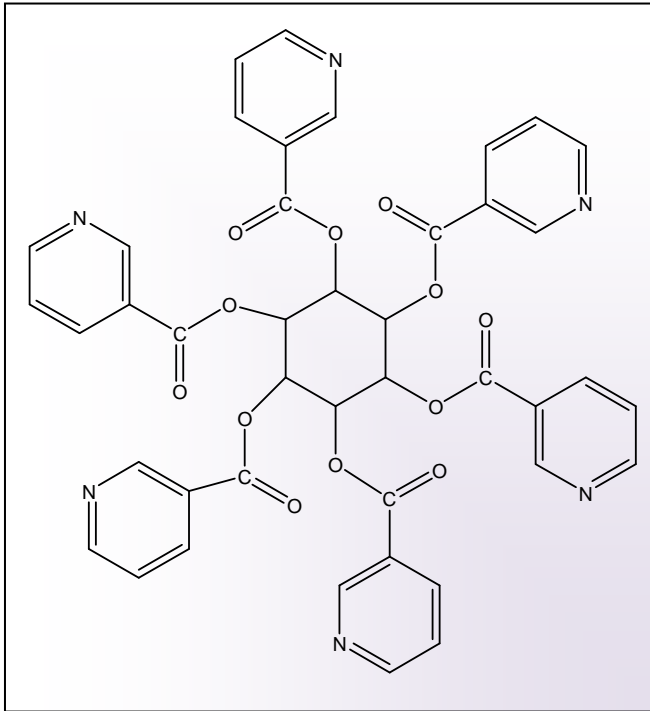


Figura 4.10. Estructura del hexanicotinato de myo-inositol.

Referencias del Capítulo 4

1. Rutecki, B.E.; Gidal, B.E.; *Epilepsy & Behavior*, **2002**, 3, S24-S31.
2. *Antiepileptic Drugs*, Third Edition, Levy, R.; Mattson, R.; Meldrum, B.; Perny, J.K.; Dreifuss, F.E.; **1989**. New York, Raven Press.
3. Palaty, J.; Abbott, F.S., *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 3398-3406.
4. Yis, U.; Seckin, E.; Kurul, S.H.; Kuralay, F.; Dirik, E., *Epilepsy Research*, **2009**, 84, 232–237.
5. Shinnar, S.; Berg, A.T., *Epilepsia*, **1996**, 37, 701-708.
6. Macdonald, R.L.; Meldrum, B.S. In *General Principles: Principles of Antiepileptic Drug Action in Antiepileptic Drugs*, 3rd. Ed.; Levy, R.H.; Dreifuss, F. E.; Mattson, R.H.; Meldrum, B.S. Penry, J. K. (Eds.); Raven Press: New York, **1989**, pp. 59-83.
7. Loscher, W.; Schmidt, D., *Epilepsy Res.*, **1994**, 17, 95-134.
8. Loscher, W., *Epilepsy Res.*, **2002**, 50, 105-123.
9. Frey, H.; Loscher, W.; Reiche, R.; Schultz, D., *Pharmacology*, **1983**, 27, 330-335.
10. Loscher, W., *Prog. Neurobiol.*, **1999**, 58, 31-59.
11. Zeise, M.L.; Kasparaow, S.; Zieglgansberger, W. *Brain Res.* **1991**, 544, 345-348.
12. Roderfeld, H.J.; Altrup, U.; Düsing, R., *Pflügers Arch.*, **1994**, 426 Suppl.: R32.
13. Kelly, K.M.; Gross, R.A.; Macdonald, R.L., *Neurosci. Lett.*, **1990**, 116, 1-2.
14. Johannessen, C.U.; *Neurochem.*, **2000**, 37, 1003 – 1110.
15. Rho, J.M.; Sankar, R., *Epilepsia*, **1999**, 40, 1471 – 1483.
16. Whitlow, R.D.; Sacher, A.; Loo, D.D.; Nelson, N.; Eskandari, S., *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 17716-17726.
17. Davis, R.; Peters, D.H.; McTavish, D., *Drugs*, **1994**, 47, 332-372.
18. Vadnal, R.; Parthasarathy, R., *Neuropsychopharmacology*, **1995**, 12, 272-285.
19. Harwooda, A. J.; Agam, G.; *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 66, 179–189.
20. Fortunati, N.; Bertino, S.; Costantino, L.; Bosco, O.; Vercellinatto, I.; Catalano, M. C.; Boccuzzi, G., *Cancer Letters*, **2008**, 259, 156–164.
21. Blaheta, R.A.; Michaelis, M.; Driever, P.H.; Cinatl, J., *Med. Res. Rev.*, **2005**, 25, 383-397.
22. Strahl, B.D; Allis, C.D., *Nature*, **2000**, 403, 41– 45.
23. Bialer, M.; Yagen, B., *Neurotherapeutics*, **2007**, 4, 130–137.

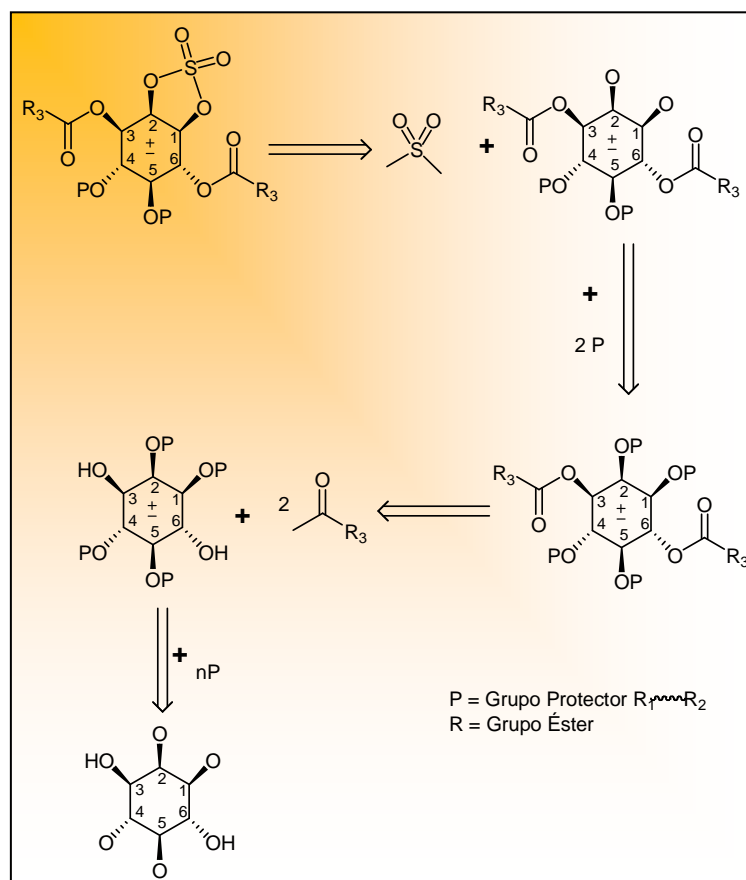
24. Isoherranen, N.; Yagen, B.; Bialer, M., *Curr. Opin. Neurol.*, **2003**, 16, 203-211.
25. Moon, S.C.; Echeverría, G.A.; Punte, G.; Ellena, J.; Bruno-Blanch, L.E. *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342, 1456-1461.
26. Chung, S.K.; Kwon, Y.U.; Chang, Y.; Sohn, K.H.; Shin, J.H.; Park, K.H.; Hong B.J.; Chung, I.H., *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 2577-2589.
27. Parthasarathy, R.; Eisenberg, F.; in *Inositol Phosphates and Derivatives Synthesis, Biochemistry, and Therapeutic Potential* (Eds.: Allen B. Reitz), ACS, Washington, DC, **1991**, pp. 1-19.
28. Shamsuddin, A.M.; Vucenik, I.; Cole, K.E., *Life Sci.*, **1997**, 61, 343-354.
29. IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *IUPAC Inf. Bull.*, **1968**, 32, 51. IUPAC/IUB 1973 Recommendations for the Nomenclature of Cyclitols, *Pure and Applied Chem.*, **1974**, 37, 285-297.
30. *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB)*. Numbering of atoms in *myo*-inositol. Recommendations **1988**. World Wide Web version prepared by G. P. Moss.
31. Nonaka, M.; Kohmura, E.; Yamashita, T.; Yamauchi, A.; Fujinaka, T.; Yoshimine, T.; Tohyama, M.; Hayakawa, T., *Molecular Brain Research*, **1999**, 70, 179-186.
32. Berridge, M.J., *Nature*, **1993**, 361, 315-325.
33. Di Daniel, E.; Cheng, L.; Maycox, P.R.; Mudge, A.W., *Mol. Cell. Neurosci.*, **2006**, 32, 27-36.
34. (*Cell Signaling*, Hancock, J. T. Oxford University Press, Inc. New York, N.Y. **2005**.)
35. Michael, J.; Berridge, M.; Bootman, D.; Peter, L., *Nature*, **1998**, 395, 645-648.
36. Chung, S.K.; Kwon, Y.U.; Chang, Y.; Sohn, K.H.; Shin, J.H.; Park, K.H.; Hong, B.J.; Chung, I.H., *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 2577-2589.
37. Kozikowski, A.P.; Ognyanov, V.I.; Fauq, A.H.; Nahorski, S.R.; Wilcox, R.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 4429-4434.
38. Meuillet, E.J., *Mol. Cancer Ther.*, **2003**, 2, 389-399.
39. Welsh, A.L.; Ede, M.; *Int. Rec. Med.*, **1961**, 174, 9-15.
40. Head, K.A., *Altern. Med. Rev.*, **1996**, 1, 176-184.

Capítulo 5

Síntesis Química

Introducción

El objetivo de esta investigación, motivo de la presente tesis, es la síntesis y evaluación farmacológica de profármacos del ácido valproico, según lo descrito en el Capítulo 4. Para el desarrollo del presente trabajo, fue necesario el diseño de noveles heterociclos derivados del *myo*-inositol y del ácido valproico, en donde se incluyó el grupo funcional sulfato cíclico orientado a favorecer un aumento en la actividad del fármaco. La planificación de la síntesis de estos compuestos se realizó mediante un proceso retrosintético, en cuatro etapas planificadas para una sustitución secuencial de los distintos grupos sobre el *myo*-inositol (Esquema 5.1). Debido a la naturaleza estructural que presenta el *myo*-inositol, como ya fue expresado anteriormente, estamos ante la presencia de un ciclohexano hexol, con seis grupos hidroxilos secundarios con un entorno químico similar. Esta situación lleva a que sea un verdadero desafío sintético la funcionalización selectiva de los distintos hidroxilos del inositol. Este al poseer seis grupos hidroxilos plantea la posibilidad de sintetizar diferentes números de derivados, mono, di, tri, etc., sustituidos, diferentes posiciones relativas entre ellos y diferentes estereoisómeros...un verdadero desafío.



Esquema 5.1. Proceso Retrosintético.

Capítulo 5

En el Esquema 5.1 precedente se muestra la primera opción de síntesis propuesta, la protección regioselectiva de 2 o más de los grupos hidroxilos secundarios del *myo*-inositol. Los derivados protegidos de *myo*-inositol son compuestos de mucho interés debido a ser intermediarios sintéticos para la obtención de una amplia variedad de compuestos con actividad farmacológica.^{1,2} La segunda etapa consiste en la síntesis de los ésteres del VPA de los diferentes *myo*-inositol protegidos. Como tercera etapa se plantea la desprotección selectiva de manera de dejar hidroxilos vecinales para la introducción del grupo sulfato cíclico que se concreta en la cuarta etapa y se lleva a cabo en dos pasos, mediante la síntesis del sulfito cíclico de los derivados del *myo*-inositol y luego la oxidación de estos para formar el producto final esperado, el sulfato cíclico de *myo*-inositol.

Protección regioselectiva de los grupos hidroxilos del *myo*-inositol.

Los correspondientes derivados del *myo*-inositol con grupos protectores en hidroxilos (teniendo grupo/s hidroxilos libres en las posiciones deseadas) son intermediarios claves para la síntesis de derivados biológicamente importantes del *myo*-inositol. Cuando todos los grupos hidroxilos no equivalentes en una molécula son secundarios o terciarios (como en los ciclitoles), obtener productos selectivamente derivatizados es una tarea difícil, debido a las sutiles diferencias en sus reactividades y/o en la dificultad en la separación de los productos isoméricos que se obtienen.

Tradicionalmente los grupos hidroxilos del *myo*-inositol son protegidos como cetales,³ entre los más utilizados están acetona, ciclohexanona, ciclopentanona⁴ y ortoformiato⁵ pero en la literatura se encuentran descritos otros varios tipos de grupos protectores aplicados al *myo*-inositol. Los procedimientos desarrollados sobre la protección regioselectiva, de los seis grupos hidroxilos del *myo*-inositol son muy amplios, los casos más estudiados son las protecciones simultáneas de 2 (con 4 grupos hidroxilos libres), 4 (con 2 grupos hidroxilos libres) y 3 grupos hidroxilos (ortoformiatos del *myo*-inositol).¹

De los 6 grupos hidroxilos que posee el *myo*-inositol, 5 son ecuatoriales y solo uno (en la posición 2, en naranja, figura 5.1) es axial. Esto se puede apreciar mejor observando a la molécula del *myo*-inositol en la conformación de silla. El *myo*-inositol posee un plano de simetría, por lo tanto es una molécula *meso*, tanto las posiciones 1 y 3 como 4 y 6 son indiferentes. Está demostrado que los grupos

hidroxilos ecuatoriales vecinales al grupo hidroxilo axial en el *myo*-inositol, son los más reactivos para la alquilación y acilación.⁶

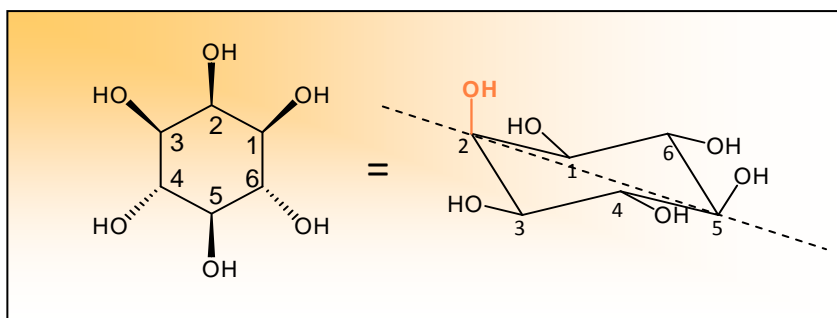


Figura 5.1. *Myo*-inositol una molécula meso y su plano de simetría.

Protección regioselectiva de dos grupos hidroxilos del *myo*-inositol.

La protección regioselectiva de 2 grupos hidroxilos (posición 1 y 2) puede ser llevada a cabo mediante la formación de isopropilideno (monoacetónido) utilizando como reactivo de protección el 2,2-dimetoxipropano,³ entre otras opciones se puede mencionar la formación del ciclohexilideno derivado mediante el tratamiento del *myo*-inositol con ciclohexanona en presencia de un catalizador ácido.⁴ (Figura 5.2).

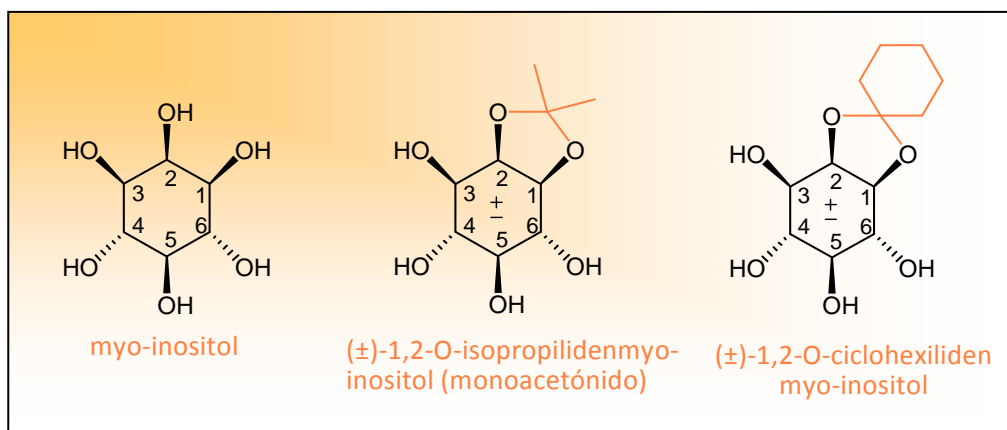


Figura 5.2. Protección regioselectiva de los hidroxilos en posición 1 y 2.

Como se mencionó anteriormente la molécula del *myo*-inositol posee una configuración meso, presenta un plano o eje de simetría (figura 5.1). Sus derivados dan como resultado compuestos ópticamente activos en la mayoría de los casos. Así, en la reacción de la preparación del monoacetónido del *myo*-inositol se obtiene el (±)-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (monoacetónido), que es una mezcla racémica de los 2 enantiómeros; D-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol y L-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (figura 5.3). Por este motivo, todos los derivados del

Capítulo 5

myo-inositol preparados y que figuran en esta tesis son mezclas racémicas de los enantiómeros correspondientes.

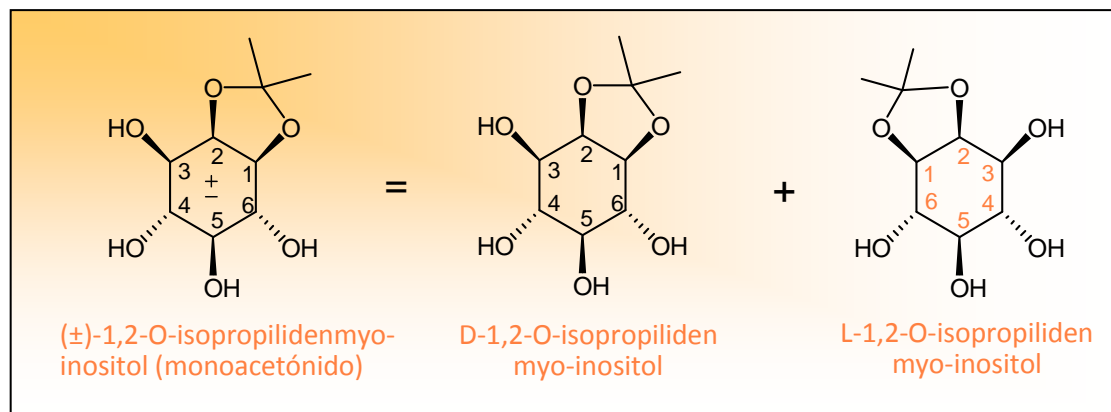


Figura 5.3. Mezclas racémicas de los derivados acetónidos del *myo*-inositol.

Se coloca el prefijo (±) en el nombre de cada compuesto para denotar que corresponden a una mezcla racémica. También a cada estructura correspondiente a una mezcla racémica se le ha colocado el signo ± dentro del anillo de ciclohexano.

La protección de los 2 grupos hidroxilos es regioselectiva, se obtiene preferentemente, en posiciones 1 y 2 cuando la reacción se realiza en medio ácido (ácido acético, ácido *p*-toluensulfónico monohidrato).³ En este trabajo se ha utilizado para la protección regioselectiva de los grupos hidroxilos el 2,2-dimetoxipropano como agente protector dado su extendido uso según la literatura y la fácil disponibilidad en nuestro laboratorio.

Se preparó el derivado (±)-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**1**) utilizando la técnica descrita por Gigg y col.³ en donde los grupos hidroxilos en la posición 1 y 2 de la molécula del *myo*-inositol son protegidos con formación de un ciclo (figura 5.4). El procedimiento de aislamiento del producto fue modificado con respecto de la técnica descrita, para obtener con mayor pureza el derivado (1).⁷

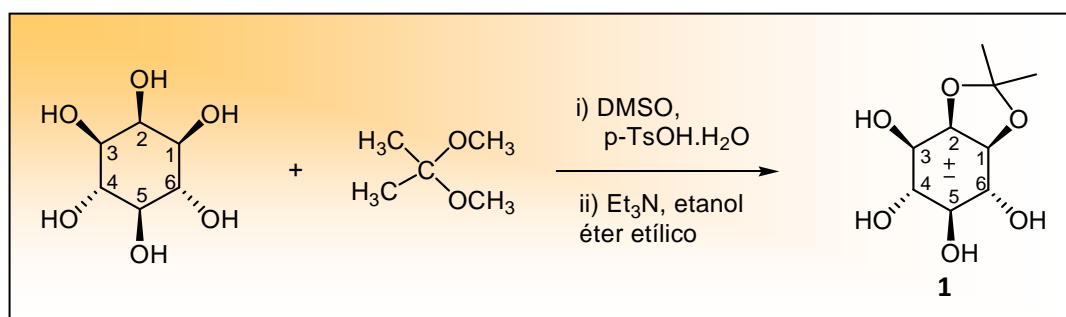


Figura 5.4. Preparación del monoacetónido **1**, (±)-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol. DMSO: dimetilsulfóxido; *p*-TsOH.H₂O: ácido *p*-toluensulfónico monohidrato; Et₃N: trietilamina.

Protección regioselectiva de cuatro grupos hidroxilos del *myo*-inositol.

La protección regioselectiva de 4 grupos hidroxilos del *myo*-inositol según reporta la literatura, se puede lograr a partir del monoacetónido del *myo*-inositol (**1**) utilizando como reactivo el 2,2-dimetoxipropano,³ obteniendo el (\pm)-1,2:4,5-Di-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**2**). Otra opción es la formación de dicitclohexilideno mediante el uso del reactivo 1-etoxiciclohexeno,⁸ obteniéndose una mezcla de (\pm)-1,2:4,5- (**C1**), (\pm)-1,2:5,6- (**C2**) y (\pm)-1,2:3,4-Di-*O*-ciclohexiliden-*myo*-inositol (**C3**) (figura 5.5). Además, con el reactivo 1,1-dietoxiciclohexano⁹ se ha obtenido el dicitclohexilideno regioselectivo (\pm)-1,2:4,5-Di-*O*-ciclohexiliden-*myo*-inositol (**C1**).

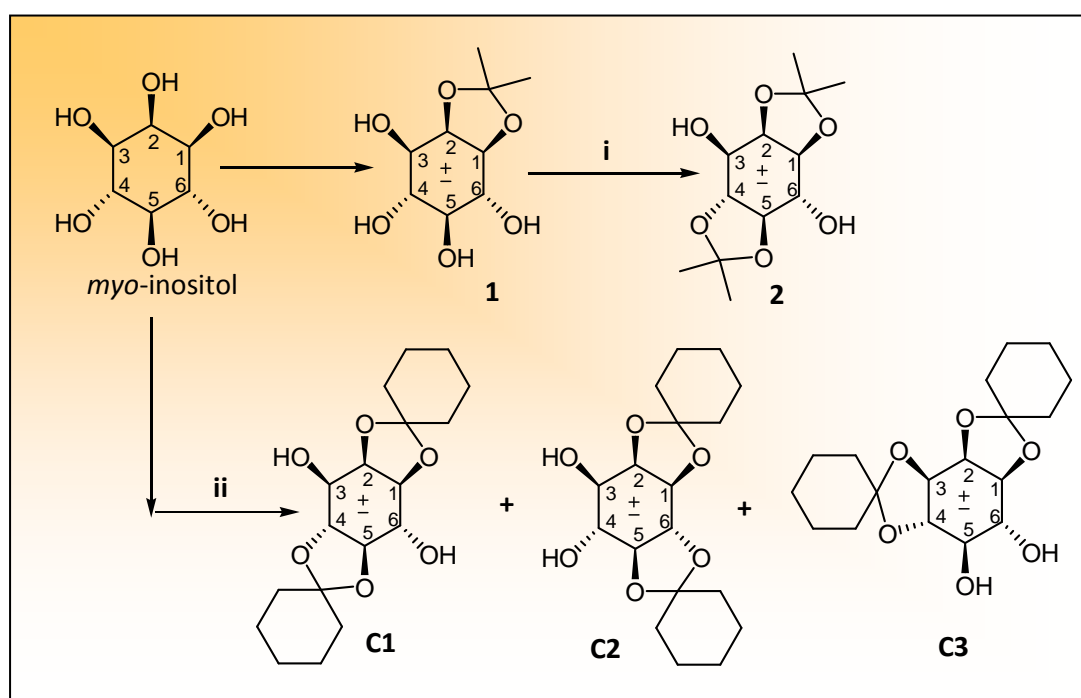


Figura 5.5. Protección regioselectiva de 4 grupos hidroxilos del *myo*-inositol.

i.- Síntesis del (\pm)-1,2:4,5-Di-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**2**). *ii*.- Reacción del *myo*-inositol con 1-etoxiciclohexeno en DMF o DMSO utilizando el ácido *p*-toluensulfónico monohidrato como catalizador, da una mezcla de (\pm)-1,2:4,5- (**C1**), (\pm)-1,2:5,6- (**C2**) y (\pm)-1,2:3,4-Di-*O*-ciclohexiliden-*myo*-inositol (**C3**).⁹

En este trabajo se preparó el derivado protegido (\pm)-1,2:4,5-Di-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**2**) (diacetónido) a partir del monoacetónido (**1**).³ Se obtienen en pequeñas proporciones los isómeros derivados (\pm)-1,2:5,6- (**2b**) y (\pm)-1,2:3,4-Di-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**2c**) (figura 5.6).

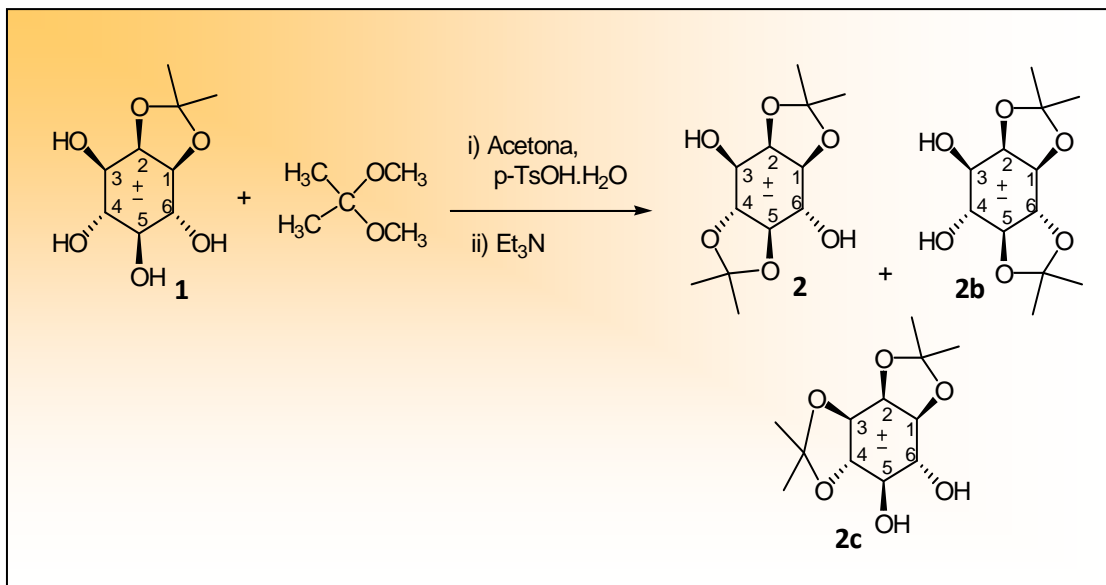


Figura 5.6. Síntesis del compuesto (\pm)-1,2:4,5-Di-O-isopropiliden-myoinositol (**2**) y sus isómeros.

Protección regioselectiva de tres grupos hidroxilos del myo-inositol.

La protección regioselectiva de 3 grupos hidroxilos del myo-inositol en las posiciones de C1, C3 y C5 se logra mediante la formación de monoortoformiato del myo-inositol (figura 5.7). Este producto se obtiene a partir de ortoformiato de trietilo en dimetilsulfóxido (DMSO) en presencia del ácido *p*-toluensulfónico monohidratado (*p*-TsOH·H₂O) como catalizador.¹⁰

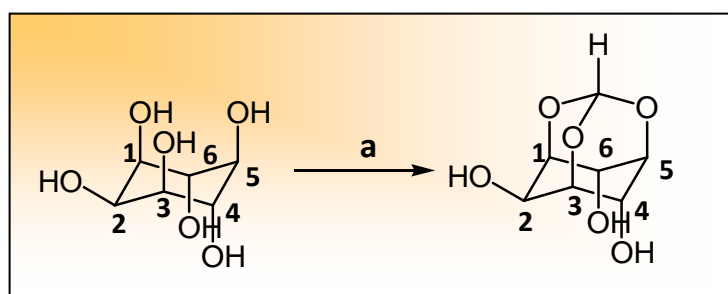


Figura 5.7. Protección regioselectiva de 3 grupos hidroxilos del myo-inositol. **a**- (EtO)₃CH (ortoformiato de trietilo), DMSO, *p*-TsOH·H₂O y calentamiento.

Debido a la rigidez conformacional impuesta en el anillo de myo-inositol por los acetales cíclicos, los restantes hidroxilos libres pueden ser manipulados selectivamente en condiciones de reacción adecuadas.¹¹

Esterificaciones de los derivados del *myo*-inositol protegidos.

Mediante la protección selectiva de los grupos hidroxilos del *myo*-inositol previo a la esterificación, se realiza una síntesis dirigida, ya que se logra la incorporación de los ésteres en posiciones definidas, dependiendo de cuál sea el producto protegido de partida y del número de ésteres introducidos.

A partir de los reactivos preparados monoacetónido (**1**), y diacetónido (**2**) se sintetizaron los ésteres correspondientes derivados del ácido valproico. El procedimiento sintético utilizado para las reacciones de acilación fue el reportado por nuestro grupo de investigación⁷ utilizando como agente acilante el anhídrido 2-propilpentanoilo (anhídrido valproico) con el cual se obtiene un mayor rendimiento de los ésteres en comparación al agente acilante cloruro de 2-propilpentanoilo (cloruro de valproilo).¹² El Anhídrido Valproico no es asequible comercialmente y se sintetizó a partir de Cloruro de valproilo y valproato de sodio (figura 5.8).

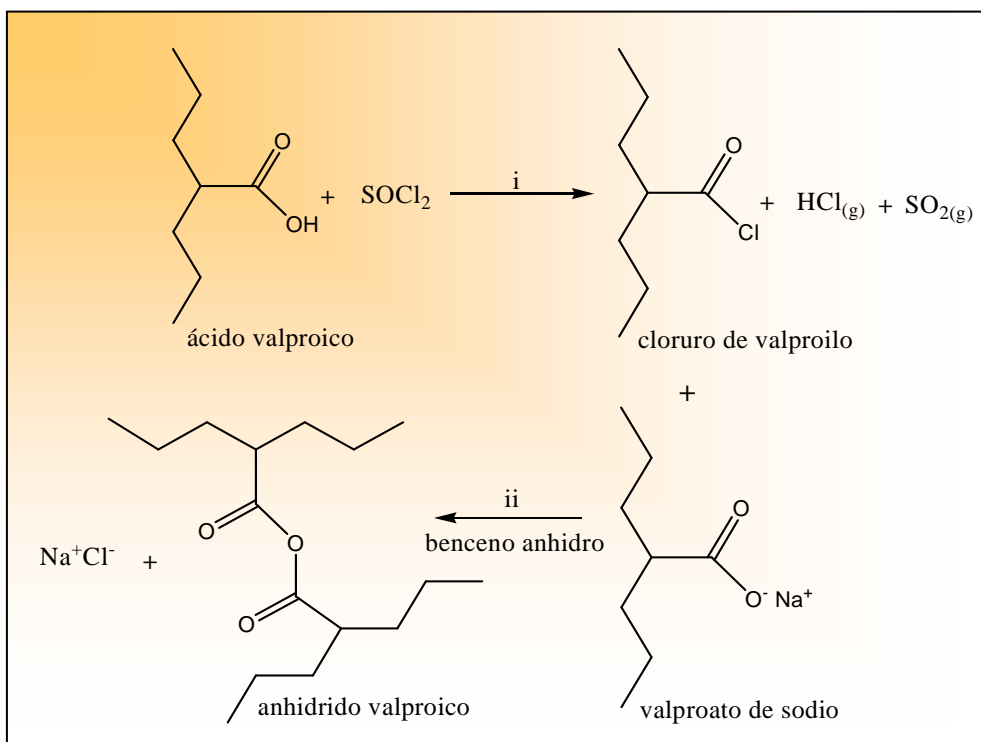


Figura 5.8. Síntesis de Anhídrido valproico. i) Síntesis de Cloruro de Valproilo a partir de ácido valproico y cloruro de tionilo, ii) reacción entre el cloruro de valproilo y valproato de sodio para dar el anhídrido valproico.

La esterificación de los grupos hidroxilos libres del (±)-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (monoacetónido) **1** se lleva a cabo con el anhídrido valproico utilizando como catalizador 4-pirrolidinpiridina (4-PiPy) y trietilamina anhidra como medio de

Capítulo 5

reacción en atmósfera de nitrógeno, obteniéndose el compuesto (\pm)-3,4,5,6-Tetra-*O*-(2-propilpentanoil)-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**3**).

La esterificación del derivado protegido (\pm)-1,2:4,5-Di-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (diacetónido) (**2**) en las mismas condiciones que el monoacetónido nos lleva a la obtención del compuesto (\pm)-3,6-Di-*O*-(2-propilpentanoil)-1,2:4,5-di-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**4**)¹³ (figura 5.9).

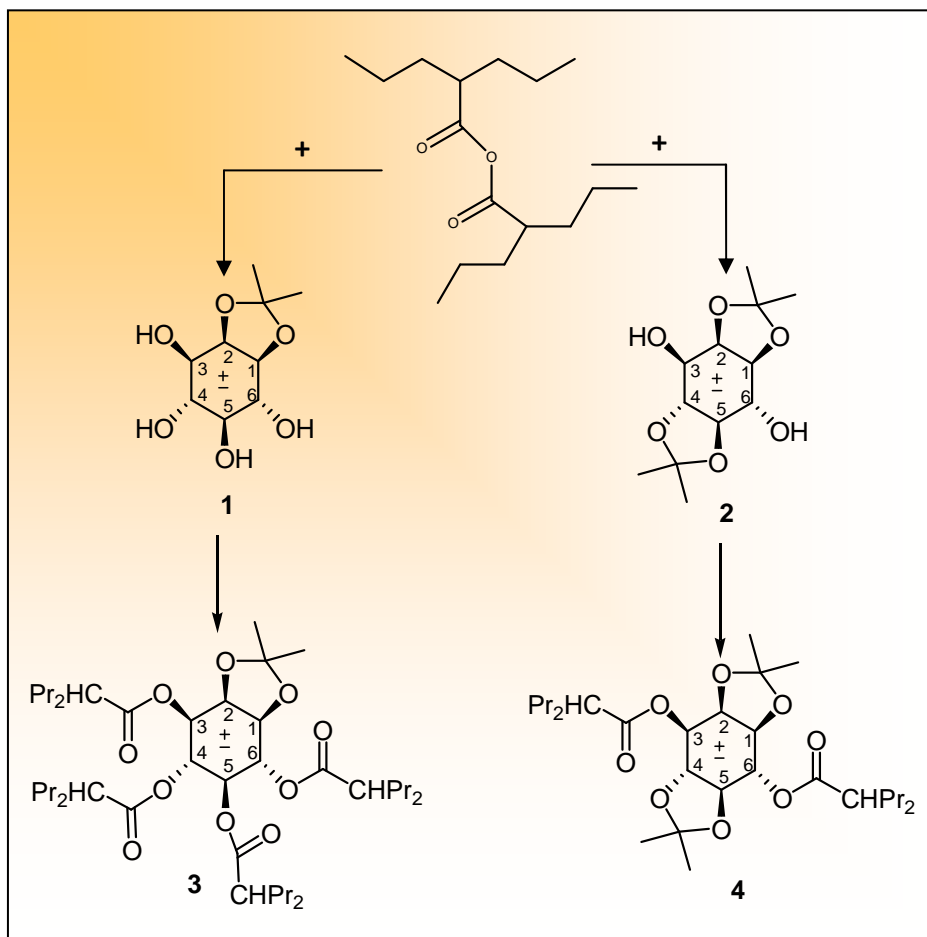


Figura 5.9. Síntesis de los ésteres del Ácido valproico: (\pm)-3,4,5,6-Tetra-*O*-(2-propilpentanoil)-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**3**) y (\pm)-3,6-Di-*O*-(2-propilpentanoil)-1,2:4,5-di-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**4**) a partir del monoacetónido (**1**) y diacetónido (**2**).

Reacciones de hidrólisis de los grupos protectores

Para llevar a cabo la síntesis de los heterociclos derivados del *myo*-inositol en la tercera etapa se desprotegen selectivamente de manera de poder dejar dos grupos hidroxilos vecinales. La etapa de desprotección de los hidroxilos se realizó en medio ácido, estas reacciones deben estar bien controladas debido a que los compuestos presentan otro grupo lábil susceptible a la hidrólisis ácida.

Hidrólisis de los grupos protectores del compuesto **4**.

La hidrólisis de los grupos protectores en el compuesto **4** requiere de una hidrólisis ácida controlada ya que la unión éster con el VPA no debe ser alterada. Tomando como referencia los estudios de hidrólisis de los grupos protectores realizados por Moon, S.C.¹³ las condiciones de hidrólisis más convenientes son en un medio de ácido acético (75%) y agua a temperatura ambiente.¹⁴ Al ser una hidrólisis suave requiere un tiempo mayor (160hs) para poder apreciar cantidades importantes del producto desprotegido. Se obtiene mezcla de productos de hidrólisis, siendo estos el (\pm)-3,6-Di-*O*-(2-propilpentanoil)-4,5-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**5**) con un rendimiento de 63 %, proveniente de la hidrólisis parcial (de un solo acetónido) y el (\pm)-3,6-Di-*O*-(2-propilpentanoil)-*myo*-inositol (**6**) con un rendimiento de 13.5 %, producto de la hidrólisis total (los 2 acetónidos) como así una fracción de **4** que no llega a hidrolizarse (Figura 5.10). Para tiempos mayores de reacción hay un incremento en el rendimiento del compuesto **6** a expensas del compuesto **5**.

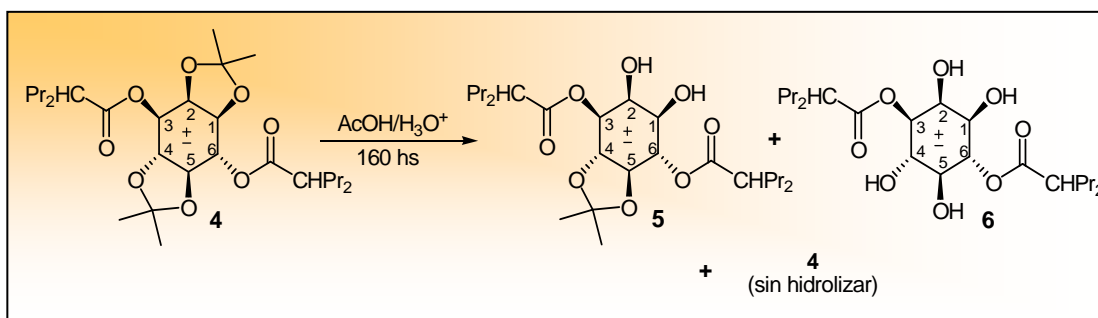


Figura 5.10. Hidrólisis de los grupos acetónidos de **4**. Se obtiene una mezcla de **4** (20,2%) sin hidrolizar, **5** (producto de un solo acetónido) y **6** (hidrólisis de los 2 acetónidos). AcOH: ácido acético.

Capítulo 5

Hidrólisis del grupo protector del compuesto 3.

Las condiciones de hidrólisis del compuesto 3 se modificaron con la utilización de ácido trifluoroacético debido a que la hidrólisis con ácido acético no formaba el producto esperado en los tiempos y temperaturas adecuadas para no hidrolizar los ésteres de VPA. La hidrólisis se lleva a cabo en una solución de Tetrahidrofurano y agua en una proporción de 4 a 1 y ácido trifluoroacético, enfriando la reacción en un baño a 0°C (Baño de hielo-agua). Estas condiciones permitieron obtener el compuesto (±)-3,4,5,6-Tetra-O-(2-propilpentanoil)-*myo*-inositol (**7**) con un rendimiento del 62 % (figura 5.11).

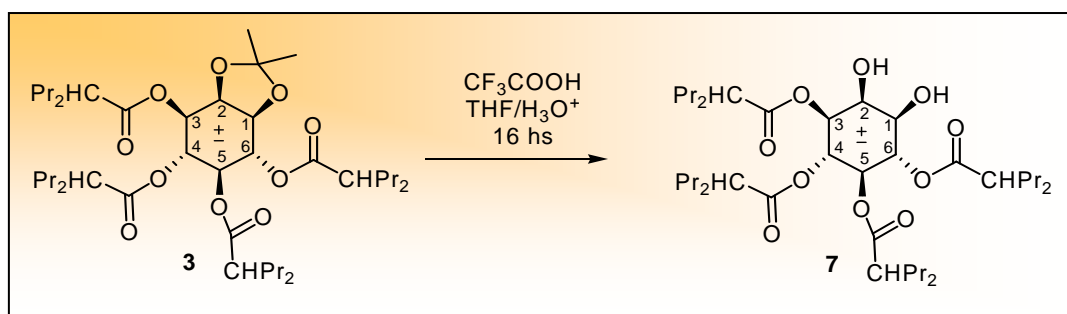


Figura 5.11. Reacción de hidrólisis del grupo acetónido de **3**, para obtener el compuesto **7** con un rendimiento del 62 %. CF₃COOH: ácido trifluoroacético; THF: tetrahidrofurano.

Nota: Durante las evaluaciones farmacológicas de los compuestos descritos precedentemente, se decidió realizar la evaluación biológica de los compuestos de partida, como es lógico cuando uno está interesado en ver de qué manera las modificaciones estructurales inciden en la actividad biológica. Esta hipótesis, donde se intentaba determinar si el incremento de actividad estaba asociado al grupo sulfato o al ácido valproico y de alguna manera estimarlo cuantitativamente llevó a preparar compuestos donde estuviera el grupo sulfato sin el ácido valproico. Como fue expresado anteriormente, el grupo sulfato es inestable a las condiciones experimentales de remoción del ácido valproico, motivo por el cual se procedió a sustituir el ácido valproico por acetato. Además se llevaron a cabo varios intentos de síntesis donde el *myo*-inositol contuviera sólo el grupo sulfato cíclico, sin grupos protectores o ésteres, se variaron condiciones de reacción tales como temperatura, atmósfera, reactivos: Cloruro de sulfurilo, cloruro de tionilo, catecol sulfato, cloruro de sulfamoilo, pero no se logró controlar la reacción obteniéndose en todos los intentos la formación de un producto polimérico. Para poder dirigir y controlar la reactividad de los hidroxilos del *myo*-inositol se sintetizaron derivados acetilados de manera tal que queden sólo dos hidroxilos vecinales libres para lograr la introducción controlada del grupo sulfato cíclico.

Esterificación de los derivados protegidos del *myo*-inositol con Anhídrido Acético.

A partir de los reactivos preparados monoacetónido (**1**), y diacetónido (**2**) se sintetizaron los ésteres correspondientes derivados del ácido acético. El procedimiento sintético utilizado para las reacciones de acilación fue el reportado por Gigg y col.³ La esterificación de los grupos hidroxilos libres del (\pm)-1,2-O-isopropiliden-*myo*-inositol (monoacetónido) **1** se lleva a cabo con el anhídrido acético utilizando como catalizador 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) y piridina anhidra como medio de reacción en atmósfera de nitrógeno, obteniéndose el compuesto (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-acetil-1,2-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**8**).

La esterificación del derivado protegido (\pm)-1,2:4,5-di-O-isopropiliden-*myo*-inositol (diacetónido) (**2**) en las mismas condiciones que el monoacetónido nos lleva a la obtención del compuesto (\pm)-3,6-Di-O-acetil-1,2:4,5-di-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**9**) (figura 5.12).

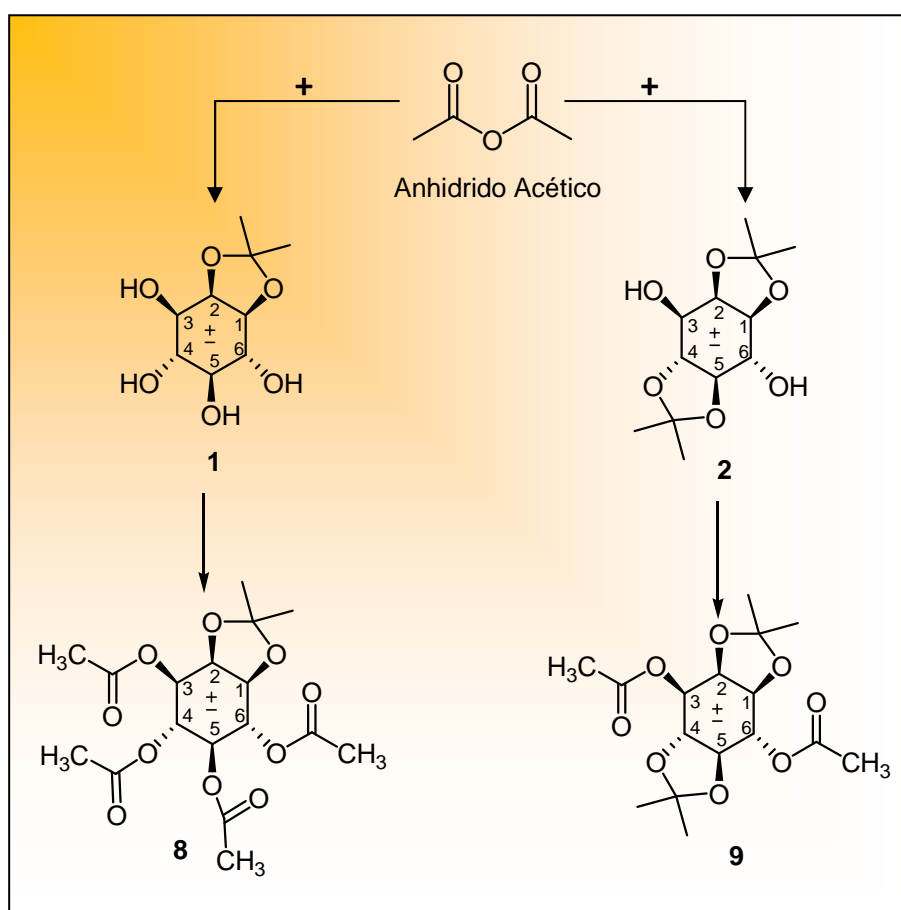


Figura 5.12. Síntesis de los Acetatos derivados de *myo*-inositol: (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-acetil-1,2-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**8**) y (\pm)-3,6-Di-O-acetil-1,2:4,5-di-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**9**) a partir del monoacetónido (**1**) y diacetónido (**2**).

Capítulo 5

Hidrólisis de los grupos protectores de los derivados acetilados.

La hidrólisis de los grupos protectores de los compuestos **8** y **9** se llevaron a cabo en un medio de ácido acético (75%) y agua a temperatura ambiente.¹⁴ Al ser una hidrólisis suave requiere de varias horas de reacción para poder apreciar cantidades importantes del producto desprotegido (figura 5.13).

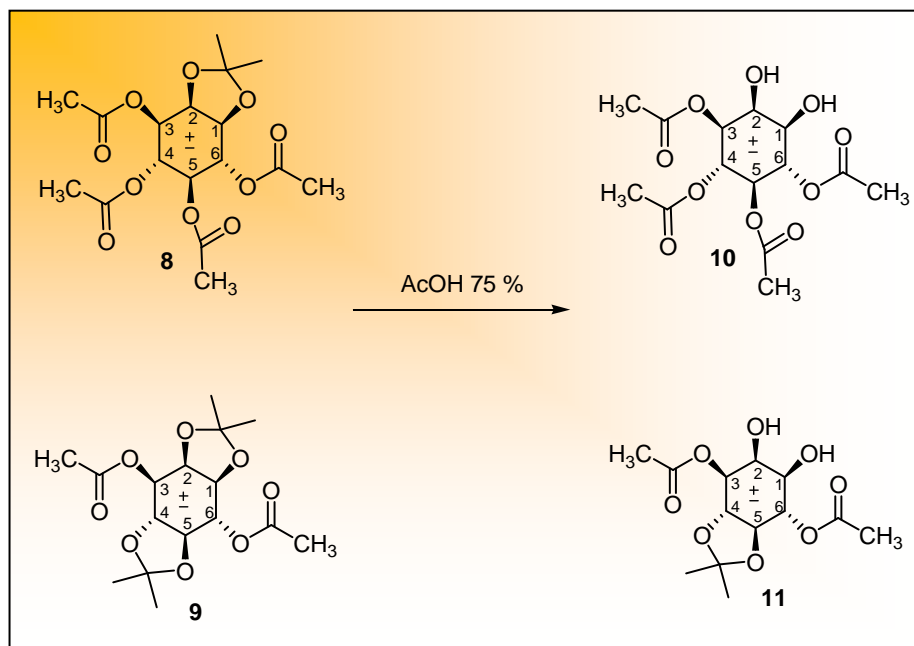


Figura 5.13. Reacción de hidrólisis de los grupos acetónidos. (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-acetil-myoinositol (**10**) y (\pm)-3,6-Di-O-acetil-4,5-O-isopropiliden-myoinositol (**11**)

Reacciones de Síntesis de los heterociclos sulfatos cíclicos

Como se expresó anteriormente, la introducción del grupo sulfato, tiene como propósito ver si contribuye a una localización selectiva en el SNC, y por ende en el sitio de acción del profármaco de VPA y *myo*-inositol. Esta modificación en donde se reemplazó el grupo acetónido por un grupo sulfato cíclico se postula que le confiere mayor lipofilicidad al compuesto.

Esta hipótesis inicial, tiene un antecedente previo reportado en la literatura en donde el uso de sulfatos cíclicos en reemplazo de los grupos acetónidos muestra un aumento de la potencia en su actividad anticonvulsiva. Maryanoff y colaboradores¹⁵ realizaron la síntesis de un sulfato cíclico análogo del Topiramato un anticonvulsivo de última generación, el RWJ-37947, y reportaron que esta nueva estructura ha logrado aumentar considerablemente la actividad anticonvulsiva del Topiramato (figura 5.14).

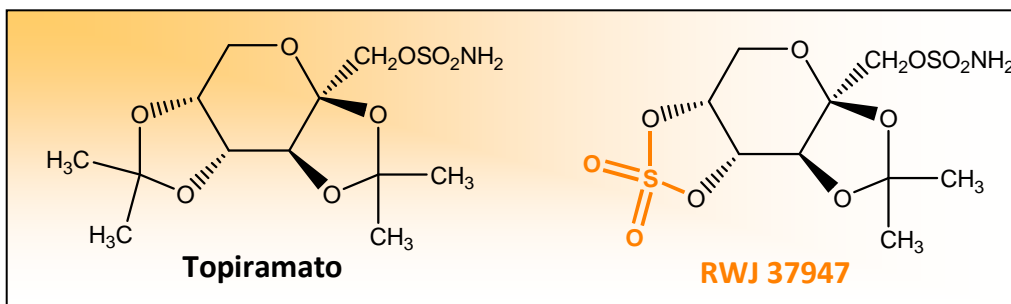


Figura 5.14. Reemplazo del grupo acetónido del Topiramato por un grupo sulfato cíclico lo que conlleva a un aumento de la actividad anticonvulsiva.¹⁵

Química de los sulfitos y sulfatos cíclicos.

Los sulfatos cíclicos de *vic*-dioles son equivalentes sintéticos de los epóxidos y sulfitos cíclicos los cuales son extensamente utilizados en química orgánica. A pesar de que los sulfatos cíclicos se conocen desde 1932¹⁶ la falta de un método eficiente para prepararlos, limitó sus aplicaciones hasta finales de la década de los 80'. La oxidación de los sulfitos cíclicos con periodato de sodio catalizado por tetróxido de rutenio¹⁷ representó un importante desarrollo que amplió la utilización de los sulfatos cíclicos como intermediarios de síntesis.

Nomenclatura:

Para nombrar los sulfitos y sulfatos cíclicos se utiliza la nomenclatura IUPAC para sistemas heterocíclicos. La secuencia cíclica de la estructura apropiada para la construcción de su nombre, se selecciona de acuerdo al tamaño del anillo y al grado de insaturación. Cuando el anillo contiene dos átomos de oxígeno y uno de azufre, se utiliza el prefijo dioxatio, y para distinguir entre sulfito y sulfato cíclico se nombra con el sufijo 2-óxido y 2,2-dióxido respectivamente. La numeración del anillo comienza con un átomo de oxígeno y continúa alrededor del anillo dando la menor numeración posible al siguiente heteroátomo y a los sustituyentes.

A modo de ejemplo, el nombre IUPAC del etilensulfato cíclico (1), trimetilensulfato cíclico (2) y tetrametilensulfato cíclico (3) son respectivamente: 1,3,2-dioxatiolane 2,2-dióxido, 1,3,2-dioxatiane 2,2-dióxido y 1,3,2-dioxatiepene 2,2-dióxido (figura 5.15).

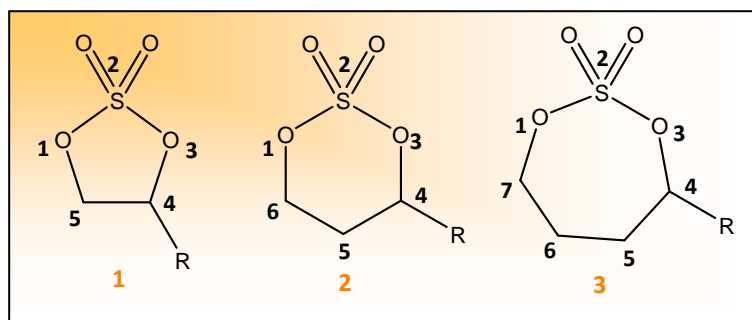


Figura 5.15. Nomenclatura de sulfatos cíclicos.

Capítulo 5

La nomenclatura IUPAC y los nombres triviales se utilizaron en conjunto en los primeros volúmenes del Chemical Abstract, y luego se continuó utilizando sólo el nombre IUPAC. Sin embargo la mayoría de los autores tienden a utilizar los nombres comunes que se originan de los ésteres sulfatos de alcoholes.

Reactividad

Los átomos de carbono en la molécula de sulfato cíclico son muy reactivos frente a agentes nucleofílicos. El aumento de actividad con respecto a los sulfatos acíclicos se puede deber a dos motivos: (i) la tensión por la generación del anillo, y (ii) carácter de doble enlace parcial entre los átomos de oxígeno del anillo y el átomo de azufre.¹⁸

En los sulfitos cíclicos, la presencia de un par de electrones no compartidos en el azufre, puede ser la causa de la reducción parcial del carácter de doble enlace del átomo de azufre y de los átomos de oxígeno del anillo. Por ello se espera que los sulfitos y sulfatos cíclicos presenten diferentes reactividades. En la sustitución nucleofílica de los sulfitos cíclicos, el ataque al átomo de azufre compite con la sustitución del carbono, sin embargo en los sulfatos cíclicos esta competencia sólo se observa cuando el carbono centro de la S_N2 está muy impedido estéricamente. Por ejemplo, la hidrólisis del sulfito cíclico de *d*-(2)-2,3-butanodiol (1, figura 5.14), ocurre con retención de la quiralidad, ya que el agua ataca al átomo de azufre. Por el contrario, ocurre una inversión de la quiralidad en el sulfato cíclico del mismo butanodiol (2, figura 5.16), indicando que el ataque ocurre principalmente en el átomo de carbono.

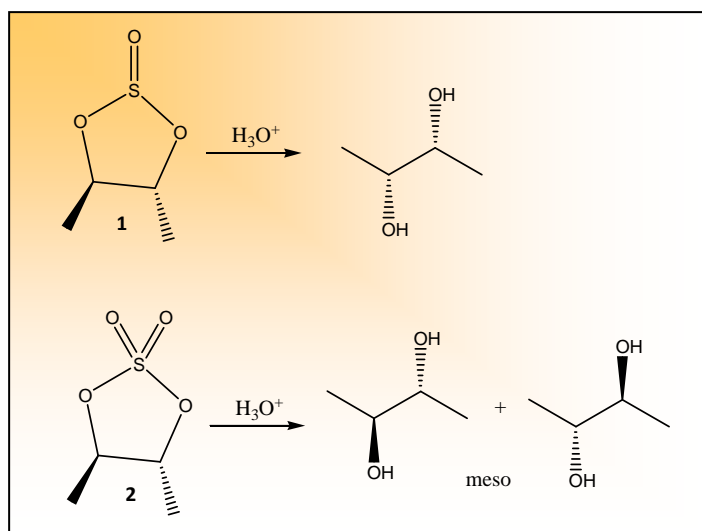


Figura 5.16. Reactividades de Sulfito y sulfato cíclico.

Métodos de Síntesis

Síntesis de sulfitos cíclicos

La literatura reporta una variedad de métodos de síntesis de sulfitos cíclicos. Algunos de estos ejemplos implican reacciones de epóxidos con dióxido de sulfuro, reacciones de 1,2 o 1,3-dioles con Et_2NSF_3 (DAST), de dioles con cloruro de sulfurilo y piridina, o con trióxido de azufre.¹⁹ La síntesis más eficiente de sulfitos cíclicos es la reacción de cloruro de tionilo con un diol o la transesterificación de un sulfito dialquílico con un diol.²⁰

A modo de ejemplo, la reacción de etilenglicol con cloruro de tionilo, da el sulfito de etileno en rendimientos moderados. Sin embargo el rendimiento aumenta con la adición de cloruro de metileno, además es necesario eliminar el cloruro de hidrogeno formado durante la reacción ya sea por calentamiento del medio de reacción o utilizando una corriente de nitrógeno seco. En la reacción del cloruro de tionilo con un sustrato que posee una función inestable en medio ácido (tal como un acetónido), se requiere el agregado de una base como la trietilamina, piridina o imidazol, para atrapar el cloruro de hidrogeno liberado durante la reacción (figura 5.17).²¹

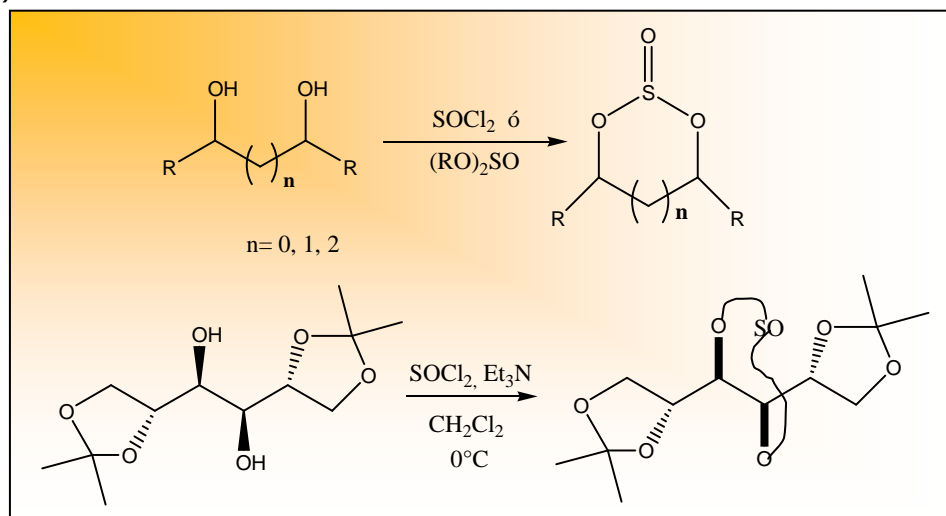


Figura 5.17. Reacción de cloruro de tionilo (SOCl_2) con dioles vecinales.

Capítulo 5

Síntesis de sulfatos cíclicos

1. Reacción con derivados sulfatos.

Desde el primer reporte de síntesis de etilen sulfato mediante la reacción de 1,2-dibromoetano y sulfato de plata, los sulfatos cíclicos se pueden preparar por diferentes métodos. Ejemplos de ellos son: a) pinacolona con trióxido de azufre a 0-5°C para dar el sulfato cíclico con un 36 % de rendimiento; b) la reacción de una hidroxí ciclohexanona con ácido sulfúrico en cantidades equimolares da el sulfato cíclico con un rendimiento del 100 %; c) la apertura de un epóxido con ácido fluorosulfónico, reacciona dando el fluorosulfato que luego del tratamiento con una base da el sulfato cíclico con un rendimiento del 74 % (figura 5.18).

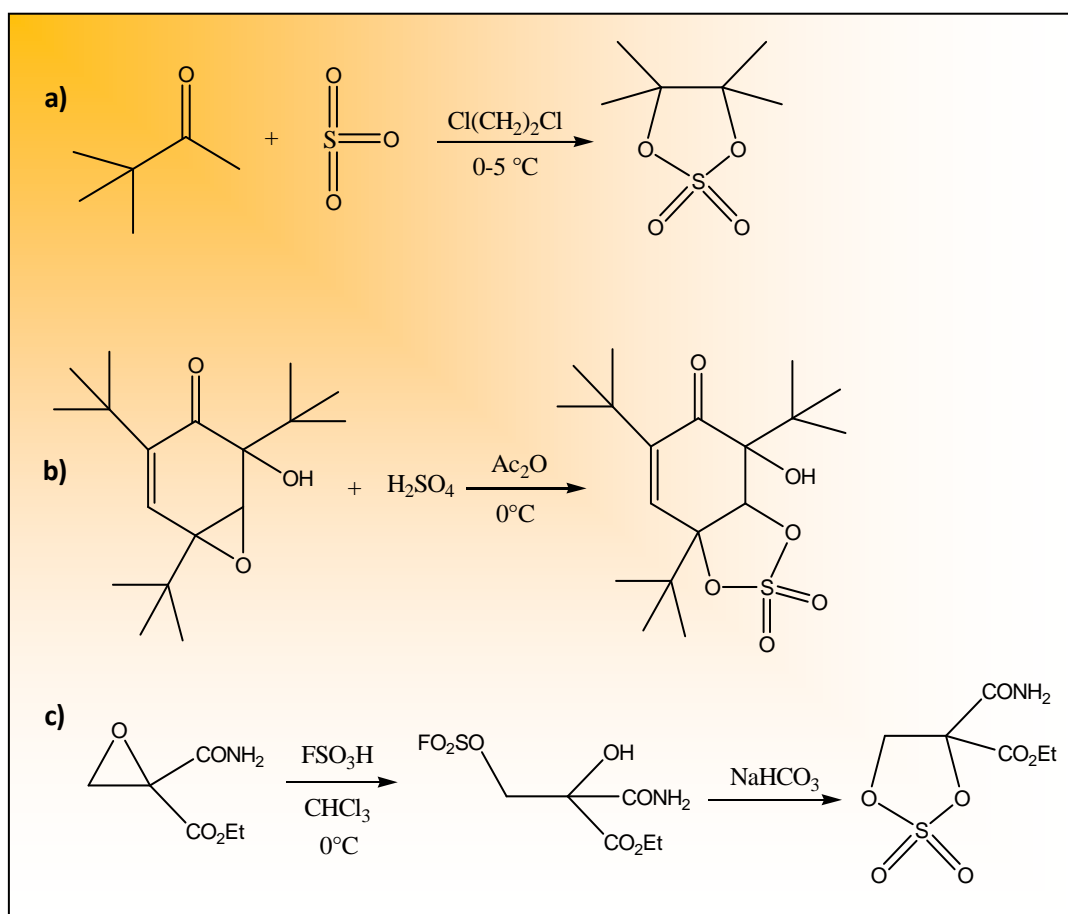


Figura 5.18. Síntesis de sulfatos cíclicos a partir de derivados sulfatos.

Los sulfatos cíclicos también han sido preparados a partir de un diol acíclico con cloruro de sulfurilo (SO_2Cl_2), a una temperatura extremadamente baja, pero sólo se obtienen rendimientos moderados debido a la naturaleza clorante del SO_2Cl_2 (figura 5.19).

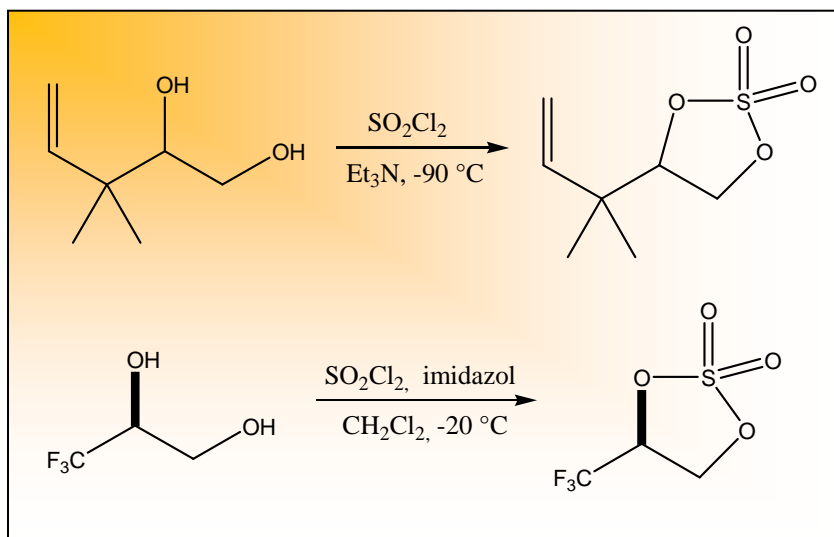


Figura 5.19. Síntesis de sulfatos cíclicos con Cloruro de sulfurilo (SO_2Cl_2).

La reacción de alcoholes rígidos como el metil-4,6-O-benziliden-a-d-manopiranosido, con cloruro de sulfurilo o sulfato de diimidazol generan los sulfatos cíclicos 1-3 (figura 5.20) con buenos rendimientos.

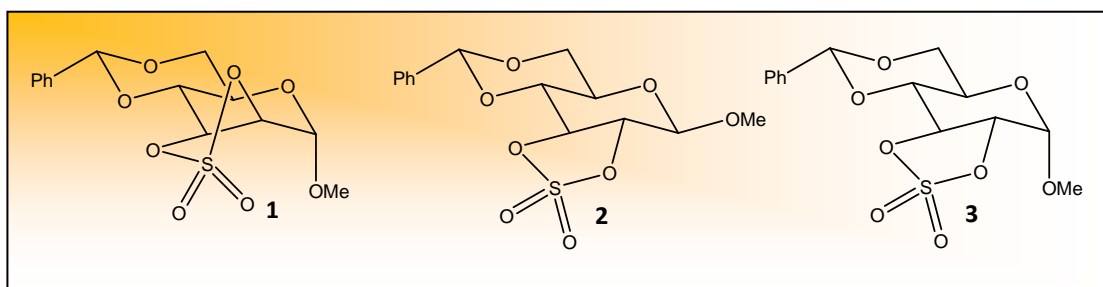


Figura 5.20. Sulfatos cíclicos de alcoholes rígidos.

2. Vía Oxidación de los sulfitos cíclicos:

Una de las metodologías más utilizadas para la síntesis de los sulfatos cíclicos es a partir de la oxidación de los sulfitos cíclicos. Los primeros métodos de oxidación del sulfito se realizaban con permanganato de potasio en un sistema bifásico (ej. $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$) para evitar la reacción y descomposición del sulfato producido.²²

Alternativamente, la oxidación del sulfito cíclico con una cantidad estequiométrica de tetróxido de rutenio (RuO_4) produce el sulfato cíclico con muy buenos rendimientos, sin embargo este procedimiento es muy costoso y se limita a preparaciones en pequeña escala. El descubrimiento de que cantidades catalíticas de tetróxido de rutenio se generan in situ mediante la reacción de tricloruro de rutenio o dióxido de rutenio con periodato de sodio, posibilitó una ruta rápida y accesible para la oxidación de los sulfitos cíclicos (figura 5.21).¹⁷

Capítulo 5

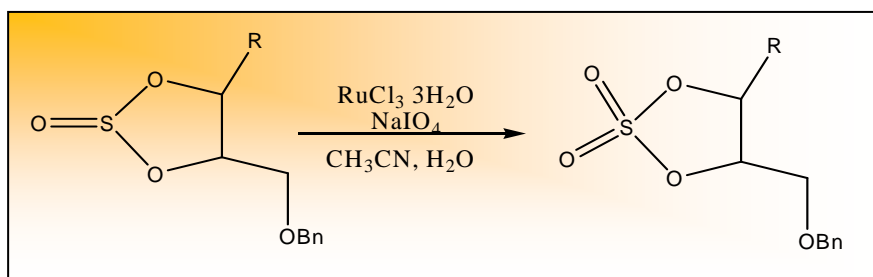
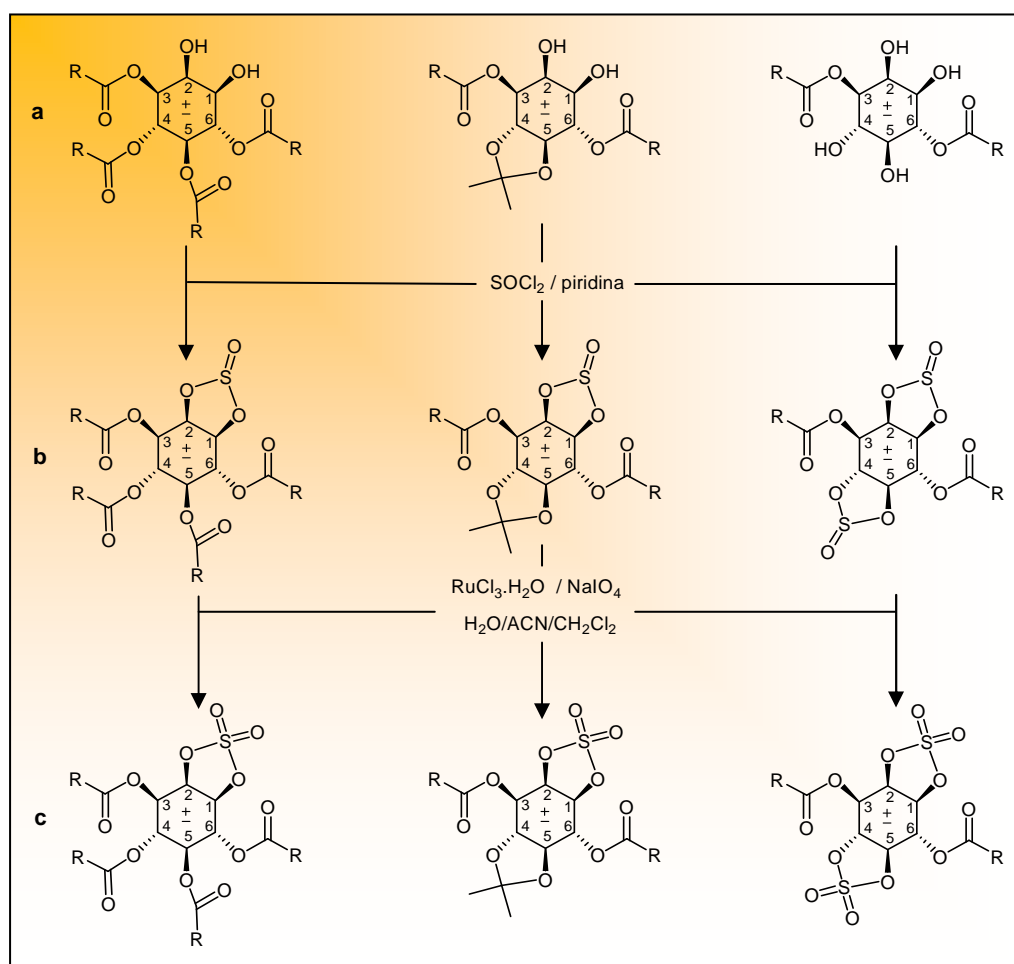


Figura 5.21. Síntesis de sulfatos cíclicos con RuO_4 generado in situ.

Procedimiento general para la síntesis de sulfatos cíclicos derivados del *myo*-inositol:

En la preparación de los sulfatos cíclicos derivados del *myo*-inositol se optó por utilizar la ruta de síntesis vía oxidación de los sulfitos cíclicos, debido a que los compuestos presentan grupos lábiles para ser tratados con cloruro de sulfurilo (SO_2Cl_2), como son los grupos acetónidos y grupos ésteres (Esquema 5.2).



Esquema 5.2 Esquema general de la síntesis de Sulfatos Cíclicos. $R = CH_3$ o $CHPr_2$.

a) derivados desprotegidos con hidroxilos vecinales, b) sulfitos cíclicos derivados, c) sulfatos cíclicos derivados.

El procedimiento general es el siguiente: A una solución del derivado de *myo*-inositol en diclorometano y piridina en un baño a 0°C (hielo-agua), se añade gota a gota cloruro de tionilo. Concluido el agregado se continúa agitando durante 30 minutos a esa temperatura. Se agregan x ml de solución saturada de cloruro de sodio, y se separan las fases, se extrae de la fase acuosa 2 veces. Se reúnen los extractivos orgánicos, se seca con agente desecante y concentra en rotovapor. El sulfito cíclico crudo obtenido se oxida rápidamente debido a su inestabilidad a temperatura ambiente.

El producto crudo obtenido se solubiliza en acetonitrilo/diclorometano, se añade una solución acuosa de periodato de sodio y cantidades catalíticas de cloruro de rutenio monohidrato. Se agita en un baño a 0°-5°C (hielo-agua) durante 1 hora. Se realiza una extracción con éter etílico, la fase etérea se seca y concentra. Para purificar el sulfato cíclico obtenido se realiza una cromatografía en columna con sílica gel como soporte.

Trabajo experimental de Síntesis:

Los solventes utilizados previamente se secaron, destilaron, según marca la literatura y almacenaron sobre tamiz molecular 4 Å (Merck). Se utilizaron solventes de grado analítico para las cristalizaciones. Las síntesis se llevaron a cabo en equipos previamente flameados bajo corriente de nitrógeno seco para evitar la presencia de humedad. Los enfriamientos a 0°C se realizaron usando baños de agua-hielo. Los puntos de fusión de los productos sintetizados se efectuaron en un equipo Electrothermal IA6034, en capilares cerrados y no fueron corregidos. La eliminación del solvente se realizó en evaporador rotatorio a temperatura ambiente y a una presión aproximada de 30 torr. Como criterio para el punto final de las reacciones se consideró la no presencia de reactivo y presencia de nuevos productos según controles por cromatografía en capa delgada (CCD).

Las columnas cromatográficas se prepararon con sílica gel 60, (0.063-0.200mm / 70-230 mesh ASTM) Merck (ref. 1.07734.1000). Las CCD se realizaron en cromatofolios de sílica gel 60 con fluorescencia a 254 nm marca Merck (ref. 1.05554). Como revelador destructivo se utilizó una solución ácida al 5 % de molibdato de amonio (VI) tetrahidratado en agua, revelado por calentamiento y como revelador no destructivo se utilizó luz ultravioleta a 254 nm.

Los espectros ^1H NMR (200 MHz) y ^{13}C NMR (50 MHz) fueron realizados en un espectrómetro Bruker AC-200 (Dpto. de Química, Facultad de Cs Exactas, UNLP). Los datos de corrimiento químico se reportan en ppm respecto del estándar interno

Capítulo 5

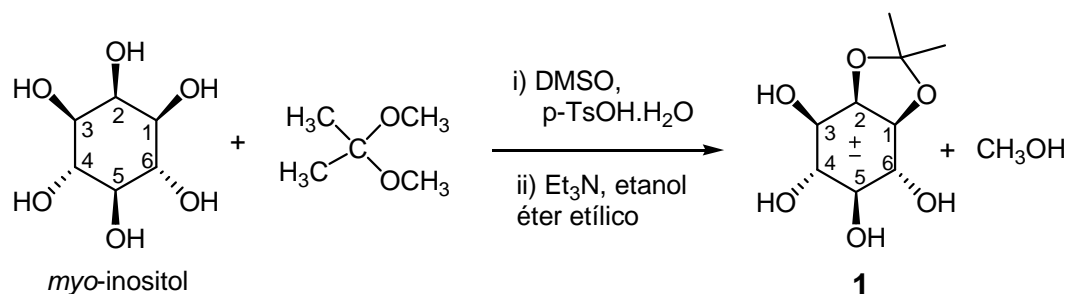
tetrametilsilano, mientras que las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz. Los espectros infrarrojos se realizaron en CEQUINOR LANAIS (Dpto. de Química Facultad de Cs Exactas, UNLP) en un equipo FT/IR Bruker IFS 66, usando pastillas de BrK. Se reportan solo los valores correspondientes a las bandas de absorción consideradas significativas para la caracterización de grupos funcionales, las cuales se expresan en cm^{-1} .

Se realizaron análisis elementales de C, H, N y S. El porcentaje de O se calculó por diferencia. Se utilizó un equipo Carlo Erba EA 1108, aceptándose un error de $\pm 0.3\%$ respecto a los valores calculados a partir de las estructuras propuestas. Se llevaron a cabo en el servicio de Microanálisis del Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires (UBA)- CONICET.

El rendimiento que se expresa en cada reacción es calculado de la relación estequiométrica de los reactivos de partida, el mismo se refiere al producto puro caracterizado por los métodos fisicoquímicos utilizados descriptos anteriormente.

Protección regioselectiva de los grupos hidroxilos del *myo*-inositol.

Síntesis de (\pm) -1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**1**)



En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno se colocan 111 mmoles (20 grs) de *myo*-inositol, se agregan 60 ml de dimetilsulfóxido y 1.56 mmoles (300 mg) de ácido *p*-toluensulfónico monohidrato, se adapta agitación magnética y desde una ampolla de compensación se agregan 276 mmoles (34 ml) de 2,2-dimetoxipropano (p.eb. 83 °C, δ : 0.847 gr/ml). Se adapta refrigerante a reflujo y se calienta a $100 \pm 5^\circ\text{C}$ observándose una solución límpida. Se detiene la reacción a los 30 minutos, se enfría y se agregan 14.3 mmoles (2 ml) de trietilamina (p.eb: 89 °C, δ : 0.728 gr/ml), luego se agrega 60 ml de etanol y 100 ml de éter etílico. Se deja agitando a temperatura ambiente durante 16 hs. Se observa formación de sólido blanco cristalino, se filtra y lava con 20 ml de éter etílico. Al sólido se lo somete a extracción repetidas veces con metanol, hasta verificar la no presencia de acetónido

por CCD. La reunión de los extractivos metanólicos se concentra en el evaporador rotatorio. El producto se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente hasta peso constante. Peso obtenido 7.7 gramos de un sólido blanco.

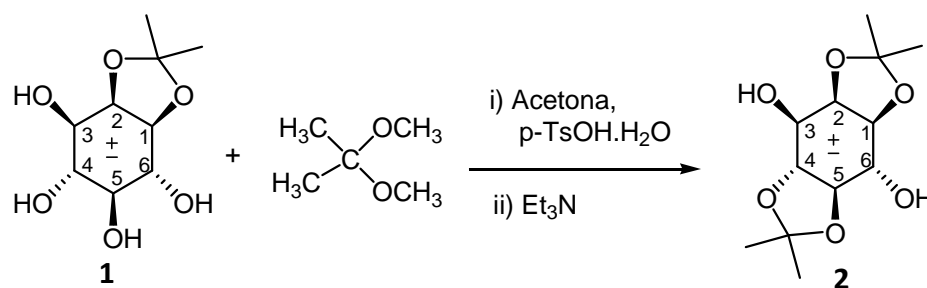
R_f producto: 0.24 (diclorometano: metanol 5:1)

Rendimiento: 31%

Rendimiento literatura³: 32%

Punto de fusión: 181°-182°C (metanol); literatura³: 182-184°C.

Síntesis de (±)-1,2:4,5-Di-O-isopropiliden-myoinositol (2)



En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno se colocan 16 mmoles (3.50 g) de (±)-1,2-O-isopropiliden-myoinositol (1), se agregan 60 ml de acetona anhidra, 145 mmoles (18 ml) de 2,2-dimetoxipropano (p.eb. 83 °C, δ: 0.847 gr/ml) y 1.88 mmoles (361mg) de ácido *p*-toluensulfónico monohidrato. Se adapta refrigerante a reflujo y se calienta a 50 ± 5°C durante 2 hs formándose una suspensión blanca. Se enfría a temperatura ambiente y se agregan 12.2 mmoles (1.75ml) de trietilamina anhidra (p.eb: 89 °C, δ: 0.728 gr/ml) continuando la agitación por 30 min. Se filtra y a la fase líquida se le agrega 350 mg de bicarbonato de sodio, se agita hasta no observar más desprendimiento gaseoso y se filtra nuevamente. El filtrado se concentra en evaporador rotatorio, obteniéndose un sólido amarillento. Se realiza una cromatografía en columna de sílica gel, utilizando diclorometano:metanol 20:1 como solvente de elución. Se incrementa suavemente el gradiente de la fase móvil hasta llegar a diclorometano:metanol 10:1. La columna se controló mediante CCD. Se recogieron 40 fracciones de aproximadamente 6 ml cada una. Se juntaron las fracciones 9-32, obteniéndose 1.53 grs de sólidos blanco cristalinos.

R_f producto: 0.74 (diclorometano: metanol 5:1)

Rendimiento: 37 %

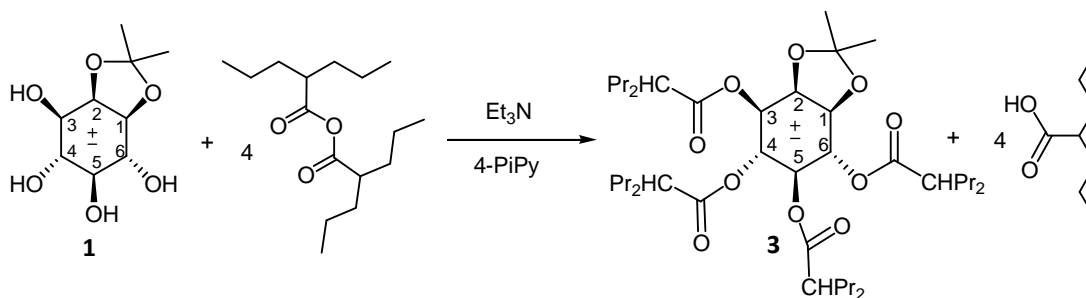
Rendimiento literatura³: 21 %

Punto fusión: 172-174°C (acetona); literatura³: 171-173°C (acetato de etilo).

Capítulo 5

Esterificaciones de los derivados del *myo*-inositol protegidos.

Síntesis de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-*O*-(2-propilpentanoil)-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**3**)



En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno, se colocan 21 mmoles (4.62 gr) de (\pm)-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**1**), se agregan 501 mmoles (70 ml) de trietilamina (p.eb: 89 °C, δ : 0.728 gr/ml) y 8.9 mmoles (1.3 grs) de 4-pirrolidinopiridina. Desde ampolla de compensación se agrega gota a gota 90.7 mmoles (24.5 grs) de anhídrido valproico (p.eb.: 109°C/0,85 mmHg, δ : 0.890 gr/ml) a temperatura ambiente. Tiempo de agregado: 30 minutos.

La reacción se interrumpe a las 190 hs, se concentra en evaporador rotatorio. El producto se purifica por cromatografía en columna de silica gel, utilizando éter de petróleo como solvente de elución y se aumenta el gradiente de la fase móvil a éter de petróleo: diclorometano 10:1. La columna se controla mediante CCD.

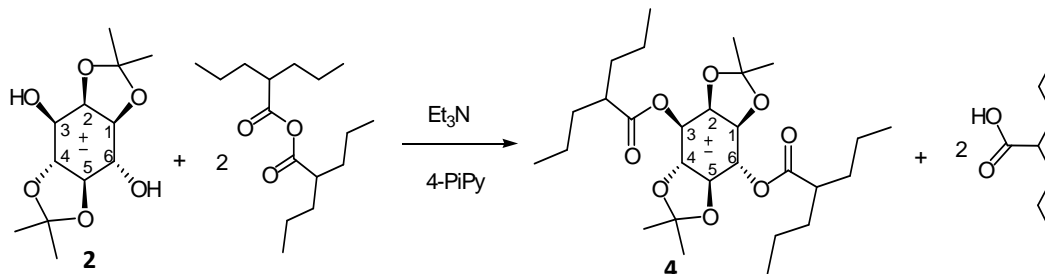
Se obtienen 7.9 grs del producto, líquido siruposo incoloro.

R_f producto: 0.75 (diclorometano)

Rendimiento: 53 %

Rendimiento literatura¹³: 51 %

Síntesis de (\pm) -1,2:4,5-Di-O-isopropiliden-3,6-di-O-(2-propilpentanoil)-*myo*-inositol (**4**)



En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno, se colocan 36.5 mmoles (9.5 gr) de (\pm) -1,2:4,5-Di-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**2**), se agregan 308 mmoles (43 ml) de trietilamina (p.eb: 89 °C, δ : 0.728 gr/ml) y 12.8 mmoles (1.9 grs) de 4-pirrolidinpiridina. Desde ampolla de compensación se agrega gota a gota 91.5 mmoles (24.7 grs) de anhídrido valproico (p.eb.: 109°C/0,85 mmHg, δ : 0.890 gr/ml) a temperatura ambiente. Tiempo de agregado: 40 minutos. El control de reacción se realiza mediante CCD.

La reacción se interrumpe a las 24 hs, se concentra en evaporador rotatorio y se seca en tambor de vacío. Se obtiene un sólido el cual se purifica mediante cristalización usando como solvente metanol.

Peso obtenido 6.62 grs.

R_f producto: 0.7 (diclorometano)

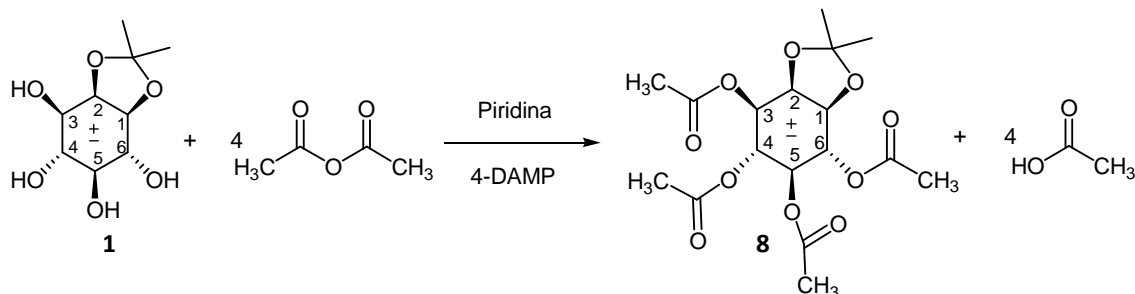
Rendimiento: 35 %

Rendimiento literatura⁷: 36%

Punto de fusión: 144-146°C (metanol), literatura⁷: 144-145°C

Capítulo 5

Síntesis de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-acetil-1,2-O-isopropiliden-myoinositol (**8**)



En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno, se colocan 18 mmoles (4 gr) de (\pm)-1,2-O-isopropiliden-myoinositol (**2**), se agregan 150 mmoles (12 ml) de piridina (p.eb: 114 °C, δ : 0.983 gr/ml) y 5.5 mmoles (0.67 grs) de 4-dimetilaminopiridina. Se adapta baño a 0°C (hielo-agua) y desde ampolla de compensación se agregan gota a gota 145 mmoles (13.7 ml) de anhídrido acético (δ : 1.08 gr/ml). Tiempo de agregado: 60 minutos. Se lleva a temperatura ambiente y se continúa la agitación durante 3 horas. Se concentra en evaporador rotatorio. Se realiza una extracción con 15 ml de diclorometano y 5 ml de solución saturada de Cloruro de Sodio, luego con 5 ml de Bicarbonato de sodio al 5%, y la última con 5 ml de solución saturada de cloruro de sodio, se controla pH con tira de papel indicador Merck, pH 6.5. Se separa la fase orgánica y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio, y se seca en tambor de vacío a peso constante, obteniéndose un sólido amarillento. Se cristaliza en diclorometano, se filtra por buchner y se lava el sólido con éter etílico, seca en tambor hasta peso constante.

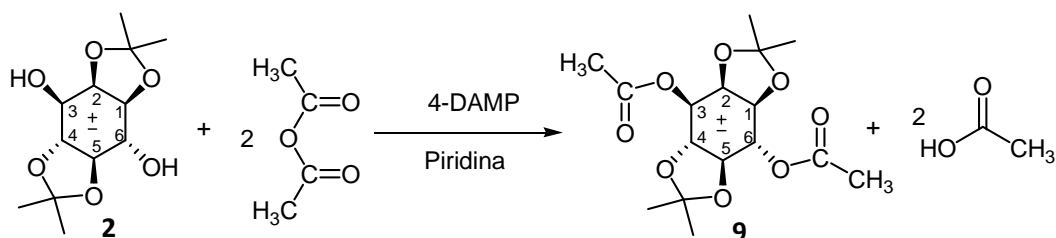
Peso del producto 4.75 grs.

R_f producto: 0.82 (diclorometano:metanol 10:1)

Rendimiento: 68%

Punto de fusión: 235-236°C (diclorometano) (sublima)

Síntesis de (±)-3,6-Di-O-acetil-1,2:4,5-di-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**9**)



En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno se colocan 8 mmoles (2 grs) de (±)-1,2-*O*-isopropiliden-*myo*-inositol (**2**), se agregan 5 ml de diclorometano y 37.6 mmoles (3 ml) de Piridina (p.eb: 115 °C, δ : 0.983 gr/ml). Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua). Se agrega 2.8 mmoles (342 mg) de 4-dimetilaminopiridina y desde ampolla de compensación se adiciona gota a gota 25 mmoles (2.4 ml) de anhídrido acético (δ : 1.08 gr/ml). Se deja reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente formándose una suspensión blanca. Se concentra en evaporador rotatorio. Se realiza una extracción con 15 ml de Diclorometano y 5 ml de solución saturada de Cloruro de Sodio, separa la fase acuosa, lava la fase orgánica con 5 ml de Bicarbonato de sodio al 5%, y posteriormente con 5 ml de solución saturada de cloruro de sodio. Se controla pH con tira de papel indicador Merck, pH 6. Se separa la fase orgánica y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio, y se seca hasta peso constante en tambor de vacío obteniéndose un sólido blanco pastoso. Se cristaliza desde acetona.

Peso del producto obtenido 1.65 grs.

Rf producto: 0.71 (diclorometano:metanol 20:1)

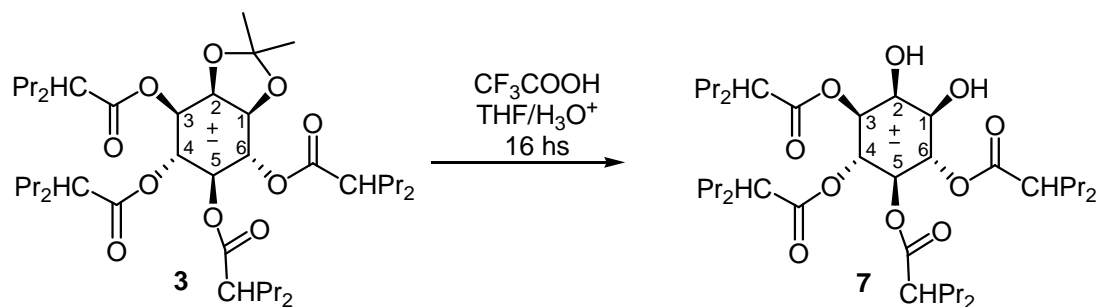
Rendimiento: 60 %

Punto de fusión: 226-228°C (acetona) (sublima), literatura³: 230-232°C (acetato de etilo)

Capítulo 5

Reacciones de hidrólisis de los grupos protectores

Síntesis de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-(2-propilpentanoil)-*myo*-inositol (**7**)



En un balón se colocan 5.5 mmoles (4 gr) de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-(2-propilpentanoil)-1,2-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**3**), se agregan 25 ml una solución acuosa de tetrahidrofurano (THF: agua = 4:1). Se adapta agitación magnética a temperatura ambiente, se observa formación de una emulsión blanca. Desde una ampolla de compensación se agrega gota a gota 269 mmoles (20 ml) del ácido trifluoroacético (p.eb: 72°C, δ : 1.535 g/ml) mientras se enfría la reacción en un baño de hielo-agua. Tiempo de agregado: 40 minutos. Se observa formación de una solución límpida incolora. El control de la reacción se realiza por CCD. A las 16 hs. se interrumpe la reacción. Se concentra en evaporador rotatorio con agregado de hexano anhidro, se seca en tambor de vacío hasta peso constante. Se obtiene un sólido blanco de peso 4.015 g. Se purifica por cristalización en éter de petróleo. El peso del producto obtenido fue de 2.4 grs.

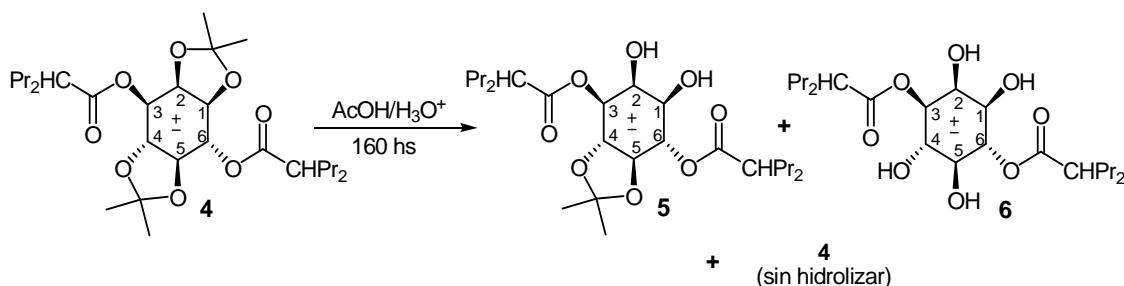
R_f producto: 0.56 (diclorometano:acetona 20:1).

Rendimiento: 64 %

Rendimiento literatura⁷: 62%

Punto de fusión: 80-81°C (éter de petróleo), literatura¹³: 80-82°C.

Síntesis de (\pm)-3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-4,5-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**5**) y de (\pm)-3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-*myo*-inositol (**6**).



En un balón se colocan 3.9 mmoles (2 gr) de (\pm)-1,2:4,5-Di-O-isopropiliden-3,6-di-O-(2-propilpentanoil)-*myo*-inositol (**4**), se agregan 25 ml una solución acuosa de ácido acético al 75%. Se adapta agitación magnética a temperatura ambiente. Se observa formación de una suspensión. El control de la reacción se realiza por CCD. A los 7 días se detiene la reacción se observa presencia de 3 productos por CCD. Se concentra en evaporador rotatorio con agregado de hexano anhidro, se seca en tambor de vacío hasta peso constante. Peso del producto crudo obtenido 1.8 grs de sólidos blancos. Se purifica por pasaje de columna cromatográfica de sílica gel, utilizando diclorometano como solvente de elución. Se aumenta el gradiente de la fase móvil a diclorometano:acetona 20:1. Las fracciones se controlan mediante CCD. Se recogen 150 fracciones de aproximadamente 4 ml cada una. Se separan 3 compuestos, recuperando el producto de partida (**4**) (15%) y los 2 compuestos de hidrólisis **5** y **6** (63 y 13.5 % respectivamente).

Compuesto **5**:

Rf producto: 0.60 (diclorometano:acetona 10:1)

Rendimiento: 63 %

Punto de fusión: 89-90°C (diclorometano). literatura¹³: 89.5-90°C.

Compuesto **6**:

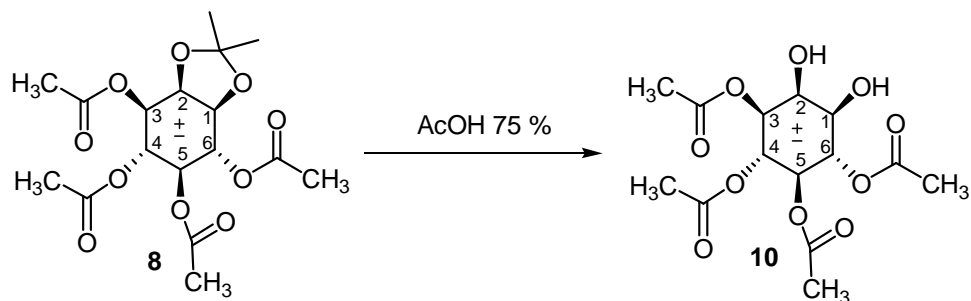
Rf producto: 0.36 (diclorometano:acetona 10:1)

Rendimiento: 13.5 %

Punto de fusión: 140-142°C (acetona). Literatura¹³: 140-143°C.

Capítulo 5

Síntesis de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-acetil-*myo*-inositol (**10**)



En un balón se colocan 5.1 mmoles (2 grs) de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-acetil-1,2-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**8**) y se agregan 20 ml de Ácido Acético 75 %. Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 3 días.

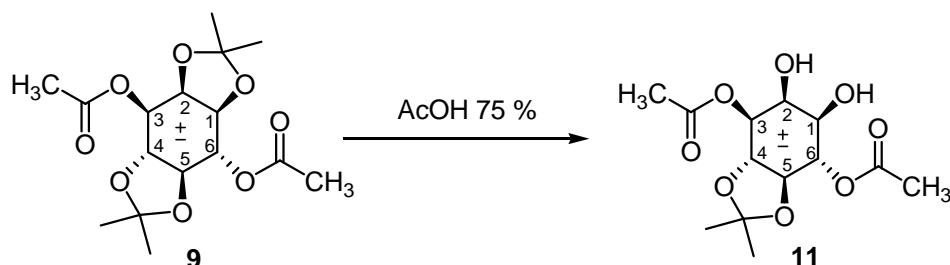
Se concentra en evaporador rotatorio, al producto residual se le agregan 15 ml de diclorometano, se lava una vez con 5 ml de solución de bicarbonato de sodio al 5% y 2 veces con 5 ml de solución saturada de cloruro de sodio y, se controla el pH con tiras indicadoras de pH Merck, reacción neutra. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor. Se purifica por columna cromatografía de sílica gel, utilizando diclorometano como solvente de elución. Las fracciones se controlan mediante CCD. Se recogieron 65 fracciones de aproximadamente 3 ml cada una. Se reunieron las fracciones que presentan semejantes CCD, las fracciones 42-60, se secan en tambor de vacío hasta peso constante, obteniéndose 1.1 grs sólido blanco. Se cristaliza en diclorometano.

Rf producto: 0.53 (diclorometano:metanol 10:1)

Rendimiento: 52 %

Punto de fusión: 104-106°C (diclorometano)

Síntesis de (\pm)-3,6-Di-O-acetil-4,5-O-isopropiliden-myoinositol (**11**)



A una solución de 3.5 mmoles (1.2 grs) de (\pm)-3,6-Di-O-acetil-1,2:4,5-di-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**9**) en 6 ml de diclorometano se agregan 10 ml de Ácido Acético 75 %. Se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 5 días. Se concentra en evaporador rotatorio, al producto residual se le agregan 15 ml de diclorometano, se lava una vez con 5 ml de solución de bicarbonato de sodio al 5% y 2 veces con 5 ml de solución saturada de cloruro de sodio, se controla el pH con tiras indicadoras de pH Merck, reacción neutra. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra, se elimina el solvente en evaporador rotatorio y seca en tambor de vacío hasta peso constante. Se purifica por columna cromatografía de sílica gel, utilizando diclorometano:metanol 10:1 como solvente de elución. Las fracciones se controlan mediante CCD. Se recogieron 30 fracciones de aproximadamente 3 ml cada una. Se reunieron las fracciones 9-20, por presentar semejantes CCD, se concentran en evaporador rotatorio y se seca a peso constante en tambor de secado, obteniéndose 420 mg de un sólido blanco. Se cristaliza en diclorometano.

Rf producto: 0.57 (diclorometano:metanol 10:1)

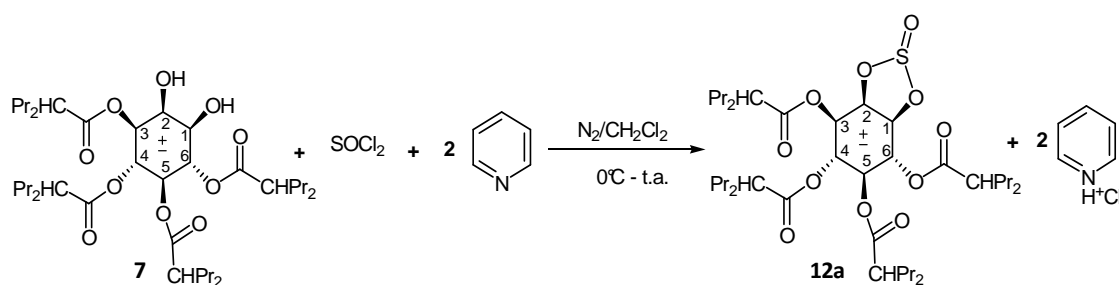
Rendimiento: 40 %

Punto de fusión: 129-134°C (diclorometano)

Capítulo 5

Síntesis de sulfatos cíclicos derivados del *myo*-inositol

Síntesis de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-(2-propilpentanoil)-sulfito cíclico de *myo*-inositol (**12a**)

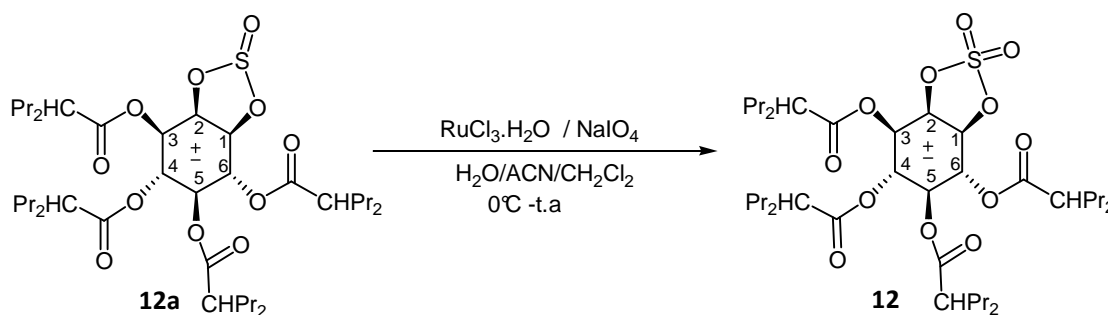


En un balón y bajo atmósfera de nitrógeno, se colocan 1.5 mmoles (1 gr) de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-(2-propilpentanoil)-*myo*-inositol (**7**), se agregan 10 ml de diclorometano anhidro y 3.2 mmoles (0.26 ml) de piridina (p.eb: 114°C , δ : 0.983 gr/ml). Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua). Se agrega desde jeringa purgada con nitrógeno seco 1.6 mmoles (0.12 ml) de cloruro de tionilo (p.eb: 75°C , δ : 1.638 gr/ml). Se adapta agitación magnética y deja reaccionar durante 1 hora. Se observó una solución incolora.

Se agrega diclorometano hasta llegar a un volumen de solución aproximado de 15 ml, y se lava 3 veces con 5 ml de solución saturada de cloruro de sodio fría. Se seca la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, se obtienen 1.2 grs de un sólido amarillento.

Debido a la inestabilidad de los sulfitos, según los controles obtenidos por CCD y cambio de color en poco tiempo, se decide no purificar el producto y se utiliza el crudo en la siguiente reacción.

Síntesis de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-(2-propilpentanoil)-sulfato cíclico de *myo*-inositol (**12**)



En un balón se colocan 1.64 mmoles (1.2 grs) de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-(2-propilpentanoil)-sulfito cíclico de *myo*-inositol (**12a**) recientemente sintetizado y se agregan 2 ml de acetonitrilo y 2 ml de diclorometano. Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua) y se agrega gota a gota una solución compuesta de 500 mgs de iodato de sodio en 3 ml de agua destilada y cantidades catalíticas de Cloruro de Rutenio monohidrato (5 mg). Se deja reaccionar en la oscuridad durante 1 hora. Se observa formación de una suspensión oscura. Se agregan 15 ml de Éter Etílico, separa y lava fase etérea 3 veces con 5 ml de agua fría. Se separa la fase etérea y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio; se seca el producto hasta peso constante en tambor de vacío, obteniendo un sólido negruzco. Se purifica por cromatografía en columna de sílica gel, utilizando como solvente de elución diclorometano:hexano 1:1. Se aumenta el gradiente de la fase móvil a diclorometano:hexano 2:1. Las fracciones se controlan mediante CCD. Se recogieron 60 fracciones de aproximadamente 6 ml cada una. Se reúnen las fracciones 13-50, por presentar semejante CCD, se concentra el solvente en evaporador rotatorio y se seca el producto hasta peso constante en tambor de vacío, obteniéndose 500 mg de un sólido blanco.

Rf producto: 0.63 (diclorometano:hexano 1:1)

Rendimiento: 42 %

Punto de fusión: $61-63^\circ\text{C}$

IR (KBr), cm^{-1} : 1750 (C=O); 1402 (SO_2)

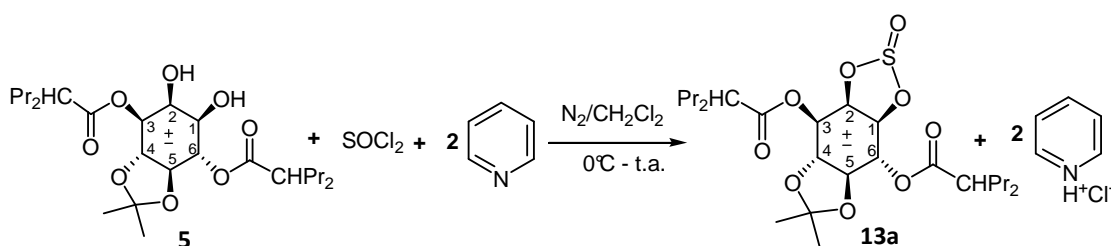
^1H NMR (cloroformo- d_3): δ 0.84-0.96 (m, 24H, CH_3 valproilo); 1.20-1.71 (m, 32H, 16 x CH_2); 2.26-2.52 (m, 4H, CH); 4.99 (dd, J 5.3, J 7.3 Hz, 1H, H-6); 5.10 (dd, J 6.3, J 2.9 Hz, 1H, H-2); 5.28 (dd, J 7.3, J 2.9 Hz, 1H, H-3); 5.30 (t, J 7.3 Hz, 1H, H-4); 5.38 (t, J 7.3 Hz, 1H, H-5); 5.50 (dd, J 5.3, J 6.3 Hz, 1H, H-1).

Capítulo 5

^{13}C NMR (cloroformo- d_3): δ 14.08, 14.16, 14.26 (valproil 8 x CH_3 , solapamiento); 20.54, 20.58, 20.61, 20.72, 20.79, 20.86, (8 x CH_2CH_3 , 2 solapamiento); 33.95, 34.03, 34.06, 34.09, 34.12, 34.18, 34.27, 34.35 (8 x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 44.63, 44.88, 45.02, 45.21 (4 x CH); 67.02, 68.35, 70.20, 71.43, 75.97, 78.23 (inositol 6 x CH); 174.08, 174.12, 174.82, 175.21 (4 x C=O éster).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{66}\text{O}_{12}\text{S}$: PM:746.1 C:61.1, H:8.8, O:25.8, S:4.3, encontrado C:60.8, H:8.7, O:26.5, S: 4.0

*Síntesis de (\pm)-3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-4,5-O-isopropiliden-sulfito cíclico de myo-inositol (**13a**)*

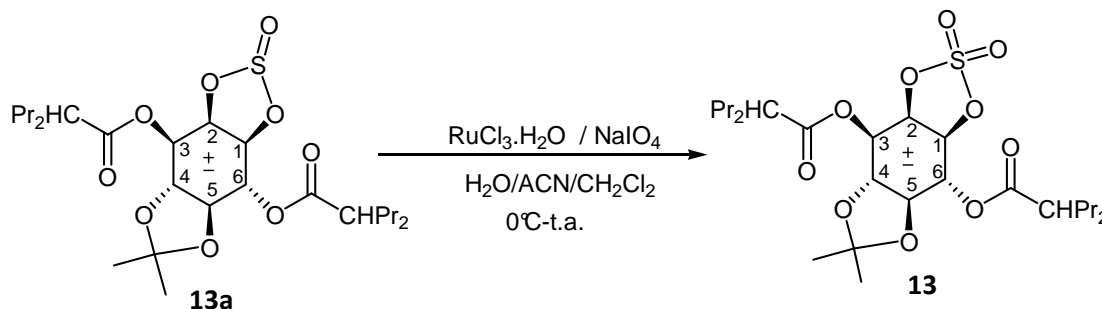


En un balón bajo corriente de nitrógeno seco, se colocan 1.28 mmoles (604 mg) de (\pm)-3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-4,5-O-isopropiliden-*myo*-inositol (**5**), se agregan 4 ml de diclorometano anhidro y 2.8 mmoles (0.20 ml) de piridina (p.eb: 114°C , δ : 0.983 gr/ml). Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua) y se agrega gota a gota, desde jeringa purgada con nitrógeno seco, 1.4 mmoles (0.1 ml) de cloruro de tionilo (p.eb: 75°C , δ : 1.638 gr/ml) en 2 ml de diclorometano anhidro. Se deja reaccionar durante 1 hora. Se observa formación de una solución incolora.

Se agrega diclorometano hasta llegar a un volumen total de solución aproximado de 10 ml, y se lava tres veces con 3 ml de solución saturada de cloruro de sodio fría, controla el pH final con tiras indicadoras de pH Merck, reacción neutra. Se seca la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 700 mg de un sólido blanco.

No se purifica por la inestabilidad del producto, como fue explicado anteriormente, y se usa directamente en la siguiente reacción.

Síntesis de (\pm)-3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-4,5-O-isopropiliden-sulfato cíclico de *myo*-inositol (**13**)



En un balón se colocan 1.3 mmoles (700 mg) de (\pm)-3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-4,5-O-isopropiliden-sulfito cíclico de *myo*-inositol (**13a**) recientemente sintetizado, se agregan 2 ml de acetonitrilo y 2 ml de diclorometano. Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua). Se agrega gota a gota una solución compuesta de 350 mg de iodato de sodio en 3 ml de agua destilada y cantidades catalíticas de Cloruro de Rutenio monohidrato (5 mg). Se deja reaccionar en la oscuridad durante 2 horas. Se observa formación de una suspensión oscura. Se agrega 15 ml de Éter Etílico, separa y lava la fase etérea 3 veces con 5 ml de agua fría. Se separa la fase etérea y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio, se seca el producto hasta peso constante en tambor de vacío, obteniéndose un sólido negruzco. Se purifica por cromatografía en columna de sílica gel, utilizando diclorometano como solvente de elución. Las fracciones se controlan mediante CCD. Se recogen 45 fracciones de aproximadamente 6 ml cada una. Se juntan las fracciones 12-35 por presentar semejante perfil en CCD, se elimina el solvente y seca a peso constante en tambor de vacío, peso obtenido 614 mg de un sólido blanco. Se purifica por cristalización en diclorometano. Rendimiento de la cristalización: se obtuvieron 228 mg de un sólido cristalino.

Rf producto: 0.54 (diclorometano)

Rendimiento: 36 %

Punto de fusión: $147\text{-}148.5^\circ\text{C}$ (diclorometano).

IR (KBr), cm^{-1} : 1760 (C=O); 1340 (SO_2).

^1H NMR (cloroformo- d_3): δ 0.87, 0.90, 0.94 (3s, 12H, $(\text{CH}_3)_4$; 1 solapamiento); 1.24-1.66 (m, 16H, CH_2); 1.30, 1.58 [2s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$]; 2.37-2.57 (m, 2H, CH); 4.2 (dd, J 6.8, J 4.3 Hz, 1H, H-5); 4.52 (t, J 10.2 Hz, 1H, H-1); 4.61 (t, J 4.3 Hz, 1H, H-4); 5.17 (t, J 10.2 Hz, 1H, H-2); 5.42 (dd, J 10.2, J 4.3 Hz, 1H, H-3); 5.50 (dd, J 11.2, J 6.8 Hz, 1H, H-6).

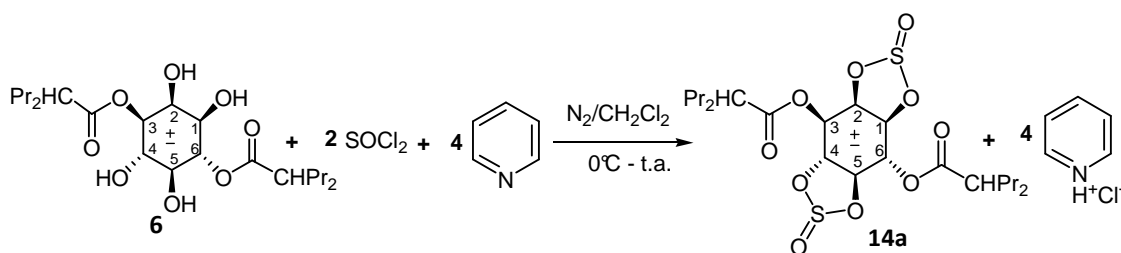
^{13}C NMR (cloroformo- d_3): δ 14.11 (valproil 4 x CH_3); 20.58, 20.63, 20.73 (4 x CH_2CH_3 , 1 solapamiento), 25.91, 27.76 (2 x CH_3); 34.69, 34.76 (4 x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, 2

Capítulo 5

solapamiento); 45.29, 45.35 (2 x CH); 67.65, 70.65, 74.25, 76.63, 80.84, 81.09 (inositol 6 x CH); 111.49 (C(CH₃)₂); 175.75, 174.94 (2 x C=O éster).

Análisis elemental: % calculado para C₂₅H₄₂O₁₀S: PM:534.3 C:56.2, H:7.9, O:29.9, S:6.0, encontrado C:56.3, H:7.9, O:29.6, S:6.2

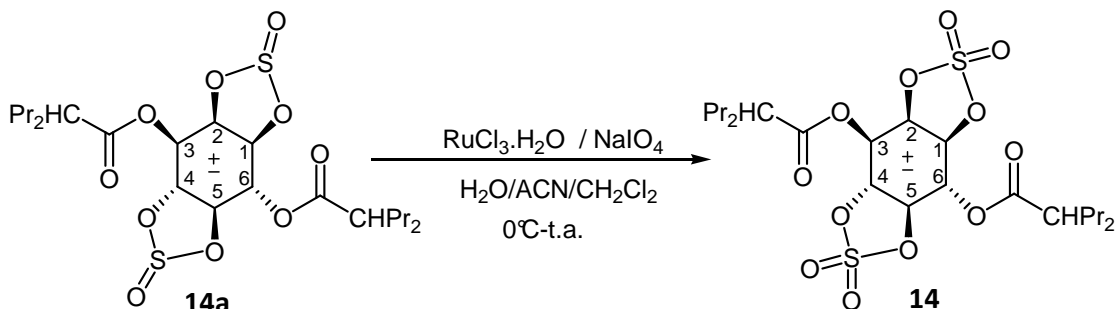
Síntesis de (±)-3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-di-sulfito cíclico de myo-inositol (**14a**)



En un balón bajo atmosfera de nitrógeno, se colocan 3 mmoles (1.3 grs) de (±)-3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-myo-inositol (**6**), se agregan 10 ml de diclorometano anhidro y 13.2 mmoles (1.06 ml) de piridina (p.eb: 114 °C, δ : 0.983 gr/ml). Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua) y se agrega gota a gota desde jeringa, purgada con nitrógeno seco, 6.6 mmoles (0.48 ml) de cloruro de tionilo (p.eb: 75 °C, δ : 1.638 gr/ml) en 4 ml de diclorometano anhidro. Se deja reaccionar durante 30 minutos, obteniendo una solución color naranja.

Se agrega diclorometano hasta llegar a un volumen de solución aproximado de 20 ml, y se lava tres veces con 5 ml de solución saturada de cloruro de sodio fría, reacción pH neutro al control por tiras indicadoras. Se seca la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 1.4 grs de un sólido amarillento.

No se purifica por la inestabilidad del producto, como fue explicado anteriormente, y se usa directamente en la siguiente reacción.

Síntesis de (\pm) -3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-di-sulfato cíclico de *myo*-inositol (**14**)


En un balón se colocan 2.7 mmoles (1.4 grs) de (\pm) -3,6-Di-O-(2-propilpentanoil)-di-sulfito cíclico de *myo*-inositol (**14a**) recientemente sintetizado y se agregan 6 ml de acetonitrilo, 6 ml de diclorometano. Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua) y se agrega gota a gota una solución compuesta de 700 mg de iodato de sodio en 9 ml de agua destilada y cantidades catalíticas de Cloruro de Rutenio monohidrato (10 mg). Se deja reaccionar en la oscuridad durante 2 horas. Se observa formación de una suspensión marrón. Se agrega 15 ml de Éter Etílico, separa y lava fase etérea 3 veces con 5 ml de agua fría. Se separa la fase etérea y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio, se seca el producto hasta peso constante en tambor de vacío, obteniéndose un sólido negruzco. Se realiza una purificación por cromatografía en columna de sílica gel, utilizando diclorometano:hexano 5:1 como solvente de elución. Las fracciones se controlan mediante CCD. Se recogieron 80 fracciones de aproximadamente 4 ml cada una. Se juntaron las fracciones 44-70, se elimina el solvente y se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, obteniéndose 450 mg de un sólido blanco, el cual se purifica por cristalización *en frío*. Se solubiliza el producto en la mínima cantidad de diclorometano a temperatura ambiente, se agrega gota a gota hexano, hasta observar ligera opalescencia, y se enfría (lleva a heladera, congelador y freezer) se observa formación de cristales, y centrifuga en Craig invertido en frío. Seca a peso constante en tambor de vacío los cristales obtenidos.

Rf producto: 0.60 (diclorometano:hexano 5:1)

Rendimiento: 30%

Punto de fusión: $136\text{-}138^\circ\text{C}$ (diclorometano/hexano).

IR (KBr), cm^{-1} : 1734 (C=O); 1233, 1155 (SO_2).

^1H NMR (cloroformo-*d*3): δ 0.88-0.95 (m, 12H, CH_3); 1.25-1.68 (m, 16H, CH_2); 2.49 (m, 2H, CH); 3.98 (t, J 10.74 Hz, 1 H, H5); 4.48 (dd, J 7.8, J 2.9 Hz 1H, H-1);

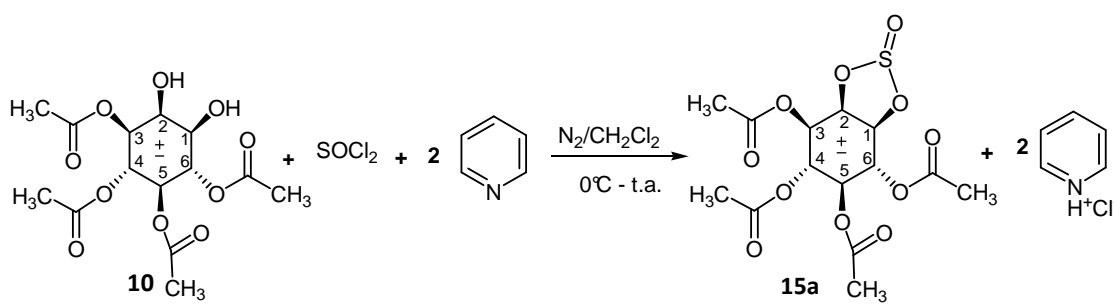
Capítulo 5

4.88 (dd, J 7.3, J 4.8 Hz Hz, 1 H, H-6); 5.0 (t, J 10.74, 1 H, H-3); 5.43 (m, 1H, H-4); 5.6 (m, 1H, H-2).

^{13}C NMR (cloroformo- d_3): δ 13.97 (valproil 4 x CH_3); 20.69 (4 x CH_2CH_3 , solapamiento); 34.62 (4 x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, solapamiento); 45.14, 45.46 (2 x CH); 67.74, 70.35, 71.36, 79.51, 80.26, 83.12 (inositol 6 x CH); 175.15, 175.56 (2 x C=O éster).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_{12}\text{S}_2$: PM:556.6, C:47.5, H:6.5, O:34.5, S:11.5, encontrado C:47.6, H:6.6, O:34.4, S:11.4

Síntesis de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-*O*-acetil-sulfito cíclico de *myo*-inositol (**15a**)

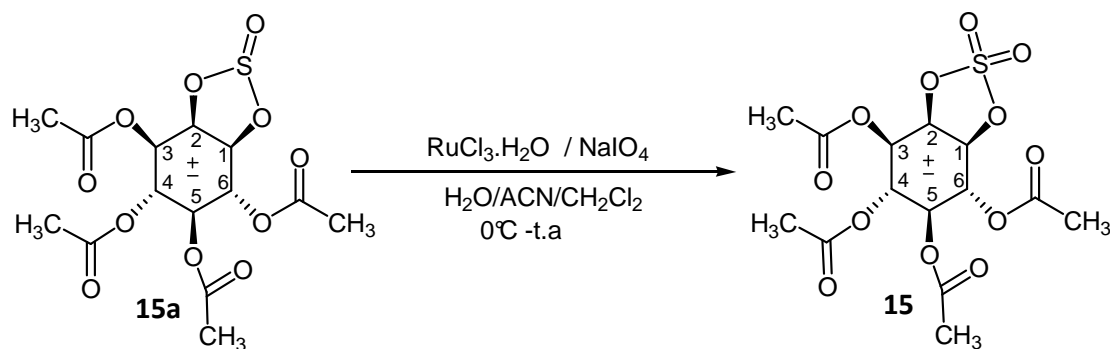


En un balón bajo atmosfera de nitrógeno, se colocan 13.68 mmoles (4.76 gr) de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-*O*-acetil-*myo*-inositol (**10**), se agregan 10 ml de diclorometano anhidro y 27.4 mmoles (2.2 ml) de piridina (p.eb: 114 $^\circ\text{C}$, δ : 0.983 gr/ml). Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua) y se agrega gota a gota desde jeringa purgada con nitrógeno, 15 mmoles (1.09 ml) de cloruro de tionilo (p.eb: 75 $^\circ\text{C}$, δ : 1.638 grs/ml.) en 2 ml de diclorometano anhidro. Se deja reaccionar durante 2 horas. Se observa una solución límpida incolora.

Se agrega 15 ml de diclorometano, y se lava tres veces con 5 ml de solución saturada de cloruro de sodio fría. Controla el pH de la fase acuosa, reacción neutra a tira indicadora. Se separa la fase orgánica y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio, se seca el producto hasta peso constante en tambor de vacío, obteniéndose 4 grs de un aceite amarillento.

No se purifica por la inestabilidad del producto, como fue explicado anteriormente, y se usa directamente en la siguiente reacción.

Síntesis de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-acetil-sulfato cíclico de *myo*-inositol (**15**)



En un balón se colocan 10 mmoles (4 grs) de (\pm)-3,4,5,6-Tetra-O-acetil-sulfito cíclico de *myo*-inositol (**15a**) recientemente sintetizado y se agregan 4 ml de acetonitrilo y 4 ml de diclorometano. Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua). Se agrega gota a gota una solución compuesta de 2 grs de Iodato de sodio en 6 ml de agua destilada y cantidades catalíticas de Cloruro de Rutenio monohidrato (15 mg). Se deja reaccionar en la oscuridad durante 2 horas. Se observa formación de una suspensión oscura. Se evapora el solvente en evaporador rotatorio, quedando una suspensión verdosa. Se agregan 20 ml de Éter Etilico y se lava la fase etérea 3 veces con 5 ml de agua fría. Se separa la fase etérea y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio, se seca el producto hasta peso constante en tambor de vacío, obteniéndose un sólido negruzco. Se purifica por cromatografía en columna de sílica gel, utilizando diclorometano: metanol 40:1 como solvente de elución. Las fracciones se controlan mediante CCD. Se recogen 40 fracciones de aproximadamente 8 ml cada una. Se juntan las fracciones 8-24, de semejante comportamiento en CCD, se elimina el solvente en evaporador rotatorio y se seca en tambor de vacío obteniéndose 2.8 gramos de un sólido blanco, el cual se purifica por cristalización en diclorometano en frío. Se solubiliza el producto en la mínima cantidad de diclorometano a temperatura ambiente, se agrega gota a gota hexano, hasta observar ligera opalescencia, y se enfría (lleva a heladera, congelador y frezeer) se observa formación de cristales, y centrifuga en Craig invertido en frío. Seca a peso constante en tambor de vacío los cristales obtenidos.

Se obtuvieron 2.4 gramos de un sólido blanco cristalino.

Rf producto: 0.53 (diclorometano).

Rendimiento: 45 %

Punto de fusión: $137\text{-}140^\circ\text{C}$. (descompone)

IR (KBr), cm^{-1} : 1745 (C=O); 1467 (SO_2)

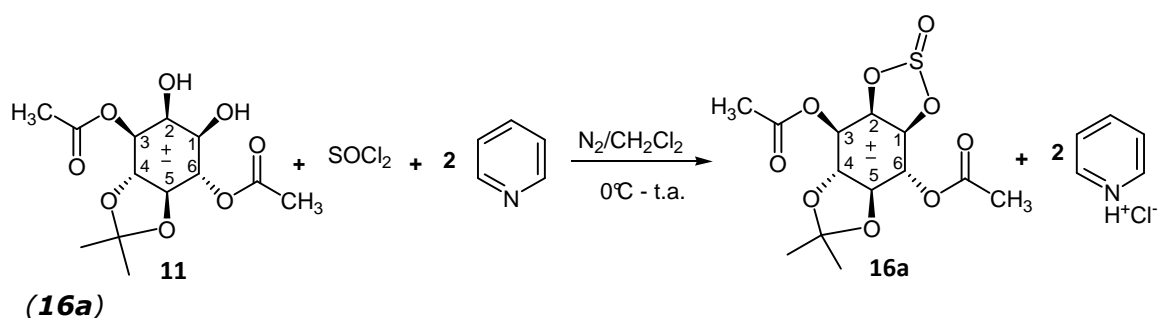
^1H NMR (cloroformo- d_3): δ 2.02, 2.04, 2.06, 2.11 (4s, 12H, COCH_3); 5.03 (m, 2 H, H-4, H-5); 5.29 (m, 3 H, H-1, H-3, H-6); 5.57 (dd, J 6.6, J 8.9 Hz, 1H, H-2).

Capítulo 5

^{13}C NMR (cloroformo- d_3): δ 20.69 (4 x CH_3 , solapamiento); 67.53, 69.48, 69.62, 70.20, 77.45, 80.09 (inositol 6 x CH); 168.80, 169.06, 169.64, 169.72 (4 x C=O éster).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_{12}\text{S}$: PM: 410.2 C: 41.0, H: 4.4, O: 46.8, S: 7.8, encontrado C: 40.8, H: 4.4, S: 7.6 O: 47.2

Síntesis de (\pm)-3,6-Di-O-acetil-4,5-O-isopropiliden-sulfito cíclico de *myo*-inositol

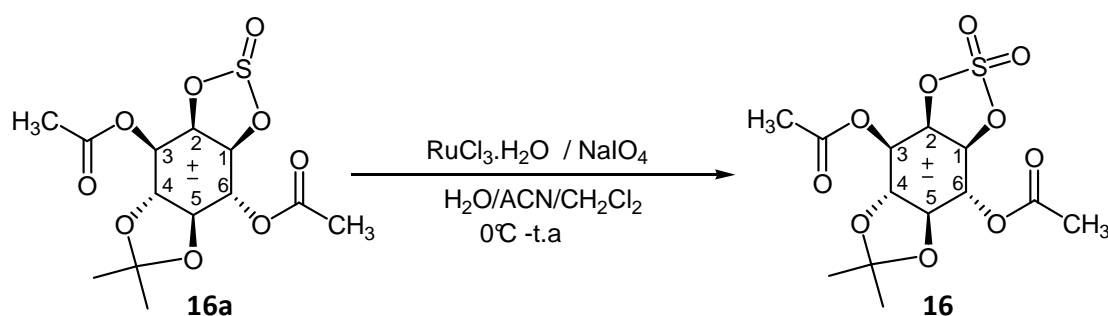


En un balón bajo atmósfera de nitrógeno, se colocan 1.22 mmoles (370 mg) de (\pm)-3,6-Di-O-acetil-4,5-O-isopropiliden-*myo*-inositol (11), se agregan 5 ml de diclorometano anhidro y 2.6 mmoles (0.21 ml) de piridina (p.eb: 114 °C, δ : 0.983 gr/ml). Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua) y se agrega gota a gota desde jeringa purgada con nitrógeno, 1.4 mmoles (0.1 ml) de cloruro de tionilo (p.eb: 75 °C, δ : 1.638 grs/ml.) en 1 ml de diclorometano anhidro. Se deja reaccionar durante 1 hora. Se observa una solución transparente.

Se agrega 15 ml de diclorometano, y se lava tres veces con 5 ml de solución saturada de cloruro de sodio fría. Se controla el pH de la fase acuosa, reacción neutra a tira indicadora. Se separa la fase orgánica y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio, se seca el producto hasta peso constante en tambor de vacío, obteniéndose 0.4 grs de un sólido amarillento.

No se purifica por la inestabilidad del producto, como fue explicado anteriormente, y se usa directamente en la siguiente reacción.

Síntesis de (\pm)-3,6-Di-O-acetil-4,5-O-isopropiliden-sulfato cíclico de *myo*-inositol (**16**)



En un balón se colocan 1.14 mmoles (0.4 grs) de (\pm)-3,6-Di-O-acetil-4,5-O-isopropiliden-sulfito cíclico de *myo*-inositol (**16a**) *recientemente sintetizado* y se agregan 2 ml de acetonitrilo y 2 ml de diclorometano. Se enfría la mezcla a 0°C (baño de hielo-agua). Se agrega gota a gota una solución compuesta de 0.3 grs de Iodato de sodio en 3 ml de agua destilada y cantidades catalíticas de Cloruro de Rutenio monohidrato (10 mg). Se deja reaccionar en la oscuridad durante 2 horas. Se observa formación de una suspensión oscura. Se evapora el solvente en evaporador rotatorio, obteniéndose una suspensión verdosa. Se realiza una extracción con 15 ml Éter Etílico y 3 veces con 5 ml de agua destilada fría. Se separa la fase orgánica y se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio, quedando un sólido negruzco. Se realiza una cromatografía en columna de sílica gel, utilizando diclorometano como solvente de elución. Las fracciones se controlan mediante CCD. Se recogen 70 fracciones de aproximadamente 3 ml cada una. Se juntan las fracciones 24-66 de semejante comportamiento en CCD, se elimina el solvente en evaporador rotatorio y se seca en tambor de vacío obteniéndose 210 miligramos de un sólido blanco, el cual se purifica por cristalización en diclorometano en frío. Se solubiliza el producto en la mínima cantidad de diclorometano a temperatura ambiente, se agrega gota a gota hexano, hasta observar ligera opalescencia, y se enfría (lleva a heladera, congelador y frezeer) se observa formación de cristales, y centrifuga en Craig invertido en frío. Seca a peso constante en tambor de vacío los cristales obtenidos. Se obtienen 176 miligramos de un sólido blanco cristalino.

Rf producto: 0.89 (diclorometano).

Rendimiento: 42 %

Punto de fusión: 138-140°C (diclorometano).

IR (KBr), cm^{-1} : 1731 cm^{-1} (C=O), 1270 (SO_2)

Capítulo 5

^1H NMR (cloroformo- d_3): δ 1.50, 1.60 (2s, 6H, CH_3); 2.13-2.19 (m, 6H, COCH_3); 4.23 (m, H, H-2), 4.54 (m, 2 H, H-1, H-6), 5.02-5.52 (m, 3 H, H-3, H-4, H-5).

^{13}C NMR (cloroformo- d_3): δ 20.88 (2 x CH_3); 26.11, 27.02 (2 x COCH_3); 70.54, 71.08, 74.36, 80.66, 81.02, 81.61 (inositol 6 x CH); 112.77 (1 x $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 169.3, 169.9 (2 x $\text{C}=\text{O}$ éster).

Análisis elemental: % calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_{10}\text{S}$: PM: 366 x C: 42.6, H: 4.9, S: 8.7 O: 43.8, encontrado C: 42.5, H: 4.8, S: 8.8, O: 43.9

Conclusiones

En el presente capítulo, *Síntesis de los compuestos propuestos*, parte central de la presente tesis, abordo distintos temas, los que se pasan a enumerar:

- 1) Planificación y retrosíntesis de las moléculas en cuatro etapas en secuencia lineal.
- 2) Preparación de los reactivos, dado que no son comerciales, cloruro de valproílo, anhídrido valproico, protección de OH selectivamente, acetales mono y diacetónido del *myo*-inositol.
- 3) Síntesis, aislamiento y caracterización fisicoquímica de 9 derivados esterificados.
- 4) Puesta a punto y obtención por hidrólisis selectiva de 5 derivados.
- 5) Síntesis de nuevos heterociclos de ellos, 5 sulfitos intermediarios (inestables) y donde se caracterizaron e identificaron 5 sulfatos derivados del *myo*-inositol.

Observación: Los rendimientos finales de reacción son bajos debido a la complejidad molecular de los compuestos, a la reactividad de los derivados de *myo*-inositol, a los numerosos pasos de reacción y a la formación de isómeros. El bajo rendimiento atenta con el objetivo principal que es demostrar la actividad anticonvulsiva, para lo cual se necesita del orden de 500 mg de cada compuesto, lo que me obligo a tener que repetir varias veces la preparación de los mismos.

Referencias Capítulo 5

1. Sureshan, K.M.; Shashidhar, M.S.; Praveen, T.; Das, T., *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 4477-4504.
2. Potter, B.V.L.; Lampe, D.; *Angew. Chem.*, **1995**, 34, 1933-1972.
3. Gigg, J.; Gigg, R.; Payne, S.; Conant, R., *Carbohydr. Res.*, **1985**, 142, 132-134.
4. Baker, G.R.; Billington, D.C.; Gani, D., *Tetrahedron*, **1991**, 47, 3895-3908.
5. Lee, H.W.; Kishi, Y., *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 4402-4404.
6. Desai, T.; Gigg, R.; Payne, S.; Penades, S.; Rogers, H., *J. Carbohydr. Res.*, **1992**, 216, 197-209.
7. Bodor, N.; Moon, S.C.; Bruno-Blanch, L., *Pharmazie*, **2000**, 55, 184-186.
8. Vacca, J.P.; Jane de Solms, S.; Huff, J.R.; Billington, D.C.; Baker, R.; Kulagowski, J.J.; Mawer, I.M., *Tetrahedron*, **1989**, 45, 5679-5702.
9. Dreef, C.E.; Tuinman, R.J.; Lefeber, A.W. M.; Elie, C.J.; Van der Marel, G.A.; Van Boom, J.H., *Tetrahedron*, **1991**, 47, 4709-4722.
10. Sureshan, K.M.; Devaraj, S.; Shashidhar, M.S., *Tetrahedron*, **2009**, 65, 2703-2710.
11. Chung, S.K.; Ryu, Y., *Carbohydrate Research*, **1994**, 258, 145-167.
12. Moon, S.C.; Echeverría, G.A.; Punte, G.; Ellena, J.; Bruno-Blanch, L.E., *Carbohydrate Research*, **2007**, 342, 1456-1461.
13. Moon, S.C.; Síntesis de nuevos compuestos anticonvulsivos Amidas y Ésteres del Ácido Valproico, Tesis Doctoral, 2006.
14. Evans, M.E.; Parrish, F.W.; Long, L., *Carbohydr. Res.*, **1967**, 3, 453-462.
15. Maryanoff, B.E.; Costanzo, M.J.; Nortey, S.O.; Greco, M.; Shank, R.P.; Schupsky, J.J.; Ortegon, M.P.; Vaught, J.L., *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 1315-1343.
16. (a) Baker, W.; Field, F.B., *J. Chem. Soc.*, **1932**, 86-91. (b) Carlson, W.W.; Cretcher, L.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1947**, 69, 1952-1956.
17. Gao, Y.; Sharpless, K.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 7538-7539.
18. Kaiser, E.T.; Panar, M.; Westheimer, F.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 602-607.
19. Lohray, B.B.; *SYNTHESIS*, **1992**, 1035-1052.
20. Van Woerden, H.F., *Chem. Rev.*, **1963**, 63, 557-571.
21. Kim, B.M.; Sharpless, K.B., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 655-658.
22. Berridge, M.S.; Franceschini, M.P.; Rosenfeld, E.; Tewson, T.J., *J. Org. Chem. Soc.*, **1990**, 55, 1211-1217.

Capítulo 6

Evaluación Biológica

Introducción

El éxito o fracaso de todo proyecto de desarrollo de fármacos, depende de la validez del modelo biológico elegido para su evaluación. A lo largo de esta tesis se han presentado distintos casos, en donde por diferentes motivos, proyectos de nuevos fármacos presentaron fallas en las pruebas en humanos, hasta casos en que llegaron a que el medicamento fuera retirado del mercado, a pesar de haber sido aprobado por los órganos de control para su comercialización. Los estudios preclínicos en animales tienen por objeto demostrar la eficacia y seguridad de un posible fármaco, antes de su introducción en voluntarios humanos (Fase I).

Este tipo de modelos evalúan la actividad y toxicidad de nuevos candidatos, lo que permite descartarlos rápidamente si no manifiestan los efectos deseados. Además, proveen información inicial sobre la farmacocinética del compuesto y respecto al posible mecanismo por el cual actúan. Inevitablemente, cualquier compuesto exitosamente identificado en la etapa preclínica debe ser sometido a la evaluación en humanos. Es por ello que se espera que los experimentos en animales tengan una gran capacidad predictiva respecto a la eficacia y seguridad del fármaco en la etapa clínica. Todo proyecto de diseño de fármaco, para ser efectivo en sus resultados debe tener un modelo o test de evaluación farmacológica que cumpla con las siguientes características:

- *Tiempo de realización de la evaluación número de compuestos testeado.*
Debe poder evaluar el mayor número de compuestos en el menor tiempo posible
- *Capacidad de diferenciar los compuestos activos de aquellos que no lo son.*
Debe diferenciar sin duda cuales compuestos deben seguir en las etapas posteriores de evaluación, de aquellos que deben ser descartados.
- *Correlación no correspondencia entre las evaluaciones en animales y humanos.*
El modelo, si bien debe ser simple, en su evaluación debe tratar de aproximarse lo más posible a la patología en estudio.

Desarrollo de modelos anticonvulsivos en animales

La generación de convulsiones en animales para estudiar la actividad anticonvulsiva y la potencia de compuestos antiepilépticos fue reportada por primera vez en el año 1882. El experimento utilizaba un estímulo farádico administrado de forma directa en el colmillo de un perro para que llegue hasta la corteza cerebral y fue utilizado para estudiar los efectos protectores del bromuro de potasio, de la atropina y la chinchona. Las técnicas experimentales recién fueron utilizadas en investigaciones en gran escala a partir de los trabajos de Merritt y Putnam hacia finales de la década del 30.¹ El modelo experimental de inducir convulsiones propuesto inicialmente por Merritt y Putman consistía en producir descargas eléctricas, electroshock, en gatos. El éxito de esta técnica creó interés en desarrollar modelos animales más simples y menos costosos que requieran menor cantidad del compuesto a evaluar. En el año 1945 se reportaron una variedad de ensayos en ratones orientados a determinar el umbral convulsivo por electroshock.² Durante el desarrollo de estos ensayos fueron identificados un número de factores filogenéticos y ontogenéticos que están implicados en la producción de la convulsión y en la protección. Las comparaciones de la respuesta entre la rata y el ratón a los compuestos antiepilépticos no mostraron diferencias cualitativas, aunque se conoce que entre diversas especies de ratones ocurren diferencias cuantitativas e incluso cualitativas. Una de estas causas se encontró durante los distintos estados de maduración del animal, donde se producen llamativos cambios en la susceptibilidad a la convulsión y la respuesta a los fármacos. Por lo tanto la elección del animal y su etapa de desarrollo fueron importantes en los ensayos a realizar. El Pentilentetrazol (PTZ) fue introducido para los ensayos de evaluación de anticonvulsivos en 1944 por Richards y Everett, cuando demostraron la capacidad de la trimetadiona de prevenir las convulsiones provocadas por este convulsivante químico. Una variedad de otros compuestos químicos (picrotoxina, metionina sulfoximide, etc.) fueron subsiguientemente empleados pero ninguno de ellos fue extensamente utilizado o fue tan efectivo como el PTZ.³

Otra modificación del ensayo de umbral anticonvulsivo por electroshock, fue el ensayo de baja frecuencia o "psicomotor". La semejanza de la reacción producida con las convulsiones parciales complejas y la inhibición de esta por la fenacemida, un fármaco particularmente eficaz contra este tipo de convulsión, apoyaron inicialmente su reputación como un modelo selectivo de investigación. Pero en 1953, Brown y col.⁴ investigaron la diferencia entre el ensayo psicomotor y el ensayo del umbral mínimo de electroshock utilizando 8 fármacos de uso clínico.

Encontraron que las medidas de los dos ensayos eran cualitativamente equivalentes y las clasificaciones de los fármacos eran similares. No pudieron encontrar ninguna correlación entre los resultados del ensayo psicomotor y la eficacia en convulsiones psicomotoras y se concluyó que no había fundamentos para el uso de este ensayo como prueba específica.

Así se ponía de manifiesto que ninguno de los ensayos disponibles eran capaces de la identificación de todos los fármacos conocidos clínicamente efectivos. Los investigadores comenzaron a construir perfiles de acción de los compuestos basados en grupos de modelos de convulsiones. Estos modelos incluyeron generalmente el ensayo de Electroshock máximo, el ensayo de Pentilentetrazol, y al menos uno de los siguientes ensayos: el umbral de electroshock de 60 Hz o el ensayo de convulsión por electroshock de baja frecuencia. La composición de este grupo de ensayos, muestra el conocimiento que se dispone para conocer que la modificación en el patrón de convulsiones máximas y la elevación del umbral convulsivo representaban dos mecanismos fisiológicos diferentes. Jenney y col⁵, a través de un estudio de los ensayos MES y PTZ demostraron que la actividad antipentilentetrazol correlacionaba bien con la eficacia clínica de las crisis de ausencia y la actividad anti MES correlaciona con la eficacia clínica en las convulsiones generalizadas y parciales. Everett y Richards demostraron que las convulsiones inducidas por PTZ pueden ser bloqueadas con Trimetadiona (TMO) y Fenobarbital (PB) pero no por Fenitoína. Posteriormente Lennox demostró que TMO fue efectivo en disminuir o prevenir las crisis de ausencia pero fue inefectivo o empeoró las convulsiones generalizadas tónico-clónicas. El éxito de TMO en clínica y su habilidad para bloquear el umbral de las convulsiones inducidas por PTZ suministraron la correlación necesaria para establecer el **ensayo PTZ como un modelo de crisis de ausencia o petit mal.**

Los estudios preclínicos en animales pueden clasificarse de acuerdo a dos grandes categorías:⁶

- 1- modelos de ataques agudos.
- 2- modelos de epilepsia crónica.

En los ensayos de ataques agudos, se provoca la convulsión en animales no epilépticos mediante un estímulo físico o químico. Los más utilizados son la inducción eléctrica (Maximal Electroshock Seizure test o ensayo MES) y la inducción química por administración de pentilentetrazol (ensayo PTZ o Met). En el ensayo MES se induce el episodio convulsivo mediante la aplicación de una descarga eléctrica controlada. En el ensayo PTZ, éste se provoca mediante la administración

Capítulo 6

de un agente convulsivo: el pentilentetrazol (PTZ). En ambos casos se mide la capacidad de un fármaco, administrado previamente, para evitar la convulsión inducida.

Por otra parte, en los modelos de epilepsia crónica se promueve que los animales manifiesten los ataques epilépticos en forma espontánea, o que sean más susceptibles al mismo. Los modelos genéticos, junto con los experimentos de encendido de amígdala,⁷ son los más precisos a la hora de definir un perfil preclínico. El mérito del trabajo con modelos de epilepsia crónica para la identificación de nuevos compuestos se ilustra usualmente con el descubrimiento del levetiracetam, fármaco recientemente incorporado al mercado. Este compuesto es inactivo en MES y PTZ pero es muy activo cuando se testea frente a modelos genéticos o de encendido de amígdala. La eficacia de este compuesto parece deberse a que actúa por un nuevo mecanismo de acción, dado que muestra un comportamiento electrofisiológico atípico relativo a los otros fármacos conocidos.

El modelo de encendido de amígdala de epilepsia parcial es frecuentemente utilizado en el proceso de desarrollo de fármacos anticonvulsivos. En contraposición con el ensayo MES y PTZ, el encendido es un modelo de epilepsia focal y es bastante predictivo de la epilepsia

En el presente, los tres modelos in vivo que son utilizados rutinariamente en las fases iniciales de las evaluaciones, en la mayoría de los programas de descubrimiento de fármacos antiepilépticos, incluyen el ensayo MES (Maximal Electroshock Seizure test) y el ensayo PTZ (Pentilentetrazol test), y los modelos de encendido de amígdala (kindling). De ellos los modelos de convulsiones MES y subcutáneo PTZ (scPTZ) representan los modelos animales de convulsiones más utilizados.

Los ensayos clásicos con animales no epilépticos (como MES y PTZ) fallan en la identificación de nuevos mecanismos, por lo que se dificulta el descubrimiento de drogas que actúan de forma diferente a las conocidas. Por razones prácticas, los ensayos más utilizados no son modelos de epilepsia crónica. Estos son extremadamente laboriosos como para un testeo inicial, requieren mayor cantidad de recursos y demandan mucho mayor tiempo.

Los ensayos MES y scPTZ se conducen fácilmente, y son favorables a las investigaciones cuando hay que evaluar muchos compuestos, dado que requieren técnicos expertos pero una inversión mínima en equipamiento. Los datos obtenidos son valiosos con respecto a la potencial actividad anticonvulsiva de un fármaco en investigación. Con una excepción, el Levetiracetam (LEV), todos los fármacos

antiepilépticos actualmente disponibles fueron encontrados activos en uno o ambos de los mencionados ensayos.⁸ (Tabla 6.1)

Tabla 6. 1. Correlación entre la eficacia anticonvulsivante y la utilidad clínica de fármacos anticonvulsivantes establecidas en modelos animales experimentales.

Modelo Experimental	Tipo de Crisis clínica		
	Tónico-clónicas generalizadas	Ausencias generalizadas y/o mioclónicas	Convulsiones Parciales
MES (extensión tónica)	CBZ, PHE, VPA, PB, FLB, GBP, LTG, TOP, ZNS.		
PTZ (convulsión clónica)		ESM, VPA, PB, BZD, FLB, GBP, TGB, VGB.	
Encendido de amígdala (kindling) (convulsiones focales)			CBZ, PHT, VPA, PB, BZD, FBM, GBP, LTG, TPM, TGB, ZNS, LVT, VGB.

MES: Electroshock máximo, CBZ: carbamazepina, PHE: fenitoína, VPA: valproato, PB: fenobarbital, FLB: felbamato, GBP: gabapentin, LTG: lamotrigina, TOP: topiramato, ZNS: zonisamida, ESM: etosuccimida, BZD: benzodiazepina, TGB: tiagabina, VGB: vigabatrin, LVT: levetiracetam.

El proceso de "evaluación en masa", desarrollado por Goodman y col.², quienes emprendieron extensivos estudios sobre la "terapia y fisiología de desordenes convulsivos experimentales" permitieron que los modelos de convulsiones inducidas por MES y PTZ, fueran considerados en los años 60's los únicos modelos necesarios para la evaluación de fármacos anticonvulsivos, ya que sus efectos se correlacionaban con todos los aspectos de la epilepsia clínica, y miles de compuestos fueron evaluados utilizando estos modelos. El programa de búsqueda de Fármacos Antiepilepticos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) fue la culminación de este desarrollo. Entre 1975 y 1995 el programa del NIH evaluó **16000** compuestos utilizando el ensayo MES y también el ensayo PTZ. De estos 16000 compuestos, 2700 mostraron tener acción anticonvulsiva, 130 fueron evaluados en estudios más avanzados, 11 entraron en pruebas clínicas, **6** han sido presentados para su aprobación y **uno** ha sido lanzado al mercado (Felbamato). **Se estima que para estas evaluaciones se llevaron a cabo más de 5 millones de experimentos en animales.**

Capítulo 6

Los modelos MES, PTZ y de encendido desempeñaron un importante papel en el desarrollo de la segunda generación de fármacos antiepilépticos introducidos desde 1993 y como tales han contribuido a mejorar el control de las crisis de los pacientes epilépticos. Sin embargo, ninguno de estos modelos de convulsiones reflejan necesariamente el modelo "ideal" de la epilepsia. A este respecto, el modelo "ideal" debe reflejar una fenomenología y patofisiología similar a la epilepsia humana.

Desde una perspectiva del descubrimiento de fármacos, el modelo ideal deberá proporcionar una oportunidad de determinar la eficacia contra un fenotipo de convulsiones fármacorresistentes y permitir la evaluación temprana de la habilidad de un fármaco para modificar el curso de la epilepsia que sigue a un daño epileptogénico. Desafortunadamente, es altamente improbable que cualquier modelo animal pueda predecir el potencial terapéutico completo de un fármaco antiepiléptico en desarrollo, debido a que la epilepsia humana es un desorden neurológico heterogéneo que abarca muchos fenotipos y síndromes de la convulsión. Esto hace necesaria la evaluación de los fármacos en desarrollo en varios modelos de sistemas síndrome específicos.

Programa de Desarrollo de Fármacos Antiepilépticos.

La evaluación de la actividad anticonvulsiva de los compuestos sintetizados y su efecto neurotóxico, se realizó de acuerdo al Programa de Desarrollo de Fármacos Antiepilépticos.⁹ Este programa fue impulsado por el sector dedicado a la epilepsia del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NINCDS-NIH), e incluye una serie de fases experimentales destinadas a la evaluación preclínica, que se agrupan dentro del Anticonvulsant Screening Program (ASP). Éste programa presenta 7 fases preclínicas, las cuales se describen en la Tabla 6.2.

	Descripción	Especie animal	Vía de adm. ^a
Fase I	Identificación del nivel de actividad anticonvulsiva y neurotóxica. -ensayo MES -ensayo PTZ -ensayo Rotorod	Ratón	i.p.
Fase II	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica como DE ₅₀ , DT ₅₀ y IT. -ensayo MES -ensayo PTZ -ensayo Rotorod	Ratón	i.p.
Fase III	Perfil de toxicidad. -DL ₅₀ -DH ₅₀	Ratón	i.p.
Fase IV	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva por vía oral para determinar las características de absorción y metabolismo.	Ratón	p.o.
Fase V	Diferenciación y comparación con drogas antiepilépticas conocidas para la determinación del mecanismo de acción. -ensayo de umbral convulsivo por PTZ -ensayo de umbral convulsivo por picrotoxina -ensayo de umbral convulsivo por bicuculina -ensayo de umbral convulsivo por estriquina -estudios in vitro de unión a receptores	Ratón	i.p.
Fase VI	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica como DE ₅₀ , DT ₅₀ y IT de otras especies.	Rata	p.o.
Fase VII	Estimación de la DL ₃ y de los efectos de administración prolongada. -DL ₃ luego de administración diaria durante 3 días. -Administración durante 5 días -Ensayo de duración de sueño por hexobarbital -Estudios in vitro de enzima microsomal (mutagenicidad)	Rata	p.o.

Tabla 6.2. Descripción de las fases del programa ADD. ^a vía de administración: intraperitoneal (i.p.) u oral (p.o.). DE₅₀: dosis efectiva media, DT₅₀: dosis tóxica media, IT: índice terapéutico, DL₅₀: dosis letal media, DH₅₀: dosis hipnótica media, DL₃: dosis letal mínima. Información tomada de Porter y colaboradores⁹

La **fase I** del programa consiste en la identificación de los compuestos con actividad significativa y baja neurotoxicidad mediante el testeo en ratones de los ensayos MES, PTZ y Rotorod (tabla 6.2). Actualmente se realiza midiendo la

Capítulo 6

respuesta frente al ensayo MES a 0.5 y 4 horas, administrando el compuesto a concentraciones de 30, 100 y 300 mg/kg para cada tiempo. Se usan tres animales para cada dosis. El mismo esquema se sigue para PTZ y todos los ratones usados se someten al ensayo de Rotorod, previa y post administración del compuesto a ensayar.

De acuerdo a los resultados obtenidos los compuestos pueden clasificarse en cuatro categorías:¹⁰

Categoría 1.- Son aquellos compuestos que presentan actividad anticonvulsivante a **dosis de 100 mg/kg o menos**. Estos compuestos pasan a la **fase 2**.

Categoría 2.- Son aquellos compuestos que presentan actividad anticonvulsivante a **dosis mayores a 100 mg/kg**. Puede o no seguir con futuras evaluaciones de acuerdo a lo novedoso de su estructura.

Categoría 3.- Compuestos inactivos a **dosis inferiores a 300 mg/kg**. Son aquellos que no muestran actividad o solamente a 600mg/kg. Son excluidos en las futuras consideraciones.

Categoría 4.- Aquellos que muestran **actividad y neurotoxicidad a dosis de 30 mg/kg o menos**, los cuales son usualmente reensayados a una dosis menor a 30mg/kg.

La **fase 2** implica la cuantificación de la acción anticonvulsiva en ratones. En esta segunda etapa se determina la dosis efectiva media (DE_{50}) en MES y PTZ.

Asimismo se calcula la dosis tóxica media (DT_{50}) y con ella el índice terapéutico (IT) que presenta el compuesto (Tabla 6.2). Para ello inicialmente se establece el tiempo de efecto máximo (TEM), el cual surge de la evaluación de la droga a distintos tiempos; generalmente a 30, 60, 120 y 240 minutos (o hasta que el tiempo de mayor actividad o neurotoxicidad haya pasado). Las dosis mencionadas en fase 2 se calculan al TEM determinado. Detalles de estos cálculos se explican más adelante en la parte experimental del presente trabajo.

La dosis efectiva media y la dosis toxica media son parámetros muy importantes por tratarse de los indicadores más usados en el análisis de la potencia de un compuesto en la etapa preclínica. Además permiten la comparación con los correspondientes a fármacos antiepilépticos ya conocidos.

En este trabajo se aplicaron las dos primeras fases de este programa para la evaluación anticonvulsiva y neurotóxica de heterociclos derivados del Ácido valproico y *myo*-inositol. A continuación se describen las condiciones experimentales y la metodología específica utilizada, tanto para la clasificación de

los compuestos de acuerdo a la fase 1, como para el cálculo de las dosis indicadas en la fase 2 de los compuestos más activos.

Trabajo experimental de Evaluación Biológica

Animales de experimentación.

Los animales utilizados en las evaluaciones farmacológicas para la determinación de la actividad anticonvulsiva como neurotóxica son ratones albinos adultos (provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias – U.N.L.P.), cuyo peso es de 18 a 23 g. (figura 6.2). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio de tránsito del Área Diseño de Fármacos de

evaluaciones farmacológicas para la



Figura 6.1. Jaula colectiva que usan los ratones antes del ensayo, se observa el libre acceso de los mismos al agua y comida.

la Facultad de Ciencias Exactas (U.N.L.P.), que consta de un ambiente para la cría y mantenimiento de los ratones y otro ambiente separado para la determinación tanto de la actividad anticonvulsiva como neurotóxica. Los ratones se mantienen en jaulas colectivas (figura 6.1) de hasta 12 animales por sexo y rango de peso, como una medida de la etapa de crecimiento que poseen (crías en amamantamiento, animales jóvenes, adultos, animales en reproducción y hembras preñadas, etc.).

Se han usado sólo los machos para evitar la influencia del sexo. Se ha tratado de usar los animales de similar edad (de 4 a 7 semanas de vida) para minimizar la variabilidad biológica y el criterio de selección fue el peso. Los animales fueron mantenidos en ciclos de 12hs. de luz/oscuridad y permitiendo el libre acceso al alimento balanceado y agua, (excepto durante el ensayo, donde están separados en compartimientos individuales (figura 6.2) (para ensayos mayores a 4hs. se permite el acceso al agua y para mayores a 8 hs también el alimento). Los animales recién recibidos en el



Figura 6.2. Ratones albinos en jaulas individuales utilizadas durante el ensayo biológico.

Capítulo 6

Bioterio se estabilizan durante una semana antes del ensayo, con el objeto de compensar a las restricciones de agua, alimento y el posible estrés por el traslado y cambio del ambiente, es lo que se conoce como periodo de adaptación.

En el momento de los ensayos, los ratones son pesados y colocados en compartimentos individuales hasta la finalización de la evaluación. Una vez finalizada la determinación de la actividad biológica, los animales son guardados en lotes separados por tiempo (para la determinación del TEM) y por dosis empleados (durante la determinación del DE₅₀). Estos ratones son observados durante 72 hs, con el objeto de detectar posibles efectos tóxicos que pudiesen manifestarse a largo plazo ocasionando, por ejemplo, la muerte del animal.

Preparación y administración de los compuestos.

A la hora de evaluar la actividad biológica se deben preparar las soluciones de los compuestos para la administración a los ratones. El programa ADD (Antiepileptic Drug Development) admite el empleo de solución fisiológica (para compuestos solubles en agua), soluciones de metilcelulosa y polietilenglicol 400 (PEG 400) para la preparación de soluciones, suspensiones o emulsiones (para compuestos que son poco o insolubles en solución fisiológica). Los compuestos estudiados no son solubles en agua, por lo tanto no fue posible preparar soluciones con solución fisiológica. Se utilizó el PEG 400 y para que no influya en los resultados biológicos, no se debe usar más de un cuarto de la DL₅₀ (dosis letal media) de dicho solvente, para evitar confusiones en los resultados obtenidos. Así, el PEG 400 posee un valor de dosis letal media de 12.6 ml/Kg de ratón cuando la administración es *i.p.* y de 26 ml/Kg de ratón cuando la administración es vía *p.o.*¹¹ Debido a esto se utiliza 3 ml de PEG 400 por kilogramo de ratón para solubilizar el compuesto a administrar por vía intraperitoneal. Dependiendo del compuesto se utiliza solamente el PEG 400 o con agregado de cantidades variables de agua. Siempre se respeta el volumen de PEG 400 que es de 3 ml por Kg de ratón y la cantidad de agua agregada puede variar (dependiendo de la solubilidad del compuesto) siendo el volumen máximo utilizado de 7 ml por Kg de ratón (el volumen final del compuesto llega a ser de 3ml/Kg de ratón solamente con el agregado de PEG 400 y un máximo de 10 ml/Kg con el agregado adicional de 7ml de agua, pudiendo ser volúmenes intermedios dependiendo de la cantidad de agua agregada).

Cuando el compuesto es sólido, se morterea hasta obtener un polvo fino homogéneo y se solubiliza en PEG 400. Se somete a ultrasonido para favorecer la disolución, y si no se logra solución límpida, se calienta a 37°C la preparación.

Luego se agrega agua y se repite el sonicado y calentamiento si es necesario hasta obtener una solución límpida. Cuando el compuesto es líquido, se solubiliza con PEG 400, y si no se logra disolución, se calienta a 37°C. Luego se incorpora el agua y repite la operación si es necesario.

Al momento de la administración, las preparaciones son soluciones límpidas en PEG 400 o en la mezcla de PEG 400 con agua. Para un ratón de 20 g, según las proporciones de PEG 400 y agua utilizados, los volúmenes de administración varían desde 0,06 hasta 0,20 ml. Para la administración de la solución se utilizan jeringas de 1 ml con graduaciones al 0,01 ml.

Las vías de administración pueden ser:

* Vía *i.p.* (intraperitoneal): la inyección se realiza en el abdomen del animal formando un ángulo de 30° aproximadamente con el plano del cuerpo, utilizando agujas 27G 1/2 cuando se inyectan soluciones y 25G 5/8 cuando se trata de suspensiones o emulsiones. Al retirar la aguja se presiona suavemente con un trozo de algodón para verificar posibles pérdidas de volumen de administración.



Figura 6.3. Vía de administración intraperitoneal (*i.p.*)

* Vía *p.o.* (oral): la administración se realiza por vía oral a través de una aguja especialmente adaptada o una cánula de teflón para poder llegar hasta el estómago del animal (figura 6.4).



Figura 6.4. Vía de administración oral (*p.o.*)

* Vía *s.c.* (subcutánea): la inyección se efectúa en un pliegue suelto de la piel de la línea media de la nuca del ratón. Se utiliza aguja 27G 1/2 y se controla que no haya pérdida de la solución del compuesto.

La vía de administración *s.c.* se utiliza para la aplicación de los agentes convulsivos (en este trabajo, PTZ), mientras que la vía *i.p.* y *p.o.* se utilizan para la administración de los compuestos a evaluar dependiendo de la fase de evaluación.



Figura 6.5. Vía de administración subcutánea. (*s.c.*)

Capítulo 6

Modelos animales utilizados.

Ensayo MES.

Este ensayo consiste en la aplicación de una descarga eléctrica controlada a animales de experimentación (en ratones para este trabajo) con el objeto de provocarles un episodio convulsivo. Se determina la capacidad que tiene un compuesto administrado previamente, de prevenir la convulsión. Este modelo identifica a los compuestos que previenen la *propagación de la descarga convulsiva*. Aparato utilizado: el equipo utilizado para la generación del estímulo eléctrico que provoca la convulsión en ratas y ratones, responden en líneas generales al diseño original propuesto por Woodbury y Davenport.¹²

En el Laboratorio de Química Medicinal cuenta con un equipo Ugo Basile – Biological Research Apparatus, Varese, Italia, uno de los modelos de aparatos de electroshock más nuevos usados actualmente en las pruebas de convulsión.

En este aparato se pueden fijar:

- la *corriente* a aplicar, entre 10 y 100mA, ya que la corriente necesaria para provocar una convulsión varía según las distintas especies animales,
- la *frecuencia* del estímulo (o sea la cantidad de pulsos por segundo), entre 1 y 250 Hz,
- la *duración* total de la descarga, entre 0,1 y 9,9 segundos, y
- el *ancho del pulso* de corriente, entre 0,1 y 9,9 milisegundos.

Para el ensayo en ratones, se emplean los parámetros típicos de estimulación para lograr una convulsión, es decir, una corriente de 50 mA, con una frecuencia de 60 Hz, y un ancho de pulso de 2,8 milisegundos, aplicando el estímulo durante 0,2 segundos, de esta manera se logra obtener un tren de ondas rectangulares que provoca una respuesta convulsiva. El estímulo aplicado bajo estas condiciones corresponde a 4-5 veces el necesario para llegar al umbral de convulsión.

Existen distintos tipos de electrodos que se conectan al equipo y permiten entregar el paquete de descarga eléctrica deseada al animal. Los electrodos de orejas y los electrodos de córnea, que son los más utilizados en el Laboratorio de Química Medicinal ya que se cuentan con ambos tipos.



Figura 6.6. Electrodos de orejas y electrodos de ojos de córnea.

Los resultados de protección frente al ensayo MES presentados en este trabajo de Tesis se obtuvieron con electrodos de orejas en todos los casos. Los electrodos son humedecidos con gel fisiológico para conducción eléctrica en el momento de la aplicación en las orejas del animal, con el objeto de asegurar el contacto y favorecer la conducción de la corriente eléctrica.

Las convulsiones máximas comprenden un período corto de flexión tónica seguido de un período más largo de extensión tónica de los miembros posteriores, y finalmente se observa un episodio clónico (figura 6.7).

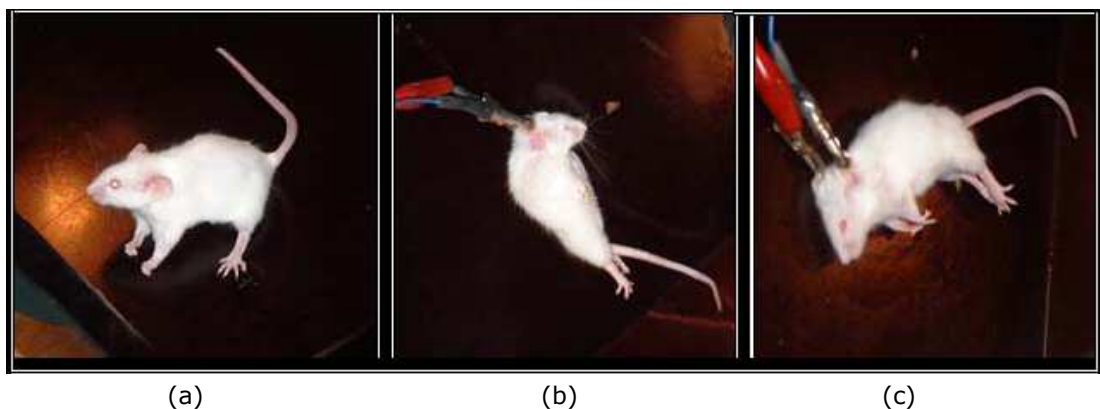


Figura 6.7. Fases de la convulsión máxima:(a) flexión tónica, (b) extensión tónica y (c) fase clónica.

La supresión de la fase de extensión tónica de los miembros posteriores (si la extensión tónica de estos miembros no excede de 90° con respecto al plano del cuerpo) indica que el compuesto puede prevenir las convulsiones inducidas por electroshock. Como se describe en la literatura,¹³ se consideró que la droga protegió frente a MES cuando en el ensayo no se observó convulsión máxima luego del estímulo.

Ensayo PTZ.

En este ensayo se inducen los episodios convulsivos por medio de un agente convulsivo: pentilentetrazol (PTZ) o metrazol. Aquí también se analiza la capacidad de un compuesto, administrado previamente, para prevenir la convulsión. Este modelo identifica compuestos que elevan el umbral convulsivo.

La solución de PTZ a utilizar se prepara momentos antes de la inyección en frasco opaco para evitar la fotodegradación. El PTZ se prepara en solución fisiológica y se administra a razón de 5ml/kg, ya que se observa que utilizando un mayor volumen, aumenta las probabilidades de pérdida de dicha solución por el punto de inyección al retirar la aguja. La cantidad de PTZ administrada (85 mg/Kg.) corresponde a la DC_{97} en ratones, es decir aquella que es capaz de inducir convulsiones en el 97 por ciento de los animales.¹⁴ El PTZ puede administrarse por varias vías. La vía s.c. es

Capítulo 6

la más utilizada aunque también puede utilizarse la vía *i.p.* a dosis 50-75 mg/Kg. o la *i.v.* (intravenosa) a 50 mg/Kg. Los resultados de protección frente al ensayo PTZ presentados en este trabajo corresponden al uso de la vía *s.c.* Una vez inyectados con PTZ, los animales son observados durante 30 minutos para determinar si se produce alguna convulsión. El PTZ provoca inicialmente sacudidas clónicas, que luego se hacen más sostenidas, y pueden conducir a un episodio tónico clónico. Como criterio para decidir protección o no frente a la convulsión, se toma la aparición de al menos un episodio clónico continuo de más de 5 segundos de duración. Como resultado de cada ensayo frente al ensayo PTZ se obtiene el porcentaje de protección del compuesto evaluado.

Ensayo Rotorod.

Este ensayo mide el efecto neurotóxico, manifestado como sedación o ataxia, que puede provocar un compuesto anticonvulsivo. Un ratón normal es capaz de mantener el equilibrio sobre un cilindro giratorio por largos períodos de tiempo. La inhabilidad de un ratón de mantener la caminata sobre el cilindro en cada uno de 3 ensayos sucesivos de 1 minuto, se considera como signo de sedación o ataxia.

Aparato utilizado: se utiliza un equipo construido en la Facultad de Ingeniería de la UNLP, en base al diseñado inicialmente por Dunham y Miya,¹⁵ y a semejanza del Roto-Rod treadmill for mice (Ugo Basile – Biological Research Apparatus, Varese, Italia). Este aparato consiste en un cilindro acrílico estriado de 3 cm de diámetro que gira a 6 r.p.m. sobre el cual se ubican los animales, separados unos de otros por paneles circulares opacos. Los animales que caen, lo hacen sobre una bandeja situada debajo del cilindro.



Figura 6.8. Aparato de Rotorod.

La velocidad de rotación puede graduarse en forma continua. Como resultado de cada ensayo frente al ensayo Rotorod se obtiene el porcentaje de toxicidad del compuesto.

Fase 1. Identificación de la acción anticonvulsiva y neurotóxica de los heterociclos derivados del *myo*-inositol.

Se presentan a continuación los resultados obtenidos mediante la evaluación biológica frente a los ensayos MES, PTZ y Rotorod de los compuestos sintetizados, correspondientes a la primera fase del programa ADD.

En MES y PTZ los resultados de actividad se expresan como la relación entre el número de animales que son protegidos respecto al número de animales totales usados en el ensayo:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{número de animales protegidos}}{\text{número total de animales}}$$

En Rotorod los resultados se formulan en función de la toxicidad de la droga; que es la relación entre el número de animales que caen del cilindro respecto al número de animales totales usados en el ensayo:

$$\text{Toxicidad} = \frac{\text{número de animales que caen}}{\text{número total de animales}}$$

Siguiendo los lineamientos del programa ADD,⁹ se midió la respuesta frente a estos ensayos luego de 0.5 y 4 hs de administrado el compuesto; a concentraciones de 30 y 100 mg/kg para cada tiempo. Tanto los ensayos como la administración se realizaron de la forma previamente detallada. Se efectuó una única modificación al programa relacionada con el número de animales utilizados. El uso de un animal para el testeó a dosis de 30 y 100 mg/Kg se considero insuficiente para obtener resultados confiables. Al tratarse del ensayo inicial para la detección de actividad de compuestos, que es el que determina si se continúa la evaluación del mismo, el uso de un único animal puede no ser significativo. Buscando un resultado más seguro, se utilizaron generalmente 3 ratones por dosis en el ensayo MES (tabla 6.3).

En el ensayo PTZ, se utilizaron 2 ratones por dosis. Esto se fundamenta en la experiencia recabada en nuestro laboratorio, que muestra que este ensayo es muy concluyente y a la vez muy cruento. Una vez administrado el PTZ, si la droga testeada no es efectiva, el animal comienza a sufrir episodios convulsivos rápidamente y estos duran mucho tiempo (generalmente más de media hora). En base a esto se eligió trabajar con dos ratones por dosis en esta fase. Todos los ratones usados en MES y PTZ fueron previamente sometidos al ensayo de Rotorod

Capítulo 6

para cada tiempo y dosis. Con esta información se evaluó la neurotoxicidad, dado que este ensayo es independiente del test al que preceden.

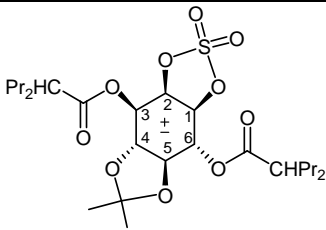
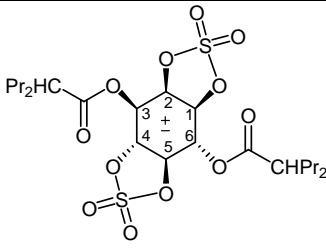
En la tabla 6.2 se expresan los datos obtenidos en esta etapa de evaluación, incluyéndose la clasificación de los compuestos de acuerdo a la actividad observada.

Los resultados obtenidos muestran a los 5 compuestos derivados de sulfato cíclico como activos, y *corresponden a la categoría 1* en el ensayo MES. Esta clase comprende a las especies con mayor actividad antiepiléptica que presentan protección a dosis de 100 mg/Kg o menores.

En cuanto al ensayo PTZ, las moléculas no mostraron actividad a las dosis y tiempos ensayados.

El compuesto 10, intermediario de síntesis del compuesto 15 no presenta actividad anticonvulsiva a las dosis y tiempos ensayados.

Si bien la clasificación expuesta considera promisorios compuestos activos en dosis hasta 100 mg/kg, en este trabajo, dada la marcada actividad de los compuestos, se fue más estricto en la selección, se eligieron solo las moléculas muy activas frente al ensayo MES (a 30 mg/Kg) e inactivas frente a PTZ a las dosis ensayadas. Se eligió la determinación de la DE50 del compuesto 15 ya que no posee ácido valproico en su estructura, pero si la función sulfato, con el objeto de cuantificar su presencia. Esta decisión se realizó con el objeto de continuar con las evaluaciones solo de los compuestos que presenten una actividad similar o mayor a las drogas antiepilépticas actuales, en el modelo de evaluación utilizado.

Compuesto	Clase en MES test	Dosis (mg/kg)	Test MES		Test PTZ		Test Rotorod	
			0,5 h	4 h	0,5 h	4 h	0,5 h	4 h
 <p>13</p>	1	30 100	2/3 0/3	0/3 1/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/6 0/6	0/6 0/6
 <p>14</p>	1	30 100	0/3 0/3	1/3 1/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/6 0/6	0/6 0/6

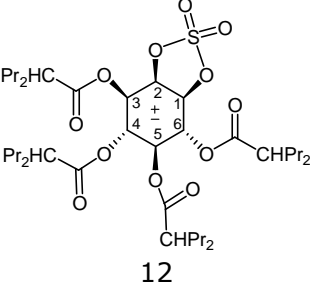
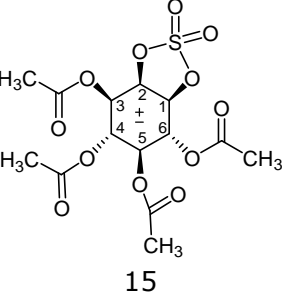
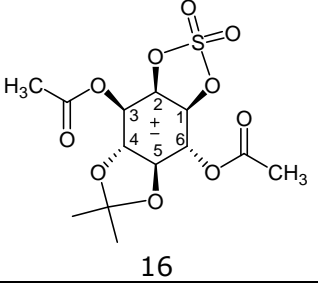
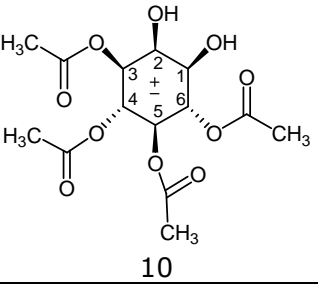
 <p>12</p>	1	30 100	1/3 0/3	1/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/6 0/6	0/6 0/6
 <p>15</p>	1	30 100	0/3 2/3	0/3 1/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/6 0/6	0/6 0/6
 <p>16</p>	1	30 100	1/3 1/3	1/3 2/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/6 0/6	0/6 0/6
 <p>10</p>	3	30 100	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/3 0/3	0/6 0/6	0/6 0/6

Tabla 6.3. Evaluación farmacológica de los compuestos sintetizados, según lo determinado para la fase 1 del programa ADD. **En la determinación de la actividad en Fase 1 observamos que los compuestos ensayados 12-16 poseen actividad anticonvulsiva sólo en el ensayo MES y además se clasifican en Clase 1, la más activa.**

Capítulo 6

Fase 2. Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica.

Consideraciones:

De acuerdo a lo expresado en el inicio de este capítulo, sólo se debe avanzar en la evaluación biológica de aquellos compuestos que tengan realmente posibilidades de llegar a ser un fármaco, de acuerdo al modelo elegido. Básicamente, en nuestro caso, se determina el perfil Fase 1 del ADD, si el/los compuestos se perfilan interesantes, se continúa con Fase II, que es determinación de la DE₅₀, TEM, DT₅₀. Muchos pueden ser los considerandos a tener en cuenta para usar este criterio, pero el principal, son las normas éticas sobre el manejo experimental de animales, no podemos probar fármacos donde exista una cierta duda sobre su efectividad. Este criterio es el que primo para determinar la DE₅₀ de los compuestos que figuran a continuación.

Descripción

La determinación cuantitativa de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica, implicó que se determinara inicialmente los tiempos de efecto máximo de los compuestos en estudio (TEM). De acuerdo a las etapas del programa ADD, cada compuesto debe ensayarse a distintos tiempos frente a los ensayos de MES, PTZ y Rotorod; a fin de determinar el momento de mayor actividad y neurotoxicidad. Generalmente los TEM son coincidentes, es decir que los picos de máxima acción anticonvulsiva y neurotóxica se alcanzan simultáneamente. El TEM en el ensayo MES se determinó mediante la evaluación de cada compuesto a diferentes tiempos, graficando la respuesta en función del mismo. Se emplearon al menos 4 animales por tiempo. Una vez graficado, se determinó el TEM por inspección visual. Definido este, se procedió a la determinación de la DE₅₀. Se emplearon grupos de aproximadamente 6 ratones por dosis. Las dosis se calcularon de modo de tener al menos 4 puntos comprendidos entre ausencia de protección y protección total.

Los resultados se analizaron mediante el método estadístico de Litchfield y Wilcoxon.¹⁶

Este procedimiento es el más utilizado debido a su alta capacidad de respuesta en experimentos biológicos de tipo dosis-efecto. Los datos experimentales se cuantifican como % de protección, que es la relación porcentual entre el número de animales que son protegidos respecto al número de animales totales:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{\text{número de animales protegidos}}{\text{número total de animales}} \cdot 100$$

Estos valores se convierten en probits y se grafican en función del logaritmo de la dosis. Se elige la recta más adecuada y se interpola a probit 5, que es el valor de la DE₅₀. El peso estadístico de la función propuesta se evalúa en base a los valores esperados y observados, obteniendo un valor de (Chi)² para la recta. Se considera que los datos no son significativamente heterogéneos si la suma de los valores de (Chi)² para cada dosis no sobrepasa un límite que depende de los grados de libertad del sistema.

Se define, además, una función pendiente (S). Esta incluye las concentraciones que predice la recta a fin obtener un % actividad de 16%, de 50% y de 84% (DE₁₆, DE₅₀ y DE₈₄ respectivamente):

$$S = \frac{1 \cdot (DE_{84}/DE_{50} + DE_{50}/DE_{16})}{2}$$

Para el cálculo del intervalo de confianza de la DE₅₀ debe tenerse en cuenta el valor obtenido para S, el número de dosis y la cantidad de animales testeados involucrados en los puntos que caen dentro de los valores esperados de probit entre 4 y 6. También puede calcularse un intervalo de confianza para S, el cual depende de los parámetros anteriores así como de la relación entre la dosis más alta y la más baja usadas. Detalles estadísticos y la deducción completa de las fórmulas usadas en este método pueden encontrarse en literatura.¹⁶

Los compuestos elegidos no resultaron activos frente a PTZ a las dosis ensayadas, en acuerdo con lo observado en fase 1, en un todo de acuerdo con las consideraciones inicialmente planteadas y con la hipótesis de diseño de los compuestos, que debían ser activos frente al ensayo MES, por lo que no se continuó en fases posteriores con este ensayo.

A continuación se detallan los cálculos realizados para cada compuesto. Para ello se muestran las curvas que determinaron los TEM y los porcentajes de protección que se utilizaron. Los valores de DE₅₀ se expresan en micromoles por kilo de ratón (μmol/kg), a fin de facilitar las comparaciones.

Capítulo 6

(±)-3,4,5,6-tetra-O-(2-propilpentanoil)-sulfato cíclico de myo-inositol. (12)

Se realizó la curva para la determinación del tiempo de efecto máximo (figura 6.9) utilizando una dosis de 30 mg/Kg para la evaluación, con 4 ratones para cada tiempo. TEM encontrado: **4 hs.** (tabla 6.4)

Determinación del TEM, ensayo MES, i.p.			
Dosis (mg/Kg)	Tiempo (hs)	N° de protección/N° total	% protección
30	0.5	2/4	50
30	1	2/4	50
30	2	3/4	75
30	4	4/4	100
30	6	3/4	75
30	8	3/4	75

Tabla 6.4. Determinación del tiempo efecto máximo a una dosis de 30 mg/Kg del compuesto 12.

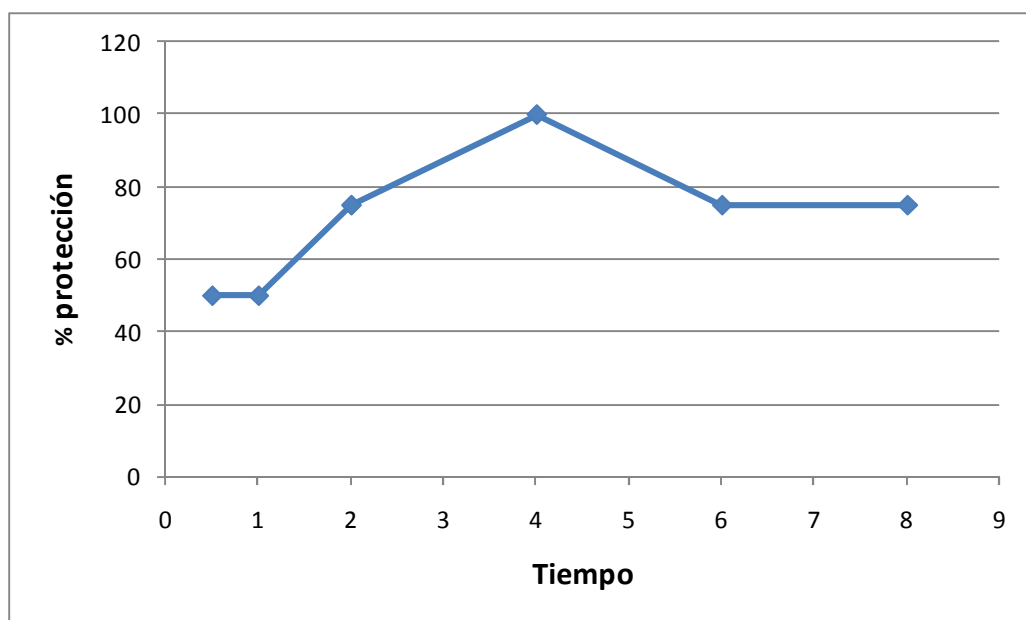


Figura 6.9. Tiempo de Efecto Máximo del compuesto 12.

La potencia anticonvulsiva se cuantificó entonces a 4 hs frente al ensayo MES, midiendo el porcentaje de protección a 5 dosis distintas (tabla 6.5).

Dosis [mg/Kg]	Tiempo [hs]	Animales protegidos /totales	% protección
3	4	2/6	33.3
5	4	4/10	40
8	4	3/6	50
10	4	5/10	50
30	4	5/6	83.3

Tabla 6.5. Resultado de la actividad anticonvulsiva del (\pm)-3,4,5,6-tetra-O-(2propil pentanoil)-sulfato cíclico de myo-inositol en el ensayo MES.

Con estos valores se realizó el análisis estadístico de los datos, obteniéndose una **ED₅₀ = 9.95 μ mol/kg**. Esta dosis efectiva media es equivalente a **7.42 mg/Kg**.

(\pm)-3,4,5,6-tetra-O-acetil-sulfato cíclico de myo-inositol. (15)

Se realizó la curva para la determinación del tiempo de efecto máximo (figura 6.10) utilizando una dosis de 30 mg/Kg para la evaluación, con 4 ratones para cada tiempo. TEM encontrado: **4 hs**. (tabla 6.6)

Determinación del TEM, ensayo MES, i.p.			
Dosis (mg/Kg)	Tiempo (hs)	Nº de protección/Nº total	% protección
100	0.5	0/4	0
100	1	1/4	25
100	2	1/4	25
100	4	3/4	75
100	6	2/4	50

Tabla 6.6. Determinación del tiempo efecto máximo a una dosis de 100 mg/Kg del compuesto 15.

Capítulo 6

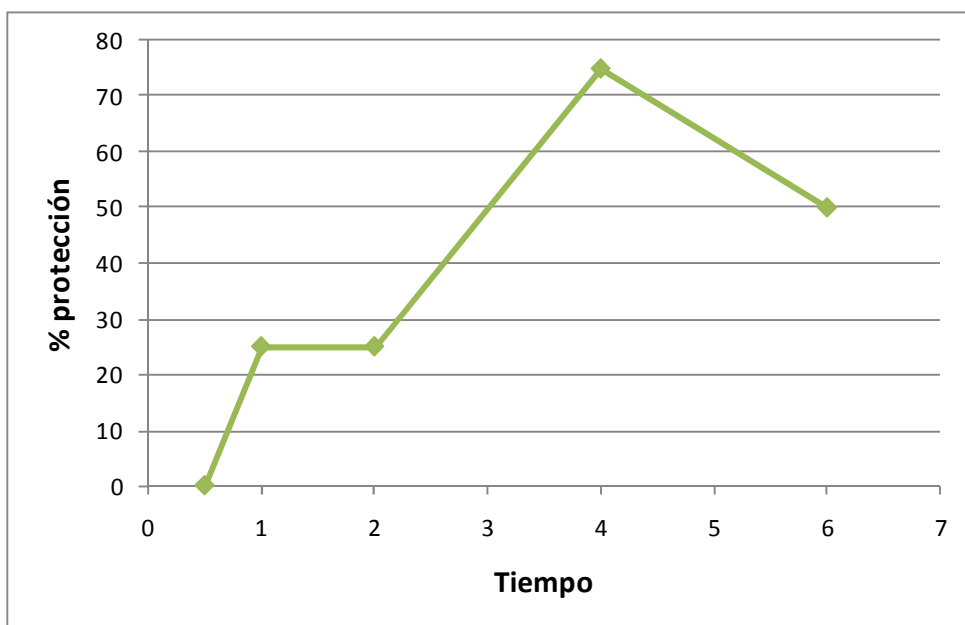


Figura 6.10. Tiempo de Efecto Máximo del compuesto 15.

La potencia anticonvulsiva se cuantificó entonces a 4 hs frente al ensayo MES, midiendo el porcentaje de protección a 4 dosis distintas (tabla 6.7).

Dosis [mg/Kg]	Tiempo [hs]	Animales protegidos /totales	% protección
20	4	2/6	33.3
50	4	4/6	66.7
120	4	3/4	75
150	4	4/6	66.7

Tabla 6.7. Resultado de la actividad anticonvulsiva del (\pm)-3,4,5,6-tetra-O-acetil-sulfato cíclico de myo-inositol en el ensayo MES.

Con estos valores se realizó el análisis estadístico de los datos, obteniéndose una **ED₅₀ = 211 μ mol/kg**. Esta dosis efectiva media es equivalente a **86.6 mg/Kg**.

En la siguiente tabla 6.8 se muestran los resultados obtenidos, comparando con los datos del Ácido Valproico y otros fármacos antiepilépticos obtenidos en el ensayo MES.¹⁷

Ensayo MES	TEM Horas	DE ₅₀	
		μmol/Kg	mg/Kg
12	4	9.95	7.42
15	4	211	86.6
VPA	0.25	1088	272.0
Fenitoína	2	37.7	9.5
Fenobarbital	1	101	21.8
Carbamazepina	0.25	37.4	8.81
Clonazepam	0.5	294	92.7

Tabla 6.8 DE₅₀ de los sulfatos cíclicos sintetizados y de fármacos antiepilépticos de uso en clínica.

En la Tabla 6.9 se muestran las DE₅₀ determinadas en el ensayo MES de los sulfatos cíclicos 12 y 15 en comparación con sus intermediarios derivados del *myo*-inositol tetra esterificados con Ácido Valproico. Se puede observar para la serie de derivados con ácido valproico el incremento de actividad con el cambio del grupo acetónico por el sulfato cíclico.

Capítulo 6

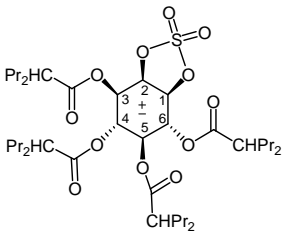
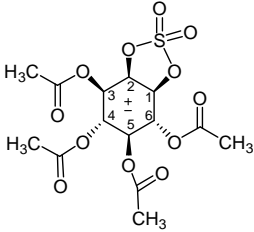
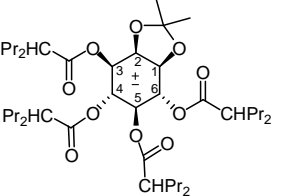
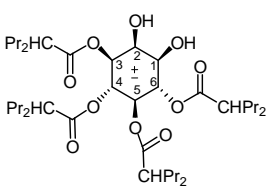
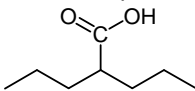
Compuesto	Peso Molecular	DE ₅₀ (MES)		TEM	DE ₅₀ (PTZ)	
		mg/kg	μmol/kg	MES	mg/kg	μmol/kg
<p>12</p> 	746	7,42	9,95	4 hs	I	I
<p>15</p> 	410	86,6	211	4hs	ND	ND
<p>3</p> 	724	29,5	40,8	30 min	I	I
<p>7</p> 	684	77,4	113,1	2 hs	I	I
<p>Ácido Valproico</p> 	144	272	1088	15 min	-	-

Tabla 6.9. DE₅₀ de los derivados tetraesterificados. Los datos de DE₅₀ de los compuestos 3 y 7 se tomaron de Moon, S.C.¹⁸

Referencias Capítulo 6

1. Putnam, T.J.; Merritt, H.H., *Science*, **1937**, 85, 525-526.
2. Goodman, L.S.; Swinyard, E.A.; Toman, J.E., *Proc. Am. Fed. Clin. Res*, **1945**, 2, 100-101.
3. Krall, L.R.; Penry, J.K.; White, B.G.; Kupferberg, H.J.; Swinyard, E.A., *Epilepsia*, **1978**, 19, 409-428.
4. Brown, W.C.; Schiffman, D.O.; Swinyard, E.A.; Goodman, L.S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1953**, 107, 273-283.
5. Jenney, E.H.; Pfeiffer, C.C., *Ann NY Acad Sci*, **1956**, 64, 679-689.
6. Rogawski, M.A., *Epilepsy Res.*, **2006**, 68, 22-28.
7. Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson, T., *Epilepsy Research*, **2004**, 61, 1-48.
8. White, H.S., *Epilepsia*, **2003**, 44 (Suppl.7):2-8.
9. Porter, R.J.; Cereghino, J.J.; Gladding, G.D.; Hessie, B.J.; Kupferberg, H.J.; Scoville, B.; White, B.G.; Antiepileptic Drug Development Program., *Cleve. Clin. Q.*, **1984**, 51, 293-305.
10. Malawska, B.; Kulig, K.; Spiewak, A.; Stables, J.P., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 625-63.
11. Bartsch, W.; Sponer, G.; Dietmann, K.; Fuchs, G., *Arzneim-Forsch.*, **1976**, 26, 1581-1583.
12. Woodbury, L.A.; Davenport V.D., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **1952**, 92, 97-107.
13. Fisher, R.S., *Brain Research Reviews*, **1989**, 14, 245-278.
14. Stables, J.P.; Kupferberg, H.J., Chapter 16: The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project. En *Molecular and cellular targets for antiepileptic drugs*; Avanzani, G.; Regesta, G.; Tanganelli, P.; Avoli, M., John Libbey & Company Ltd, **1997**, 191-198.
15. Dunham, N.W.; Miya, T.S., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **1957**, 46, 208-209.
16. Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **1949**, 96, 99.
17. Krall, L.R.; Penry, J.K.; White, B.G.; Kupferberg, H.J.; Swinyard, E.A., *Epilepsia*, **1978**, 19, 409-428.
18. Moon, S.C.; Síntesis de nuevos compuestos anticonvulsivos Amidas y Ésteres del Ácido Valproico, Tesis Doctoral, 2006.

Conclusiones

En todo proyecto de investigación exitoso y original, más que valorarse por los resultados obtenidos, debe tomarse en cuenta las nuevas propuestas que ha generado a partir de sus resultados, las que serán nuevas puertas del conocimiento que tendrán que ser abiertas por los que continúen la temática.

El presente trabajo de tesis abordó el desafío, de lograr nuevas estructuras que manifestaran actividad anticonvulsiva. Para ello se hizo uso de metodologías racionales, características de Química Medicinal, orientándose al diseño de nuevos profármacos del ácido valproico.

Se recurrió para ello a la búsqueda de un grupo modulador, fisiológico, seleccionando al *myo*-inositol dado que cumple, como se vio en las respuestas biológicas, con el objetivo de lograr una liberación específica. Debe destacarse que la incorporación original del grupo sulfato, con el propósito de verificar si contribuye a una localización selectiva en el SNC, y por ende en el sitio de acción del profármaco de VPA y *myo*-inositol, fue exitosa.

El mayor peso de este trabajo se centró en la síntesis química, debido a las complejas características estructurales que presenta el *myo*-inositol, como es la de poseer seis grupos hidroxilos factibles de funcionalización, lo que implica buscar caminos sintéticos donde el uso de protecciones y desprotecciones selectivas conduzcan a las moléculas objetivo. Este tema implicó que durante el desarrollo de este trabajo se adquirió experiencia sobre las reacciones de protección y desprotección regioselectivas del *myo*-inositol, experiencia en reacciones de esterificación de ésteres tanto simples como complejos. A partir de estos derivados se desarrolla la síntesis de los sulfitos y sulfatos cíclicos en dos etapas. Estos 5 derivados finales son compuestos novedosos no reportados en literatura, que llevaron un esfuerzo sintético para dirigir las sustituciones adecuadas.

La evaluación de la actividad anticonvulsiva de las estructuras sintetizadas, se realizó de acuerdo a Fase I y Fase II del Program of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, NIH-USA. Debe destacarse, que se logró obtener estructuras noveles, que se destacan por su marcada actividad anticonvulsiva, superando significativamente la actividad de los valproatos de *myo*-inositol, compuestos sintetizados con anterioridad en la Cátedra de Química Medicinal, los cuales mostraron una actividad promisoriosa. Su desarrollo se asocia al logro de nuevos fármacos de posible uso clínico, que presenten una actividad farmacológica potenciada y simultánea disminución de efectos adversos.

Los sulfatos cíclicos mostraron actividad al ensayo MES y fueron inactivos frente a PTZ. Este perfil farmacológico se encuentra en drogas de uso clínico, como la fenitoína cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de canales de sodio por lo que, en principio, se podría sugerir que estos actuarían por el mismo mecanismo. Su perfil de actividad los clasifica en categoría 1, la categoría más activa, la dosis efectiva media de los compuestos 12 y 15 demostraron ser varios órdenes superior a la de VPA obtenida en el mismo ensayo.

La falta de actividad de los derivados acetilados sin sulfato cíclico (compuesto 10) y la importante actividad de los derivados acetilados con sulfato cíclico (compuestos 15 y 16) nos sugiere que el *myo*-inositol y/o el sulfato cíclico poseen actividad por sí mismos.

El compuesto 12, el más activo mostró una DE 50 de 7,42 mg/ Kg, siendo éste 40 veces más activo que el Ácido Valproico, uno de los antiepilépticos más utilizados en clínica hoy en día.

Todo lo hecho en este trabajo señala al grupo sulfato cíclico como una función deseable para favorecer la localización de fármacos en el SNC.

Las propiedades farmacológicas encontradas en la molécula del *myo*-inositol y su sulfato permitirán, en futuros trabajos, verificar y profundizar su conocimiento en la utilización de profármacos de uso en el SNC. Como se manifestó anteriormente, el trabajar en el tema de profármacos permite disponer de una herramienta muy útil para el desarrollo de nuevos fármacos para nuestro país y la región. Dicha propuesta puede plantearse como una ventaja en la investigación cuando se parte de un fármaco de uso clínico. La manifestación de una mayor actividad anticonvulsiva de los derivados sulfato cíclico del *myo*-inositol con respecto al VPA en el ensayo MES (*i.p.*) llegando a su máxima expresión en el caso del compuesto **12** con una potencia relativa de 40 han motivado el interés de un laboratorio privado concretándose en la firma de un convenio de *transferencia de tecnología* entre nuestra Universidad y dicho Laboratorio.

