

COMPUESTO FENÓLICO Y COMBINACIÓN DEL MISMO CON UNA BENZODIAZEPINA FUSIONADA A 1,4-DIHIDROPIRIDINA PARA EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y VASCULAR.

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se relaciona con la Química, la Farmacéutica y en particular con la obtención de formulaciones a partir de derivados compuestos fenólicos o polifenólicos y a partir de derivados de compuestos fenólicos o polifenólicos combinados con sistemas tricíclicos del tipo benzodiazepinas fusionadas a derivados de 1,4-dihidropiridinas con acción sobre el Sistema Nervioso Central y Vascular.

En el caso de las enfermedades de origen multifactorial como son las cardiovasculares, cerebrovasculares, neurodegenerativas, neuropsiquiátricas y neurológicas, una sola medicación no es suficiente para tratarlas efectivamente, por lo que debe usarse una terapia de múltiple medicación. Existen dos razones fundamentales que explican la ausencia de medicamentos para el tratamiento de estas enfermedades: 1) fármacos dirigidos a un solo mecanismo patológico y 2) empleo de dosis elevadas que aumenta el riesgo de las reacciones adversas.

La neurodegeneración es un tema común de muchas enfermedades del sistema nervioso y de desórdenes como las demencias, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad del Parkinson (EP). Estas enfermedades son devastadoras y su manejo es caro, mientras que los tratamientos actuales son inadecuados. A la urgencia de este problema se le adiciona el hecho de que la incidencia de estas enfermedades relacionadas con la edad se está incrementando rápidamente debido a los cambios demográficos que están ocurriendo.

El progresivo envejecimiento de la población mundial trae consigo la indeseada consecuencia de un aumento de las enfermedades neurodegenerativas y demencias seniles.

La EP es una enfermedad neurodegenerativa, con síntomas de disfunción motora: movimientos lentos, rigidez, temblor en reposo y alteraciones en el equilibrio. Con el avance de la enfermedad, muchos pacientes desarrollan síntomas no motores, incluyendo ansiedad, depresión, constipación y demencia.

Estas características son atribuidas a una gran reducción en el contenido estriatal de dopamina y a una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (Gauthier, 1982).

Los signos clínicos de la EP aparecen luego de que la muerte neuronal dopaminérgica excede un umbral del 70-80% y a una pérdida de terminaciones nerviosas del estriado que excede 50-60% (Agid, 1991).

Investigaciones de los mecanismos de desarrollo de la EP han indicado que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta está relacionada al déficit en el complejo-I mitocondrial (Jenner 1998).

Aunque hay fármacos que alivian los síntomas del Parkinson, el uso crónico de estos fármacos no es efectivo en prevenir la progresión de la EP y ha sido asociado con efectos secundarios

debilitantes. Por lo tanto resulta de gran interés desarrollar terapias neuroprotectoras que retrasen o incluso detengan la progresión degenerativa.

A nivel mundial se estima que 46.8 millones de personas viven con demencia. Este número se estima que se incremente casi al doble cada 20 años; a 74.7 millones en el 2030 y 131.5 millones para el 2050. La demencia además tiene un enorme impacto económico. Hoy, el costo estimado total mundial de la demencia es de 818 billones de USD, y será una enfermedad de un trillón de dólares para el 2018; con un enorme impacto en la calidad de vida tanto de los pacientes como de sus familiares y cuidadores (Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2015. London: Alzheimer's Disease International; 2015)

De todas ellas, la EA es la más prevalente con cerca de 35 millones de personas sufriendo de la enfermedad y se estima que su incidencia se incremente significativamente en las próximas tres décadas, a la par del incremento en la edad promedio de la población (Reitz, C.; Brayne, C.; Mayeux, R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.*, **2011**, 7, 137-152) (Reitz, C.; Mayeux, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem. Pharmacol.*, **2014**, 88, 640-651).

La EA, es un desorden neurodegenerativo del cerebro que conduce a la pérdida de la memoria y funciones cognitivas que progresa lentamente; a menudo acompañado de alteraciones de comportamiento tales como agresión y depresión (Querfurth, H.W.; LaFerla, F.M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, **2010**, 362, 329-344). En su última etapa deja al paciente en cama, incontinente y dependiente de cuidado y custodia, lo que resulta muy costoso para los familiares. La muerte ocurre, como promedio, 9 años tras el diagnóstico (Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5(9): 677-85). El amplio número de personas padeciendo esta enfermedad y que requieren constante cuidado y otros servicios afectarán severamente los recursos médicos, monetarios y humanos (Suh Y.H. and Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-15 synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 54(3): 469-525). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-15 synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 54(3): 469-525) De modo, que constituye una preocupación médica creciente.

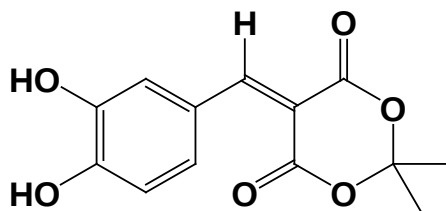
La isquemia cerebral es una de las principales causas de muerte y la primera de discapacidad en adultos en muchos países (Mukherjee, D., Patil, C.G., 2011. Epidemiology and the global burden of stroke. *World Neurosurg.* 76, S85–S90) Actualmente solo el activador de tejido del plasminógeno es el fármaco que se encuentra aprobado para su uso en la terapia de humanos durante la fase aguda de la isquemia cerebral (Howells, D.W., Donnan, G.A., 2010. Where will the next generation of stroke treatments come from? *PLoS Med.* 7, e1000224). A pesar de los resultados esperanzadores preclínicos obtenidos, ninguno de los candidatos evaluados ha mostrado mejoras clínicas consistentes. Esto puede deberse a la multiplicidad de mecanismos involucrados en la cascada de daño neuronal tras la isquemia cerebral, lo cual contrasta con la visión más simplista de los

neuroprotectores propuestos (Minnerup, J., Schäbitz, W-R., 2009. Multifunctional actions of approved and candidate stroke drugs. *Neurotherapeutics* 6,43–52). Las evidencias precínicas acumuladas indican que un ligando altamente selectivo para una diana biológica determinada no siempre resulta en un fármaco clínicamente eficaz, particularmente en aquellas patologías que involucran múltiples factores, tales como la isquemia cerebral. Por lo tanto, los fármacos que actúan en un solo sitio en la cascada isquémica, tales como los bloqueadores de Ca²⁺, los antagonistas de glutamato, los agonistas GABA, los antioxidantes / secuestradores de radicales libres, los precursores de fosfolípidos, y los agentes antiinflamatorios generalmente han fallado en ser efectivos clínicamente (Ginsberg, M.D., 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55, 363–389)

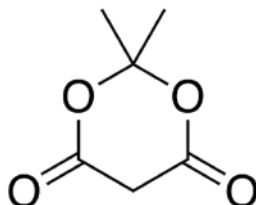
Los enfoques neuroprotectores emergentes han comenzado a considerar la disfunción bioenergética mitocondrial. Existen evidencias que sugieren que la mitocondria juega un papel clave en el daño neuronal isquémico por la activación de señales nocivas ya sea por el daño en su estructural y función o por la amplificación de la cascada, lo que eventualmente conduce a la muerte celular (Christophe, M., Nicolas, S. ,2006. Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr.Pharm.Des.*12,739–757) (Mazzeo, A.T., Beat, A., Singh,A., Bullock,M.R., 2009. The role of mitochondrial transition pore and its modulation intraumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. *Exp.Neurol.*218,363–370) (Perez-Pinzon, M.A., Stetler, R.A., Fiskum,G., 2012. Novel mitochondrial targets for neuroprotection. *J. Cereb.BloodFlow.Metab.*32,1362–1376). Por lo tanto existe un creciente interés en la identificación de nuevas clase de compuestos que actúan simultáneamente sobre ciertos procesos tóxicos en las neuronas isquémicas, incluyendo que actúan a nivel mitocondrial.

Breve descripción de la invención

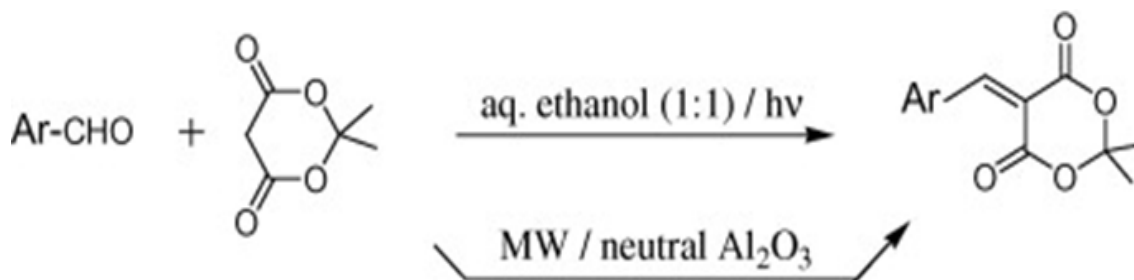
Los derivados fenólicos o polifenólicos han sido ampliamente reportados en la literatura para ser empleados en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, sin embargo, su alta hidrosolubilidad (dado fundamentalmente por los grupos hidroxilos), hacen que estos compuestos tengan dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica y acceder al cerebro. Los autores de la presente invención han obtenido el producto (5-[(3,4-dihydroxyphenyl) methylidene]-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione) o KM 34:



El ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) y sus derivados han sido utilizados intensamente como materiales de partida para la síntesis de muchos heterociclos, en especial, para evaluar su potencial actividad biológica.

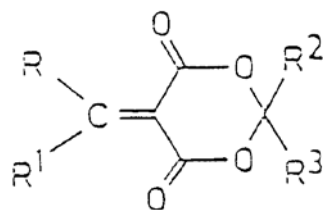


La condensación del ácido de Meldrum con aldehídos aromáticos se ha desarrollado en una solución etanol-agua con la presencia de catalizador mediante un procedimiento fotoquímico altamente eficiente con el medio ambiente (A novel light induced Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with aromatic aldehydes in aqueous ethanol. Somnath Ghosh, , Jhantu Das, Subhagata Chattopadhyay. Tetrahedron Letters. Volume 52, Issue 22, 1 June 2011, Pages 2869–2872).

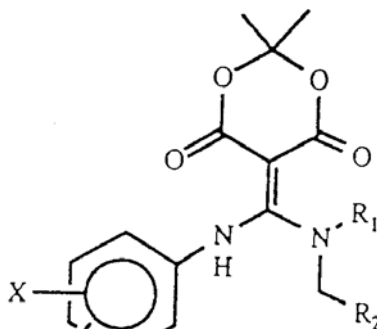


Estos derivados muestran actividad antimicrobiana. Otra serie de análogos de ariliden del ácido de Meldrum (Sandhu HS and all (2010) Synthesis and biological evaluation of arylidene analogues of Meldrum's acid as a new class of antimalarial and antioxidant agents. Bioorg Med Chem. 2010 Aug 1;18(15):5626-33) fueron evaluados *in vitro* mostrando actividades antimaláricas y antioxidantes, así como inhibidores de la agregación de plaquetas (Abdelaziz El Maatougui, JhonnyAzuaje, Alberto Coelho, Ernesto Cano, Matilde Yanez, Carmen Lopez, Vicente Yaziji, Carlos Carbajales and Eddy Sotelo. Discovery and Preliminary SAR of 5-Arylidene-2,2-Dimethyl-1,3-Dioxane- 4,6-Diones as Platelet Aggregation Inhibitors Pages 551-554 (4))

Varias son las patentes que protegen este tipo de compuestos, así como su empleo con propiedades terapéuticas. La patente ES2074770 muestra el procedimiento de preparación de derivados de 1,3-dioxano-4,6-diona



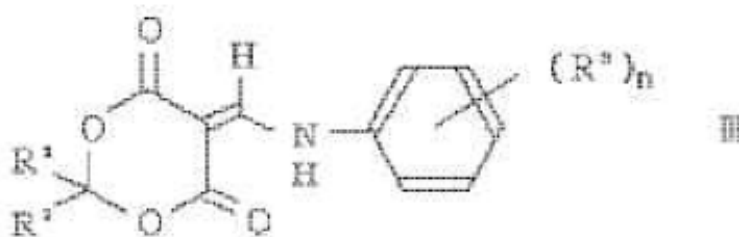
A su vez en la patente ES2077985 se muestran inhibidores de acil-CoA: colesterol-acil transferasa, a base de 5-bis-aminometilen-1,3-dioxano-4,6-diona N,N',N'-trisubstituida de fórmula:



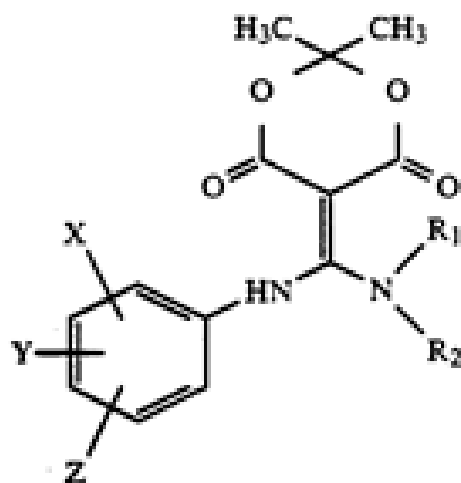
1

Esta invención se refiere a compuestos químicos que manifiestan un poder inhibitorio sobre la Coenzima A : Colesterol Aciltransferasa (ACAT). Compuestos de este tipo ayudan a reducir la absorción de colesterol y por tanto tienen efecto sobre la aterosclerosis.

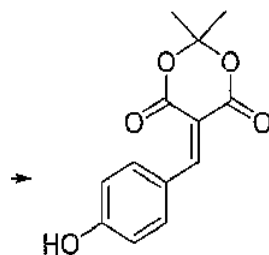
En la patente JPH11180975 se describe el compuesto de fórmula III, 2,2-dimetil-5-(4 metoxycarbonilmetiloxifenil aminometileno)-1,3-dioxano-4,6-diona, que tiene una excelente capacidad de absorción ultravioleta, propiedades sobre el agrietamiento de la piel y baja capacidad de absorción percutánea.



Por su parte, la patente US5281714 protege derivados 5-[(3,5-di-tertbutil-4-hidroxi-fenilamino)-(metil-piridin-4-ilamino)-metilen]-2,2-dimetil-[1, 3] dioxan-4,6-diona.



En la patente WO200586661 se protege un compuesto, una composición farmacéutica y el método de uso para el tratamiento de desórdenes metabólicos. En este caso se propone la obtención de un producto que manifiesta marcada actividad para el tratamiento de la diabetes tipo II, en cuyo procedimiento se obtiene el intermediario de fórmula general:



Existe una patente en la literatura que se refiere a sistemas tricíclicos del tipo benzodiazepinas fusionadas a derivados de 1,4-dihidropiridinas con acción sobre el Sistema Nervioso Central y Vascular (CU2009/000172), pero esta invención no comprende la combinación de esos derivados tricíclicos con derivados fenólicos o polifenólicos, que permitirían combinar acciones GABAérgica, antiglutamatergica, moduladora de los canales de calcio, mitoprotectora, antioxidante (secuestradora de radicales libres y quelante de hierro), antiinflamatoria, y antiapoptotica; que avalarían su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, neurodegenerativas, neuropsiquiátricas y neurológicas, así como el empleo de dosis menores y por lo tanto de menores efecto colaterales.

Como aspecto adicional a la presente invención, el compuesto fenólico KM34 en forma libre o en forma de sus sales, hidratos, formas cristalinas, metabolitos, profármacos: así como la combinación de estos con un sistema tricíclico del tipo benzodiazepina fusionada a derivado de 1,4-dihidropiridina: JM-20, podrán funcionar como el o los principios activos de diferentes formulaciones.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Porcentaje de reducción del radical DPPH por el KM-34.

Figura 2. Actividad del KM-34 como secuestrador de radicales $O_2^{\cdot -}$

Figura 3. Efecto del KM-34 en el daño oxidativo inducido por Desoxiribosa (DR).

Figura 4. Máximos de absorción del KM-34 en presencia de $FeCl_2$

Figura 5. Efectos del KM-34 en la peroxidación lipídica espontánea e inducida.

Figura 6. Efecto citoprotector del KM-34 frente al daño inducido por L-glutamato en cultivos de células PC12.

Figura 7. Efecto citoprotector del KM-34 frente al daño inducido por H_2O_2 en cultivos de células PC12.

Figura 8. Efecto citoprotector del KM-34 frente al daño inducido por $FeSO_4$ y ácido ascórbico en cultivos de células PC12.

Figura 9. Efecto del KM-34 sobre la asimetría inducida por 6-OHDA.

Figura 10. Efecto del KM-34 sobre la exploración vertical inducida por 6-OHDA.

Figura 11. Efecto del KM-34 sobre la memoria espacial (laberinto en T).

Figura 12. Efecto del KM-34 sobre la memoria de reconocimiento de objetos nuevos.

Figura 13. Efecto del KM-34 sobre la isquemia cerebral inducida por oclusión de la arteria cerebral media en ratas.

Figura 14. Efecto citoprotector de la combinación de JM-20 + KM-34 frente al daño inducido por glutamato en células PC12.

Figura 15. Efecto citoprotector de la combinación de JM-20 + KM-34 frente al daño inducido por H_2O_2 en células PC12.

Figura 16. Efecto del JM-20, KM-34 y su combinación, sobre la asimetría inducida por termocoagulación de las arterias corticales.

Descripción detallada de la invención

El o los principios activos podrán ser administrados mezclados con al menos un agente coadyuvante, diluyente y/o un acarreador, químicamente inerte, no tóxicos, en lo adelante reconocidos como excipientes, incluidos en las composiciones farmacéuticas que se proponen.

Las composiciones farmacéuticas contemplan cualquier composición líquida, sólida o semisólida, pueden ser administrados por vía oral, bucofaríngea, sublingual, parenteral por ejemplo: intramuscular, intravenosa, intradérmica o subcutánea, tópica, transdérmica, traqueal, bronquial, nasal, pulmonar, rectal u otras vías de administración adecuadas.

Las composiciones farmacéuticas descritas comprenderán los excipientes adecuados para cada formulación. Las formulaciones se preparan de forma convencional por métodos recogidos en el

estado del arte. Los excipientes se seleccionan en función de la forma farmacéutica de elección de acuerdo a la vía de administración.

El o los principios activos para su administración a humanos pueden estar contenidos en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, entre las que se incluyen, sin limitarse a estas formas de presentación: tabletas (incluyendo sublinguales, revestidas y masticables), cápsulas duras y blandas (incluyendo microcápsulas, nanopartículas y pellets), soluciones (gotas orales, jarabes), soluciones parenterales, parches transdérmicos, implantes y otros sistemas retard, ungüentos (cremas y geles), spray nasales, mucoadhesivos, supositorios, suspensiones, polvos para reconstitución o para la adición en los alimentos, entre otras formas de dosificación comprendidas en esta invención.

Empleando procesos tecnológicos conocidos en el estado de la técnica, el o los principios activos se pueden formular en formas de dosificación adecuadas para su administración, mezclándolos con excipientes, tales como: sustancias auxiliares líquidas, sólidas o semisólidas, compuestos de naturaleza orgánica e inorgánica, de origen natural o sintético. Entre los que están comprendidos: sólidos de relleno, diluyentes, aglutinantes, solventes, emulsionantes, lubricantes, desintegrantes, deslizantes, saborizantes, colorantes, pigmentos, polímeros, edulcorantes, plastificantes, potenciadores de la absorción, potenciadores de penetración, surfactantes, co-surfactantes, aceites especializados y/o sistemas buffer, que le proporcionan a los compuestos activos o sus sales fisiológicamente aceptables estabilidad física, química y/o biológica.

Algunos excipientes empleados en la formulación de las formas de dosificación que contienen el o los principios activos, sin limitarse al empleo de otras sustancias auxiliares son: almidones, lactosas, celulosa y sus derivados, sacarosa, sorbitol, manitol y otros azúcares, talco, dióxido de silicio coloidal, carbonatos, óxidos de magnesio, fosfatos de calcio, dióxido de titanio, polivinilpirrolidona, povidonas, gelatina, lacto-proteínas, citratos, tartratos, alginatos, dextrana, etilcelulosa, ciclodextrinas, elastómeros de silicona, polisorbato, amilopectina, parabenos, aceites animales y vegetales, propilenglicol, agua estéril, alcoholes mono o polihidroxílicos como glicerol, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearil fumarato de sodio, lauril sulfato de sodio, glicerina y ceras de polietilenglicol, entre otros.

Las formas de dosificación oral sólidas, como tabletas, microgránulos, nanopartículas, pellets, polvos para reconstitución o cápsulas, que contienen el o los principios activos, según la presente invención, pueden ser de liberación inmediata o de liberación modificada.

Una forma farmacéutica de elección, según la presente invención, son las tabletas, conteniendo como ingrediente farmacéutico activo el o los principios activos, se prepara una mezcla con celulosa microcristalina, almidón de maíz, crospovidona, se adiciona una disolución de polivinilpirrolidona y lauril sulfato de sodio para formar un granulado, este se seca a proceso completo en lecho fluidizado y se mezcla con estearato de magnesio y talco, posteriormente se elaboran las tabletas utilizando un sistema de punzones rotatorios para su fabricación, finalmente las tabletas son revestidas con una suspensión de hidroxipropilmetilcelulosa, polietilenglicol 4000, dióxido de titanio y colorante.

Mediante el revestimiento de las tabletas se logra elegancia de la forma terminada y se evita el sabor desagradable, esto se logra con un agente de enmascaramiento de sabor, tal como un copolímero de ácido metilacrílico, etilcelulosas, metilhidroxipropilcelulosa u otros polímeros. Las tabletas pueden obtenerse tanto por el método de granulación húmeda antes expuesto, como por el método de compresión directa empleando excipientes para compresión directa y disminuyendo pasos en la etapa de obtención de las tabletas, siempre que se trabaje con bajas dosis.

Las tabletas pueden ser de liberación modificada y pueden contener el o los principios activos en microgránulos, nanopartículas o sistemas matriciales, empleando excipientes como: óxido de polietileno, hidroxipropilmetilcelulosa 2910, estearato de magnesio, cloruro sódico, óxido férrico rojo, acetato de celulosa, polietilenglicol 3350 y opadry.

Las composiciones farmacéuticas, según la presente invención, pueden contener polímeros farmacéuticamente aceptables, permeables, biodegradables e insolubles en agua, para controlar su perfil de liberación, por lo que se pueden obtener formas de dosificación de liberación modificada (inmediata, retardada o controlada). Estos polímeros pueden emplearse en el recubrimiento de tabletas, microgránulos, cápsulas, en la obtención de nanopartículas, como matrices de liberación en pellets, tabletas, gránulos o mezclados con los demás excipientes comprendidos en cualquier otra forma de dosificación mencionada en la presente invención.

Para la administración oral, otras composiciones farmacéuticas adecuadas son las cápsulas duras, cápsulas blandas y polvos farmacéuticos, el o los principios activos fisiológicamente aceptables, pueden ser dosificados en forma de cápsulas duras de gelatina o celulosa por ejemplo, conteniendo en su interior una mezcla del ingrediente farmacéutico activo con excipientes de uso común en formas sólidas como los descritos para las tabletas, dicha mezcla puede ser obtenida por vía seca, granulación húmeda, extrusión, pelletización, microencapsulación, o por dosificación de microtabs. Para la dosificación en cápsulas de gelatina blanda se emplearan los métodos convencionales de elaboración y pueden ser preparadas mezclando el o los principios activos con aceites vegetales, grasas u otros vehículos similares adecuados para su formulación.

En el caso de los polvos farmacéuticos estos podrán elaborarse por simple mezcla de los principios activos fisiológicamente aceptables con, rellenos, agentes suspensores, edulcorantes, saborizantes y preservos. Aunque en la presente invención también se empleó en la elaboración de los polvos la metodología de secado por atomización a una temperatura de entrada entre 100 °C - 150 °C y una temperatura de salida entre 50 °C - 90 °C, empleando excipientes como dextrana, polietilenglicol 4000 y sodio lauril sulfato, entre otros, para mejorar la solubilidad del ingrediente farmacéutico activo en función de su adecuada incorporación al organismo en soluciones, o adicionándolo a alimentos como jugos.

Para la administración rectal, el o los principios activos fisiológicamente aceptables, pueden ser dosificados en forma de supositorios, espumas o solución rectal en microenemas, que pueden contener una mezcla de los compuestos activos con una base de grasa neutra sólida (Witepsol 45) u otro vehículo similar adecuado para su formulación, también se pueden emplear monooleato de

sorbitan, polisorbato 20, cera emulsificante, sílice coloidal anhidra, metabisulfito de sodio, edetato disódico, parahidroxibenzoato de metilo, fosfatos de sodio, macrogol 300, glicerina, agua, propano, isobutano y n-butano.

Para la administración oral líquida, el o los principios activos fisiológicamente aceptables se pueden formular en forma de jarabes, elixires, gotas concentradas o suspensiones, contando con un vehículo farmacéuticamente aceptable como una mezcla de etanol, agua, glicerol, propilenglicol y/o polietilenglicol, entre otros, carboximetilcelulosa u otros agentes espesantes, pueden contener colorantes, saborizantes, edulcorantes (sucralosa, aspartamo, ciclamato, stevia), conservadores (parabenos, benzoatos). Estas formas de dosificación líquidas se pueden preparar a partir de la reconstitución de composiciones farmacéuticas en polvo con un disolvente adecuado antes de su uso.

Para la administración parenteral, el o los principios activos fisiológicamente aceptables pueden ser formulados como soluciones inyectables. Dichas soluciones pueden contener ingredientes estabilizantes, conservantes y/o ingredientes buffer. En la presente invención el ingrediente farmacéutico activo se encuentra en una solución de etanol al 96%, alcohol bencílico, propilenglicol, ácido benzoico, benzoato de sodio, hidróxido de sodio, agua para inyección, también pueden emplearse otros excipientes como polietilenglicol 400, citrato sódico y ácido cítrico. Las soluciones para la administración parenteral que contienen el o los principios activos fisiológicamente aceptables, también pueden ser preparadas por reconstitución de una composición farmacéutica seca (liofilizado) con un disolvente adecuado antes de utilizarse comprendiendo el empleo de sustancias auxiliares como: manitol, polisorbato 80, cloruro de sodio, entre otros.

Para la administración por vía subdérmica, el o los principios activos fisiológicamente aceptables pueden ser dosificados en forma de implantes empleando como sustancias auxiliares elastómeros de silicona y sílice coloidal anhidra aunque para la confección del pellet pueden emplearse otros polímeros de uso farmacéutico.

Para la administración por vía transdérmica, el o los principios activos fisiológicamente aceptables pueden ser formulados en forma de parches, en este caso el ingrediente farmacéutico activo está contenido en un soporte que consta de una solución de copolímero acrílico, etanol, parafina líquida ligera, palmitato de isopropilo, polietilentereftalato, etilenvinilacetato y una capa de silicona en la parte interna de la hoja desprendible. (con una tasa nominal de liberación de 15 mg/día, en una superficie de 12.75 cm²)

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Síntesis de 5-(3,4-Dihidroxi-benciliden)-2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona

En un balón equipado con agitación magnética se mezclan cantidades equimolares de 3,4-dihidroxibenzaldehído y ácido de Meldrum usando agua desionizada como disolvente en proporción de 1-2 L por mol de reaccionantes. La mezcla de reacción se agita aproximadamente entre 3-5 horas. Transcurrido este tiempo se obtiene un precipitado de color amarillo el cual se colecta mediante filtración a vacío, se lava entre tres y cinco veces con agua y se pone en una desecadora. La reacción es monitoreada por cromatografía de capa delgada (silica-gel) usando como fase móvil n-hexano-acetato de etilo (1:1).

Tiempo de reacción (3-5h); Rendimiento >75%

Temperatura de fusión: 154-157 °C (no corregido).

PREPARACIÓN DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES (a partir de derivados compuestos fenólicos o polifenólicos y a partir de derivados de compuestos fenólicos o polifenólicos combinados con sistemas tricíclicos del tipo benzodiazepinas fusionadas a derivados de 1,4-dihidropiridinas) **PARA LAS EVALUACIONES BIOLÓGICAS.**

Ejemplo 2. Preparación de una formulación en forma de polvo para suspensión conteniendo el KM 34 como ingrediente farmacéutico activo.

Cada cucharadita (5 ml) de KM 34 polvo para suspensión contiene:

COMPONENTE	CANTIDAD	FUNCIÓN
KM 34	40.00 mg	Principio activo
Polivinilpirrolidona (Kollidon K-30)	50.00 mg	Agente suspensor
Crospovidona (Kollidon CL-M)	133.33 mg	Agente suspensor
Oxido de magnesio pesado	210.00 mg	Agente enmascarador de sabor
Sacarina Sódica	16.66 mg	Edulcorante
Menta Sabor Polvo	13.33 mg	Agente Saborizante
Fresa Sabor Polvo	20.00 mg	Agente Saborizante
Sacarosa	1183.34 mg	Relleno

Breve descripción del proceso tecnológico:

- Pasar por molino a alta velocidad la Sacarina Sódica y la Sacarosa y tamice por malla # 20 el Principio activo, Menta Sabor Polvo y el Magnesio Óxido Pesado y por malla # 60 la Fresa Sabor Polvo.
- Pesar las cantidades de las materias primas según la formulación descrita.
- Mezclar durante 10 minutos en el mezclador Vanguard modelo V – 5.
- Recolectar el producto mezclado en tanques con doble bolsa de nylon.
- Trasladar el producto a la Llenadora -Tapadora y envase 5 gramos del producto en frascos ámbar de 60 mL.

Ejemplo 3. Preparación de una formulación en forma de tableta conteniendo el KM 34 como ingrediente farmacéutico activo.

Cada tableta de 120.00 mg contiene:

Componente	Cantidad	Función
KM 34	40,00 mg	Principio activo
Almidón de maíz	23,00 mg	Desintegrante
Polivinilpirrolidona K-25	4,00 mg	Aglutinante
Lactosa monohidratada	50,50 mg	Relleno
Estearato de magnesio	1,50 mg	Lubricante
Dióxido de silicio coloidal	1,00 mg	Lubricante
Etanol, Clase C *	12,00 µl	Solvente
Agua desionizada *	12,00 µl	Solvente

* Se evaporan durante el proceso de secado.

Breve descripción del proceso tecnológico:

1. Tamice el principio activo, el almidón y la lactosa por malla 20.
2. Pese todos los componentes de la formulación según las cantidades establecidas en la fórmula.
3. Para la preparación de la solución aglutinante vierta en un tachó con camiseta de vapor la mezcla de agua y alcohol etílico clase C, adicione la polivinilpirrolidona y agite hasta completa disolución.
4. Cargue la mezcladora con el principio activo, el almidón y la lactosa (componentes de la fase interna). Mezclar durante 15 min.
5. Adicione la solución aglutinante lentamente utilizando la bomba peristáltica, complete el grado de humectación requerido empleando agua y alcohol etílico clase C (1:1) de ser necesario. Granule por molino a baja velocidad.
6. Seque el granulado en un lecho fluidizado. A los 10 min tome una muestra representativa del granulado, degranule y compruebe la humedad residual del mismo; el valor de dicha humedad deberá estar comprendido entre 0,8 y 1,2 %.
7. Mezcle el granulado seco con los lubricantes durante 10 min.
8. Comprima en una máquina rotativa de alta velocidad, empleando troqueles planos, biselados y ranurados de 6.4 mm de diámetro (1/4 PBR), ajustando la troqueladora para obtener tabletas con los siguientes parámetros:

Masa: 120.0 mg $\pm$ 10 %

Altura: 2.6 $\pm$ 0,10 mm

Dureza: 4,0 $\pm$ 1 KgF

Friabilidad: menor del 1 %

Ejemplo 4 Preparación de una formulación en forma inyectable conteniendo el KM 34 como ingrediente farmacéutico activo.

Cada bulbo (2 mL) de KM 34 contiene:

Componente	Cada mL contiene	Cantidad por Unidad de Dosis	Función
KM 34	5,0 mg	10,0 mg	Principio activo
Cremofor ELP	527,0 mg	1054,0 mg	Coadyuvante
Ácido clorhídrico 1N c.s.p	-	-	Slr Ajuste de pH
Alcohol deshidratado c.s.p	1.0 mL	2.0 mL	Disolvente
*Nitrógeno cs	-	-	

1. Verifique que el reactor este completamente seco después de esterilizado, de lo contrario enjuagarlo con alcohol deshidratado.
2. Prepare una solución de ácido clorhídrico 1 N para el ajuste de pH.
3. Adicione una parte del Cremofor ELP y del alcohol deshidratado al reactor. Mezcle a 420 rpm.
4. Pese el principio activo y adicione porciones de alcohol deshidratado al beaker que lo contiene, dispérselo con el agitador de vidrio y adiciónelo al reactor, repita esta operación hasta arrastrar todo el principio activo y agotar todo el alcohol deshidratado.
5. En el reactor mantenga la agitación durante 60 min. a 420 rpm hasta lograr la total disolución del principio activo.
6. Agregue el resto de Cremofor ELP arrastrando el remanente con alcohol deshidratado, agitando durante 10 min. a 420 rpm.
7. Determine el pH de la solución y ajuste con solución de ácido clorhídrico 1N entre 5,0 – 6,0.
8. Complete el volumen de la solución adicionando alcohol deshidratado. Agite durante 5 minutos a 420 rpm.
9. Tome 10 mL de la solución y envíelo al laboratorio para el control de proceso (valoración y pH)
10. Verifique el correcto montaje de los sistemas de llenado y nitrogenación.
11. Realice la prueba de integridad del filtro Sartobran P MidiCaps, (0,45 + 0,2 µm) de porosidad con alcohol deshidratado.
12. Terminado el control de proceso, presurice el reactor utilizando nitrógeno (0.7-1.0 bar) para impulsar la solución a través del filtro cartucho Sartobran P de 0,45 µm +0,2 µm de porosidad. Realice el llenado y sellado de los bulbos dosificando 2,2 mL de la solución.

Ejemplo 5. Preparación de una formulación en forma de tableta conteniendo la combinación del KM 34 y el JM 20 como ingrediente farmacéutico activo.

Cada tableta de 120.00 mg contiene:

Componente	Cantidad	Función
KM 34	20,00 mg	Principio activo
JM 20	20,00 mg	Principio activo
Almidón de maíz	23,00 mg	Desintegrante
Polivinilpirrolidona K-25	4,00 mg	Aglutinante
Lactosa monohidratada	50,50 mg	Relleno
Estearato de magnesio	1,50 mg	Lubricante
Dióxido de silicio coloidal	1,00 mg	Lubricante
Etanol, Clase C *	12,00 µl	Solvente
Agua desionizada *	12,00 µl	Solvente

* Se evaporan durante el proceso de secado.

Breve descripción del proceso tecnológico:

1. Tamice los principios activos, el almidón y la lactosa por malla 20.
2. Pese todos los componentes de la formulación según las cantidades establecidas en la fórmula.
3. Para la preparación de la solución aglutinante vierta en un tachó con camiseta de vapor la mezcla de agua y alcohol etílico clase C, adicione la polivinilpirrolidona y agite hasta completa disolución.
4. Cargue la mezcladora con el principio activo, el almidón y la lactosa (componentes de la fase interna). Mezclar durante 15 min.
5. Adicione la solución aglutinante lentamente utilizando la bomba peristáltica, complete el grado de humectación requerido empleando agua y alcohol etílico clase C (1:1) de ser necesario. Granule por molino a baja velocidad.
6. Seque el granulado en un lecho fluidizado. A los 10 min tome una muestra representativa del granulado, degranule y compruebe la humedad residual del mismo; el valor de dicha humedad deberá estar comprendido entre 0,8 y 1,2 %.
7. Mezcle el granulado seco con los lubricantes durante 10 min.
8. Comprima en una máquina rotativa de alta velocidad, empleando troqueles planos, biselados y ranurados de 6.4 mm de diámetro (1/4 PBR), ajustando la troqueladora para obtener tabletas con los siguientes parámetros:

Masa: 120.0 mg $\pm$ 10 %

Altura: 2.6 $\pm$ 0,10 mm

Dureza: 4,0 $\pm$ 1 KgF

Friabilidad: menor del 1 %

Ejemplo 6 Preparación de una formulación en forma de gotas orales conteniendo la

combinación del KM 34 y el JM 20 como ingrediente farmacéutico activo.

Cada mL (20 gotas) contiene:

Componente	Cantidad	Función
KM 34	20.0 mg	Principio activo
JM 20	20.0 mg	Principio activo
Propilenglicol	300.0 mg	Disolvente coadyuvante
Kollidon 25	160.0 mg	Agente Viscosante
Sacarina sódica	12.5 mg	Edulcorante
Rojo ponceaux	0.05 mg	Colorante
Ácido cítrico	5.535 mg	Estabilizador del pH
Sodio citrato dihidratado	20.0 mg	Estabilizador del pH
Alcohol etílico	100.0 mg	Disolvente coadyuvante
Metilparabeno	1.8 mg	Preservativo a.m.
Propilparabeno	0.2 mg	Preservativo a.m.
Fresa sabor líquida (soluble)	20.0 mg	Saborizante
Agua Purificada c.s.p.	1.0 mL	Vehículo

Breve descripción del proceso tecnológico:

1. Medir el pH y la conductividad del agua purificada en el momento de fabricar el producto.
2. Vierta el propilenglicol en el reactor.
3. En un recipiente auxiliar de acero inoxidable, de capacidad adecuada, disolver la sacarina sódica en agua purificada.
4. Incorporar el Kollidon 25, espolvoreándolo poco a poco, y agitar durante un tiempo no menor de 30 minutos hasta dispersión total.
5. Agitar y aplicar calor a la preparación, manteniendo la temperatura entre 40 – 50 °C, durante 30 minutos.
6. Incorporar los principios activos a la resultante del paso anterior, en pequeñas porciones, manteniendo la agitación constante por espacio de 30 minutos.
7. Retirar el calor y esperar que la preparación tome temperatura ambiente, 30 ± 2 °C.
8. En un recipiente auxiliar de vidrio o acero inoxidable, de capacidad adecuada, disolver el metilparabeno y el propilparabeno en el alcohol etílico clase "C" agitando constantemente hasta total disolución.
9. Añadir en la resultante del paso anterior la fresa sabor líquido soluble y agitar hasta homogeneización total.
10. Incorporar la resultante del paso anterior al tanque reactor, lentamente, con agitación fuerte y constante.

11. En un recipiente de vidrio o de acero inoxidable, de capacidad adecuada, disolver en agua purificada, el ácido cítrico y el sodio citrato dihidratado, agitando tras cada adición hasta su disolución total.
12. Incorporar la resultante del paso anterior al tanque reactor, lentamente, con agitación fuerte y constante.
13. En un recipiente de vidrio o de acero inoxidable, de capacidad adecuada, disolver en agua purificada el rojo ponceaux, agitando hasta su disolución total e incorporar a la preparación.
14. Enrasar al volumen prefijado con agua purificada. Agitar para uniformar.
15. Comprobar que el pH se mantenga en el intervalo de 4.0 – 6.0.
16. Realizar el filtrado final, compruebe las características organolépticas.
17. Envasar la preparación final en los frascos de vidrio ámbar x 15 mL, con 15.0 ± 1.0 mL de la solución, tapándolos adecuadamente, usando las tapas con los reductores goteros para producto oleoso.

Ejemplo 7. Preparación de una formulación en forma inyectable conteniendo la combinación del KM 34 y el JM 20 como ingrediente farmacéutico activo.

Cada bulbo (2 mL) contiene:

Componente	Cada mL contiene	Cantidad por Unidad de Dosis	Función
KM 34	2,5 mg	5,0 mg	Principio activo
JM 20	2,5 mg	5,0 mg	Principio activo
Cremofor ELP	527,0 mg	1054,0 mg	Coadyuvante
Ácido clorhídrico 1N c.s.p	-	-	Slr Ajuste de pH
Alcohol deshidratado c.s.p	1.0 mL	2.0 mL	Disolvente
*Nitrógeno cs	-	-	

1. Verifique que el reactor este completamente seco después de esterilizado, de lo contrario enjuagarlo con alcohol deshidratado.
2. Prepare una solución de ácido clorhídrico 1 N para el ajuste de pH.
3. Adicione una parte del Cremofor ELP y del alcohol deshidratado al reactor. Mezcle a 420 rpm.
4. Pese los principios activos y adicione porciones de alcohol deshidratado al beaker que lo contiene, dispérselo con el agitador de vidrio y adiciónelo al reactor, repita esta operación hasta arrastrar todo los principios activos y agotar todo el alcohol deshidratado.
5. En el reactor mantenga la agitación durante 60 min. a 420 rpm hasta lograr la total disolución de los principios activos.

6. Agregue el resto de Cremofor ELP arrastrando el remanente con alcohol deshidratado, agitando durante 10 min. a 420 rpm.
7. Determine el pH de la solución y ajuste con solución de ácido clorhídrico 1N entre 5,0 – 6,0.
8. Complete el volumen de la solución adicionando alcohol deshidratado. Agite durante 5 minutos a 420 rpm.
9. Tome 10 mL de la solución y envíelo al laboratorio para el control de proceso (valoración y pH)
10. Verifique el correcto montaje de los sistemas de llenado y nitrogenación.
11. Realice la prueba de integridad del filtro Sartobran P MidiCaps, (0,45 + 0,2 μ m) de porosidad con alcohol deshidratado.
12. Terminado el control de proceso, presurice el reactor utilizando nitrógeno (0.7-1.0 bar) para impulsar la solución a través del filtro cartucho Sartobran P de 0,45 μ m +0,2 μ m de porosidad. Realice el llenado y sellado de los bulbos dosificando 2,2 mL de la solución.

ENSAYOS DE REALIZACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLOGICA

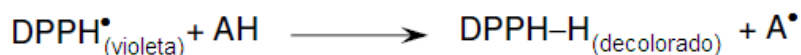
Ejemplo 8. Actividad antioxidante del KM-34

Capacidad del KM-34 para reducir radicales DPPH.

Uno de los métodos más comúnmente empleados para estimar actividad antioxidante, consiste en evaluar la capacidad de diferentes compuestos para reducir radicales DPPH, que pueden ser determinados espectrofotométricamente (Brand-Williams *et al.*, 1995). El DPPH es un radical libre estable debido a la deslocalización de e^- disponibles sobre toda la molécula, demostrándose que las moléculas del mismo no dimerizan. La deslocalización electrónica provoca la intensa coloración violeta de la forma radicalaria del DPPH, cuando este se prepara en solución de etanol (Molyneux *et al.*, 2004).

Los resultados del efecto del KM-34 (5-400 μ M) sobre los radicales DPPH se muestran en la Fig. 1, donde se muestra el porcentaje de reducción del radical DPPH (100 μ M) por el KM-34 (5–400 μ M), el que fue determinado mediante el cambio en la absorbancia a 550 nm respecto a un blanco que contenía sólo DPPH y vehículo (cero concentración de KM-34 o AA), después de 30 minutos de reacción. Los valores están expresados como la media $\pm$ DE (n=3). *P < 0.05 respecto al vehículo. En la misma se puede observar que el % de reducción del radical es directamente proporcional al aumento de las concentraciones de KM; a concentraciones superiores a 5 μ M y después de 30 minutos de reacción se observaron % de inhibición del radical DPPH significativamente (p<0.05) mayores con respecto al vehículo. A concentraciones por encima de 50 μ M el KM-34 alcanzó su máxima respuesta. El valor de CI_{50} obtenido para el KM fue aproximadamente 2,4 veces menor que el obtenido para el ácido ascórbico (AA) utilizado como compuesto de referencia.

Dada su naturaleza aromática, este compuesto dihidroxi sustituido se comporta como excelente donador de electrones (Vermerris y Nicholson, 2006) por la conjugación electrónica (Merchán *et al.*, 1981). El menor valor de Cl_{50} del KM-34 (16.26 μ M) respecto al AA (38.70 μ M) demuestra el fuerte poder antioxidante de esta molécula. El hecho de que la presencia de grupos fenólicos confiera características antioxidantes (Fraga, 2007), permite representar el efecto de este polifenol (AH) de la siguiente forma:



La estabilidad del radical formado por la acción del KM es una condición esencial para su actividad antioxidante. La carga negativa se deslocaliza en el sistema aromático, lo que provoca una marcada estabilidad del ión (Merchán *et al.*, 1981).

Actividad secuestradora de radicales $O_2^{\bullet-}$ del KM-34 en el ensayo del pirogalol.

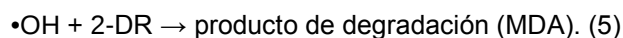
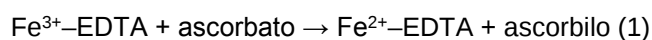
Para evaluar la actividad secuestradora de $O_2^{\bullet-}$ del KM-34 se utilizó un sistema no enzimático generador de estos radicales, los cuales catalizan la autooxidación del pirogalol, formándose un compuesto coloreado que absorbe a los 420 nm (Marklund, 1985). En la figura 2 se muestra la actividad del KM-34 (5-100 μ M) como secuestrador de radicales $O_2^{\bullet-}$ expresada como el porcentaje de inhibición de la autooxidación del pirogalol. El mismo se obtuvo mediante la variación de la absorbancia a 420 nm durante 1 minuto respecto a un blanco (reacción no inhibida, sin KM-34; la pendiente fue calculada para cada concentración de la muestra y para el blanco con un $R^2 > 0.98$. La reacción tiene lugar en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8.2 y fueron iniciadas por la adición del pirogalol 0,124 mM. * $P < 0.05$ respecto al vehículo (reacción no inhibida). Como se muestra en la Fig. 2, concentraciones de KM-34 mayores que 5 μ M inhibieron significativamente (para $p < 0.05$) la formación de la forma oxidada del pirogalol con respecto al vehículo, el valor de Cl_{50} fue de 11.04 μ M. A partir de 50 μ M, se inhibió totalmente la oxidación del pirogalol.

Los resultados de este ensayo sustentan el hecho de que el KM-34 es un potente secuestrador de radicales $O_2^{\bullet-}$, responsable este de las reacciones de propagación que aceleran la formación de la forma oxidada del pirogalol. Bajo condiciones fisiológicas de sobreproducción y agotamiento de sus secuestradores, el $O_2^{\bullet-}$ puede interactuar con los grupos sulfhidrilos de proteínas y enzimas vecinas causando su inactivación e iniciar una cascada de eventos oxidativos, principalmente a través de la reacción de Fenton-Haber-Weiss. Puede además movilizar el hierro de las reservas intracelulares de ferretina (Brent y Rumack, 1993). Este dihidroxifenol (KM-34) podría prevenir el daño provocado por el $O_2^{\bullet-}$ y la formación del $OH^{\bullet}$, más reactivo.

Efecto protector del KM-34 sobre degradación de la 2-desoxi-D-ribosa.

Para evaluar la acción protectora del KM-34 sobre la degradación oxidativa de la DR (producto del efecto de radicales $\text{OH}^\bullet$), se tuvieron en cuenta los resultados mostrados en el gráfico 3. La misma muestra el efecto del KM-34 (0.1, 1, 10, 100 μM) en el daño oxidativo a 28 mM de Desoxiribosa, inducido por Fe^{3+} -EDTA y ascorbato. Las soluciones se incubaron 30 minutos a 37 °C y contenían 10 mM de tampón fosfato pH 7.4, 100 μM EDTA, 25 μM FeCl_3 , DR (2.8 o 28 mM). Las reacciones se iniciaron con AA 100 μM . Los resultados están expresados como el porcentaje de inhibición de la degradación de la Desoxiribosa respecto a un control que contenía sólo etanol absoluto, obtenido mediante cambios en la absorbancia a 532 nm. Las barras muestran la media $\pm$ DE (n=3). *P < 0.05 respecto al control.. En ambos casos los resultados significativos (*P < 0.05 respecto al control negativo) se observan a concentraciones de KM-34 mayores de 10 μM .

El proceso de formación de radicales $\text{OH}^\bullet$, así como los daños causados a la DR, transcurren mediante las siguientes reacciones (Pardo et al., 2006):



De este modo podemos comprender a los niveles donde pudiera actuar el KM-34, el cual demostró inhibición de la formación del principal producto de la degradación de la DR, el MDA (monitoreada espectrofotométricamente a 532 nm) a valores entre 10 y 100 μM independientemente de las concentraciones utilizadas de DR. Aunque estudios anteriores demostraron la capacidad reductora del KM-34 sobre radicales DPPH y $\text{O}_2^{\bullet-}$, los cuales pudieran esperarse igualmente para el radical $\bullet\text{OH}$, este ensayo nos sugiere que en aquellos sistemas donde la producción de ERO esté mediada por hierro, la actividad antioxidante del KM-34 pudiera estar dirigida principalmente a la prevención de la formación de estas especies por coordinación del metal, sin descartar el secuestro directo de las mismas (Pardo et al., 2006). Este compuesto presenta en su estructura un grupo catecol, grupos cetónicos e insaturaciones que pueden contribuir a la actividad antioxidante por unión al hierro (Perron y Brumaghim, 2009). La alta constante de formación del complejo Fe^{3+} -EDTA (logK = 25.5) pudiera impedir en alguna medida que el KM-34 desplace a este último, sin embargo, la constante de formación para el complejo Fe^{2+} -EDTA es aproximadamente la mitad respecto al complejo Fe^{3+} -EDTA y podría ser suficiente para permitir que el KM-34 estimule la autooxidación del Fe^{2+} (Pardo et al., 2006), impidiendo que este metal participe en las reacciones tipo Fenton-Haber-Weiss. Por otra parte, ensayos experimentales llevados a cabo en el LSO demuestran la interacción del KM-34 con el H_2O_2 , resultando en la formación de epóxidos estables (resultados no publicados). Esto pudiera explicar otro modo de inhibición de la reacción de Fenton por parte del KM-34.

Evidencias espectrofotométricas de interacciones entre el KM-34 y el Fe²⁺.

Con el objetivo de verificar la existencia de posibles interacciones entre el KM-34 y el Fe²⁺ (a través de modificaciones en sus espectros), se obtuvieron los resultados que a continuación se muestran:

La figura 4 muestra los datos de absorción máxima en el UV-VIS (200-500nm) del KM-34 100 µM en una mezcla de tampón fosfato (KH₂PO₄/KOH) 10 mM pH 7.4 y etanol absoluto 14:1 (v:v) y la absorbancia en presencia de FeCl₂ (50, 100 y 200 µM) disuelto en HCL 10mM. En los resultados experimentales expuestos a través del gráfico (Figura 4), se puede observar que la absorbancia del KM-34 en los máximos de absorción predeterminados 262, 345 y 472(nm respectivamente) se modifica a medida que la concentración del ión ferroso aumenta. Esto pudiera indicar posibles interacciones entre el Fe²⁺ y el KM-34 donde el ion es estabilizado a Fe³⁺ por ligandos insaturados debido a la estabilización del campo cristalino más grande de una configuración electrónica d⁶ (Fe²⁺) a una d⁵ (Fe³⁺) (Hider et al., 1981, Hider et al., 1983). Esto justifica la respuesta obtenida en el ensayo de degradación oxidativa de la DR donde se pudo observar que el KM-34 en estas condiciones parece actuar más como coordinador del Fe²⁺ que como secuestrador de •OH. Este resultado sería muy bueno si tenemos en cuenta que el Fe²⁺ participa activamente en procesos que dan lugar a ERO como la reacción de Fenton-Haber-Weiss (Pardo, 2007), si el KM-34 lograra mantener controlado al ión mediante su quelación, el riesgo de formación de ERO sería menor.

Efectos del KM-34 sobre la POL espontánea o inducida por Fe³⁺/AA en homogenado de cerebro de ratas.

El homogenado de cerebro es rico en fosfolípidos, los cuales sufren autooxidación espontánea o inducida por la presencia de FeCl₃ y AA, donde este último se oxida a expensas del metal que se reduce y así queda disponible el ión para catalizar la reacción de Fenton-Haber-Weiss (Hiroi et al., 2005; Kooncumchoo, 2005). Los efectos del KM-34 sobre estos procesos se muestran en la Fig. 5. La misma muestra los efectos del KM-34 (0.01-100 µM) en la peroxidación lipídica espontánea y e inducida por FeCl₃ 100 mM y AA 100 mM. Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora y posteriormente se cuantificaron los niveles de MDA mediante el ácido tiobarbitúrico (ATB), determinándose la absorbancia a 532 nm. Los valores están expresados como la media ± DE (n=3). * p<0.05 respecto al control. El compuesto inhibió significativamente (p<0.05) la POL espontánea e inducida por la mezcla Fe³⁺/AA a concentraciones superiores a 0.1 y 10 µM respectivamente con respecto a la reacción no inhibida.

La POL ha sido reconocida, en las últimas 3 décadas, como un evento de gran importancia, tanto desde el punto de vista fisiológico como fisiopatológico. El incremento de la POL se considera como una importante y esencial causa de la iniciación del EO relacionado con el daño a varios

tejidos, la muerte celular y la progresión adicional de muchas enfermedades agudas y crónicas. El MDA referido a altas concentraciones como tóxico y mutagénico y los hidroxi-alquinoxales (HAL) son productos terminales y marcadores de la POL (León, 2010). Resultados anteriormente expuestos indican que el KM-34 es capaz de inhibir este proceso oxidativo espontáneo evitando la formación de MDA a concentraciones superiores de 0.1 μ M. Esto realmente es lo esperado, aspecto que se refuerza más cuando se ha demostrado la potente capacidad de este polifenol de secuestrar RL como el DPPH y $O_2^{\cdot-}$ y nos lleva a pensar que el KM-34 podría captar otros RL generados durante la POL como los lipoperoxilos ($LOO^{\cdot}$) y alcoxilos ($LO^{\cdot}$), comportándose como un antioxidante de ruptura de cadena (*chain-breaking*). Para el caso de la POL catalizada por la mezcla de Fe^{3+} /AA (100mM), aunque la inhibición pudiera parecer menos marcada (a partir de KM-34 10 μ M), también son resultados significativos si se tiene en cuenta que el proceso oxidativo es mayor. El AA reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} , estado en el que puede participar en la formación de radicales $OH^{\cdot}$ a través de la reacción química de Fenton-Haber-Weiss. Estos radicales son capaces de quitar un átomo de hidrógeno a un ácido graso poli-insaturado (LH) e iniciar el daño oxidativo (Hiroi *et al.*, 2005; Kooncumchoo, 2005). Los resultados en este caso nos sugiere que además del secuestro directo de los RL formados, pudiera existir la interacción entre el KM-34 y el hierro, impidiendo así que este participe en las etapas de iniciación y propagación de la peroxidación, manteniéndolo acomplexado en una forma inactiva desde el punto de vista redox.

Efectos protectores del KM-34 frente la acción del L-glutamato.

El proceso de excitotoxicidad está definido como el daño neuronal causado por la excesiva activación de receptores glutamatérgicos. La entrada de elevados niveles de Ca^{2+} luego de la activación de los receptores, estimulan la activación de enzimas como la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) que genera ERN /ERO en grandes concentraciones conllevando a la muerte celular (Nakamura y Lipton, 2010; Yang *et al.*, 2010; Torregrosa G, *et al.*, 2009). Por otra parte los elevados niveles del glutamato u otros aminoácidos excitatorios participan en la captación de cisteína (esencial para la síntesis de antioxidantes como SOD), lo cual disminuye las defensas antioxidantes de las neuronas contra los procesos oxidativos (Emerit *et al.*, 2004; Sorg, 2004). Los resultados obtenidos en múltiples modelos de excitotoxicidad indican el glutamato inhibe significativamente ($P < 0.01$) la viabilidad celular, identificándose cambios morfológicos celulares (apreciables al microscopio) en presencia de este NT (Yang *et al.*, 2010). En este sentido, la figura 6 muestra los resultados obtenidos del experimento desarrollado con 50 mM de L-glutamato para demostrar el efecto citoprotector del KM-34. La figura 6 muestra el efecto citoprotector del KM-34 (0.001-10 μ M) frente al daño inducido por L-glutamato (50 mmol/L) en cultivos de células PC12. La viabilidad (% de células vivas) se determinó mediante el ensayo del MTT. Las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 células/mL en una placa de 96 pocillos. El KM-34 fue añadido simultáneamente a la adición del L-glutamato. Posteriormente el cultivo se dejó incubar a 37 °C, 95 % de O_2 y 5% de CO_2 durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el

sobrenadante y las células fueron incubadas con 20 µg de MTT durante 2 horas más y se midió la absorbancia a 450 nm con referencia a 630 nm. Los resultados están expresados como porcentaje de células vivas respecto al control (células sin dañar, 100% de células vivas). El * representa diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control L-glutamato. Este compuesto a concentraciones mayores de 0.01 µM y en presencia de L-glutamato, inhibe los daños a las células significativamente ($P < 0.01$) con respecto al control negativo. A valores por encima de KM-34 1 µM, la respuesta de citoprotección es mayor del 80%.

La elevada producción de ERN/ ERO, es uno de los mecanismos que media el proceso de excitotoxicidad celular llevada a cabo por elevadas concentraciones de glutamato (Yang et al., 2010). Estudios anteriores demostraron la capacidad del KM-34 para la captación de RL, siendo los resultados obtenidos en este ensayo otra muestra de ello, donde el KM-34 pudiera captar ERN/ ERO evitando los daños que estas causan durante la excitotoxicidad. Otros mecanismos propuestos para dar respuesta a la elevada capacidad citoprotectora mostrada por el KM-34 y que han sido descritos para otros tipos de polifenoles, son la posible activación de enzimas antioxidantes así como la inhibición de la NADPH oxidasa, la cual favorece intensamente los procesos oxidativos cerebrales (Kovacsova et al., 2010).

Efecto citoprotector del KM-34 frente a los daños inducidos por H₂O₂.

El H₂O₂ se forma *in vivo* de forma espontánea o enzimática. A bajas concentraciones este puede ser poco reactivo, sin embargo a elevadas concentraciones puede interactuar con los sistemas de generación de energía de las células e inactivarlas. Además el H₂O₂ es capaz de oxidar grupos -SH de proteínas y causar ruptura de las hebras del ADN. Su efecto más nocivo es la formación de $\cdot\text{OH}$ catalizado por metales de transición mediante la reacción Fenton-Habber-Weiss (Martínez, 2005). Ello fundamenta el uso del H₂O₂ en este ensayo, realizado con el objetivo de observar si el KM-34 es capaz de revertir los daños ocasionados por el agente químico. La figura 7 muestra el Efecto citoprotector del KM-34 (1-100 µM) frente al daño inducido por H₂O₂ (150 µM) en cultivos de células PC12. La viabilidad (% de células vivas) se determinó mediante el ensayo del MTT. Las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 células/mL en una placa de 96 pocillos. El KM-34 fue añadido simultáneamente a la adición de la mezcla del H₂O₂. Posteriormente el cultivo se dejó incubar a 37 °C, 95 % de O₂ y 5% de CO₂ durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y las células fueron incubadas con 20 µg de MTT durante 2 horas más y se midió la absorbancia a 450 nm con referencia a 630 nm. Los resultados están expresados como porcentaje de células vivas respecto al control (células sin dañar, 100% de células vivas). El * representa diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control H₂O₂. La figura 7 muestra los resultados obtenidos, observándose que concentraciones de KM-34 superiores de 5 µM lograron significativamente efectos de supervivencia celular, alcanzándose valores de respuesta superiores al 50% a partir de KM-34 25µM.

Varios resultados experimentales claramente indican que el H_2O_2 es un mediador de múltiples eventos fisiológicos y su exceso conllevaría a múltiples condiciones patológicas (León, 2010). Esta especie química puede estar implicada en la formación de otras ERO aumentando así su efecto dañino, dando lugar a que compuestos antioxidantes como el KM-34 jueguen un papel fundamental en el control de los daños. Los resultados obtenidos durante este ensayo así lo demuestran, ya que a concentraciones superiores a $5\ \mu\text{M}$ el KM-34 aumentó la viabilidad celular de las PC12 expuestas a $150\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 . A concentraciones superiores de $50\ \mu\text{M}$, el % de supervivencia celular es cercano a 90.

La captación de RL pudiera ser el mecanismo fundamental mediante el cual el KM-34 ejerza su efecto protector en este modelo, quedando demostrado una vez más el potencial reductor del KM-34 frente a especies radicalarias como $\text{O}_2^{\cdot}$ generadas a partir del H_2O_2 . Teniendo en cuenta la interacción existente entre el KM-34 y el H_2O_2 (resultado discutido en ensayo de DR), pudiera explicarse la inhibición de la reacción de Fenton-Habber-Weiss por parte del KM-34, además de los daños que ocasiona el H_2O_2 por sí solo.

Efecto protector del KM-34 frente a los daños inducidos por FeSO_4/AA .

El sistema FeSO_4/AA es un fuerte catalizador de reacciones oxidativas en células como las PC12 conduciendo a la muerte de las mismas (Hiroi *et al.*, 2005; Núñez *et al.*, 2011). La figura 8 muestra el efecto citoprotector del KM-34 ($0.001\text{-}10\ \mu\text{M}$) frente al daño inducido por FeSO_4 ($5\ \text{mmol/L}$) y ácido ascórbico (AA, $2\ \text{mmol/L}$) en cultivos de células PC12. La viabilidad (% de células vivas) se determinó mediante el ensayo del MTT. Las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 células/mL en una placa de 96 pocillos. El KM-34 fue añadido simultáneamente a la adición de la mezcla de FeSO_4 y AA. Posteriormente el cultivo se dejó incubar a $37\ ^\circ\text{C}$, 95 % de O_2 y 5% de CO_2 durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y las células fueron incubadas con $20\ \mu\text{g}$ de MTT durante 2 horas mas y se midió la absorbancia a $450\ \text{nm}$ con referencia a $630\ \text{nm}$. Los resultados están expresados como porcentaje de células vivas respecto al control (células sin dañar, 100% de células vivas. El * representa diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control FeSO_4/AA . El KM-34 en presencia de este sistema pro-oxidante mostró efectos citoprotectores a concentraciones superiores a $0.001\ \mu\text{M}$. A concentraciones superiores a $1\ \mu\text{M}$ el % de supervivencia celular fue mayor al 90 % (Figura 8)

Estos resultados demuestran la potente capacidad protectora del KM-34, el cual a concentraciones entre $0.01\text{-}10\ \mu\text{M}$ logra que 90 de cada 100 células sobrevivan ante condiciones oxidantes. Estos resultados nos confirman que el KM-34 pudiera actuar mediante varios mecanismos que refuerzan sus propiedades antioxidantes. Estos pueden ser la captación de RL y la quelación de hierro, mencionados ya en varias ocasiones y fundamentados por las características estructurales (grupos cromóforos) presentes en el KM-34. Este compuesto pudiera reducir los RL generados en la reacción Fenton-Habber-Weiss, ya que los compuestos fenólicos se comportan como excelentes donadores de electrones (Vermerris y Nicholson, 2006).

Por otra parte, la quelación de metales como el hierro mediante los grupos catecol e insaturaciones presentes en la molécula (Perron y Brumaghim, 2009) además de la inactivación del H_2O_2 , podrían evitar la catálisis de la reacción mencionada. Si después de la coordinación del metal, este permaneciera catalíticamente activo, el radical se formaría en la vecindad del polifenol y sería secuestrado inmediatamente. Un creciente número de trabajos demuestran que la interacción metal-polifenol catecólico incrementa la capacidad antioxidante y citoprotectora de este último, principalmente debido a que el ligando adquiere un nuevo centro redox que mimetiza a enzimas antioxidantes como la SOD (Pardo, 2007; Núñez et al., 2011).

El hecho de que el KM-34 ofrezca efectos citoprotectores a concentraciones tan bajas llegando e inclusive muy cercano al valor de protección total, sugiere que este compuesto pudiera actuar además mediante otros mecanismos moleculares más eficientes como la modulación de la expresión génica propuesta para otros agentes quelantes con propiedades antioxidantes como la DFO, que inhiben la activación del NF- κ B y estabilizan al HIF-1 α , aumentando así las respuestas celulares de supervivencia (Kooncumchoo, 2005; Harten et al., 2010). Si este último mecanismo pudiera ser debidamente comprobado para el KM-34, sería de gran relevancia para el empleo de este polifenol en los sistemas *in vivo*, si se tiene en cuenta que el efecto antioxidante basado solo en el secuestro de especies reactivas, podría no ser suficiente para prevenir el daño oxidativo a las elevadas concentraciones de biomoléculas celulares (Halliwell y col., 1991). Los niveles de hierro con capacidad catalítica en la formación de ERO (unido a citrato, ATP y otras moléculas de bajo peso), incluso en situaciones de acumulaciones anormales de hierro, difícilmente excedan los 1-2 μ M, concentraciones que pueden ser quelables por los polifenoles (Halliwell et al., 1991).

A la luz de los resultados obtenidos, no sería utópico pensar en estudios más profundos con vistas a la futura implementación de este compuesto en la terapia de procesos patológicos vinculados a la sobrecarga de hierro y al estrés oxidativo como: enfermedad del Parkinson, el Alzheimer, la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la isquemia, entre otros.

EJEMPLO 9 ACTIVIDAD ANTIPARKISONIANA DEL KM-34

Con el fin de proceder a la denervación dopaminérgica unilateral del cuerpo estriado (hemisferio derecho), las ratas fueron anestesiadas con Hidrato de Cloral [0.4 g/kg de peso, i.p., Merck (Darmstadt, Alemania)] y colocadas en un marco diseñado para cirugía estereotáctica (Stoelting Instruments, EE.UU.), donde se les inyectó dentro de la *substantia nigra pars compacta* derecha la neurotoxina 6-OHDA-HBr (8 μ g/3 μ L de solución salina, la cual contenía además 0.2 mg/ml de ácido ascórbico como anti-oxidante). Las coordenadas fueron calculadas tomando como punto de referencia Bregma acorde con el atlas de Paxinos y Watson: AP: -4.4 mm; ML: 1.2 mm; DV: 7.8 mm y Barra Incisiva: -2.4 mm por debajo de la línea interaural. Una vez en el lugar, la neurotoxina fue inyectada lentamente, a una velocidad de flujo de 1 μ L/min, con una jeringuilla Hamilton (5 μ L), que se mantuvo *in situ* 5 min. después de finalizada la inyección.

IV. Test conductuales

A. Test del cilindro

En esta prueba la rata se coloca dentro de un cilindro de acrílico transparente de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura, que no permite que el animal alcance el borde. La forma cilíndrica propicia la conducta innata de exploración vertical de la pared con las extremidades anteriores al situar a la rata en un lugar desconocido para ella. Luego de colocado el animal se cuantifica la cantidad de toques que realiza el animal con ambas patas delanteras, la derecha o la izquierda hasta un total de 20 toques por animal en la pared del recipiente. Los animales dañados unilateralmente con 6-OHDA tienden a usar menos la pata contralateral al daño, en nuestro caso la pata izquierda. El % de asimetría que presenta cada animal se cuantifica a través de la siguiente fórmula

$$\frac{(\% \text{ toques ipsilateral}) - (\% \text{ toques contralateral})}{(\% \text{ toques ipsilateral}) + (\% \text{ toques contralateral})} = (\% \text{ Asimetría})$$

B. Actividad exploratoria

Para evaluar la actividad exploratoria vertical de los animales se usó el test de actividad exploratoria, el animal se coloca en un cubículo de plexiglás claro con dimensiones de 41 x 41 x 33 (h) cm, (UGO BASILE, Multiple Activity Cage Cat. No. 47420). El cubículo se apoya en una base robusta hecha de plexiglás negro, provisto de cuatro barras verticales de acero con muescas de acero para que los sistemas de detección horizontales/verticales queden correctamente fijados. Los sensores son sistemas de emisión de luz IR capaces de registrar los movimientos de los animales de forma, o sea la exploración vertical. Los datos se monitorean en una computadora. El animal se coloca en el centro de la caja, para que este explore la misma. La caja se coloca en una habitación aislada del investigador y los ruidos ambientales, además de poca iluminación, por un período de 5 min. El investigador toma la cantidad de veces que el animal explora verticalmente las paredes de la caja, al ser interrumpido los haces de luces del sensor de la caja.

Resultados

Efecto neuroprotector del KM-34 en el modelo in vivo de parkinson inducido por la neurotoxina 6-OHDA

La figura 9 muestra el efecto del KM-34 sobre los animales dañados con 6-OHDA, test del cilindro. El gráfico muestra los diferentes grupos de tratamiento, evaluados 7 días después del daño. En este caso se observa la capacidad neuroprotector de las dosis de 2mg y 1mg en el modelo de Parkinson, al existir diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales dañados sin tratamiento. No siendo así para la dosis de 0.5mg, al no presentar diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales dañados sin tratamiento. Los valores representan el

porcentaje medio de asimetría, respecto al grupo control dañado $\pm$ DE. Los datos se analizaron con los métodos estadísticos ANOVA y Tukey's $*p<0.05$.

Los animales tratados con la dosis de 2 mg/Kg y 1 mg/Kg presentaron un % de asimetría igual a los animales vehículos (sanos), al ser evaluados en el test del cilindro, no siendo así los animales tratados con la dosis de 0.5 mg/Kg de KM-34. Los animales del grupo control (6-OHDA) que no recibieron el tratamiento, al ser evaluados en el test del cilindro, no fueron capaces de utilizar la pata contralateral al daño inducido por la 6-OHDA, al provocar una gran denervación de las células dopaminérgicas presentes en la sustancia nigra, por lo que presentaron un % de asimetría tan elevado. A medida que se aumenta la dosis del compuesto los animales se van recuperando del daño hasta alcanzar un efecto neuroprotector máximo en el grupo tratado con 2 mg/Kg, siendo estadísticamente significativo con respecto al control dañado. Los animales tratados con 0.5 mg/Kg no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo dañado sin tratamiento, aunque se observa una cierta tendencia a la disminución del daño. Los animales del grupo vehículo no presentaron ningún daño (fig.9).

La figura 10 muestra el efecto del KM-34 sobre los animales dañados con 6-OHDA, conducta exploratoria. El gráfico muestra los diferentes grupos de tratamiento, evaluados 7 días después del daño. Aquí se muestran los valores de exploración vertical de los diferentes grupos de tratamiento. El grupo dañado presenta una exploración vertical significativamente menor que el control vehículo (animales sanos). A medida que se va incrementando las dosis del KM-34, se observa una tendencia al aumento de la exploración vertical, siendo para el grupo tratado con la mayor dosis estadísticamente significativo con respecto al control dañado. Los valores representan el porcentaje medio de asimetría, respecto al grupo control dañado $\pm$ DE. Los datos se analizaron con los métodos estadísticos ANOVA y Tukey's $*p<0.05$. Por otro lado la conducta exploratoria vertical evaluada en la caja de actividad exploratoria no mostró diferencias estadísticamente significativas de las dosis de 0.5 y 1 mg con respecto de los animales dañados, no siendo así para el caso de los animales tratados con la dosis máxima donde se muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales dañados y no muestra diferencias con respecto del grupo vehículo. Se aprecia una tendencia a aumentar la exploración vertical en las tres dosis evaluadas a medida que se incrementa la dosis del KM-34, siendo máxima para la dosis de 2mg/Kg del KM-34, fig. 10. Los resultados obtenidos indican un potencial efecto neuroprotector del KM34 en la enfermedad de Parkinson.

EJEMPLO 10 ACTIVIDAD ANTIDEMENCIA DEL KM-34

El modelo de demencia inducido por escopolamina ha sido ampliamente reportado para la búsqueda de compuestos efectivos en el tratamiento de diferentes tipos de demencia, incluyendo la enfermedad de Alzheimer. A continuación se presentan resultados de la evaluación del KM-34 en este modelo que demuestra las propiedades neuroprotectoras de esta molécula en el tratamiento de demencias.

Diseño experimental

En los modelos *in vivo*, el KM-34 fue administrado por vía oral (p.o) a razón de 4 mL/Kg de peso. Se evaluaron las dosis de 2, 4 y 8 mg/Kg, como administración aguda 90 minutos antes del inicio de las pruebas conductuales. Para su administración el compuesto fue suspendido en carboximetilcelulosa (CMC) 0.05 %. El bromuro de escopolamina fue disuelto en solución salina 0.9% y administrado por vía intraperitoneal como una única dosis (1 mg/kg, 4 mL/Kg de peso) 30 minutos antes del inicio de las pruebas conductuales.

Los animales fueron elegidos al azar y divididos en 5 grupos experimentales con tratamientos diferentes (n=7, por grupo): grupo control (CMC y salina), grupo vehículo (CMC y escopolamina 1 mg/kg), grupos KM-34 (KM-34 2mg/ Kg y escopolamina 1 mg/kg), (KM-34 4mg/ Kg y escopolamina 1 mg/kg) y (KM-34 8mg/ Kg y escopolamina 1 mg/kg).

Estudios conductuales

Laberinto en T. Alternación espontánea.

La evaluación de la conducta de alternación espontánea en el laberinto en T se realizó siguiendo la metodología propuesta por Capurro y colaboradores (Capurro *et al.*, 2013). Este ensayo consistió en una única sección que se inició con una entrada de elección forzada, seguida de 14 entradas de elección libre a cualquiera de los brazos, izquierdo o derecho, del laberinto. En la primera entrada, se cerró el acceso al brazo derecho del laberinto, forzando la elección del animal hacia el brazo abierto (izquierdo). Posteriormente, se dejó que el animal explorase libremente el laberinto y eligiera a cual brazo entrar, derecho o izquierdo, en 14 oportunidades. Entre cada elección el animal fue regresado a la posición de salida (extremo del brazo largo de la T), donde fue confinado por 5 segundos. La serie de entradas a cada brazo fue anotada y el porcentaje de alternación fue calculado como: (cantidad de alternaciones realizadas/ total de posibles alternaciones) x 100. Esta prueba se realizó 90 y 30 minutos posteriores a la administración de JM-20 y escopolamina, respectivamente.

Reconocimiento de objetos

Este ensayo fue conducido de acuerdo a lo propuesto por Capurro y colaboradores (Capurro *et al.*, 2013), en un campo abierto, en dos días sucesivos. En el primer día se realizó la adaptación de los animales, poniéndolos a explorar la caja durante 3 minutos, en 2 secciones. En el segundo día, se realizó el entrenamiento y la evaluación del aprendizaje mediante dos etapas de 5 minutos de duración cada una, Prueba 1(P1) y Prueba 2 (P2) respectivamente. Antes de iniciarse P1 los animales fueron administrados con JM-20 y escopolamina, 90 y 30 minutos antes, respectivamente. En P1 a las ratas les fueron presentados dos objetos idénticos, llamados objetos familiares (F). Pasados 30 minutos, P2 se inició y las ratas fueron expuestas a dos objetos diferentes: el familiar F y un objeto nuevo (N). Las pruebas fueron video-grabadas para el análisis de la exploración de los objetos, definido por el tiempo de exploración que realiza el animal a cada objeto. Los índices de discriminación entre los objetos F y N, fueron calculados como: $ID = (N - F) / (N + F)$.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0. Se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos experimentales. Se realizó un ANOVA (Analysis Of Variance, según terminología inglesa) y prueba de Tukey de comparación múltiple para comparar entre los diferentes grupos experimentales.

Resultados

En el laberinto en T, se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos en la memoria espacial de corto plazo. El porcentaje de alternaciones se correlaciona positivamente con la habilidad cognitiva y memoria normal de los animales. Se observó que la administración de 2, 4 y 8 mg/Kg de KM-34 (p.o), 1 hora antes de inducirse déficit cognitivo por escopolamina, protegió significativamente ($p < 0.01$) del daño en la memoria espacial con respecto a los no tratados con KM-34 (figura 11).

El efecto del KM-34 en la memoria episódica de reconocimiento de objetos se evaluó mediante la prueba de reconocimiento de objetos nuevos en un diseño de corto plazo. En esta prueba el tiempo de reconocimiento de los objetos familiar (F) y nuevo (N) durante la fase de evaluación fue cuantificado, y se calculó un índice de discriminación (ID) entre ambos objetos. Un índice positivo elevado refleja una buena memoria de reconocimiento del objeto N sobre el F, como se observa en los grupos controles (figura 12). Un índice con valores cercanos a cero o negativos, significa que los animales discriminan poco entre los objetos F y N, o una mayor exploración del objeto F respecto al N. En estos ensayos se observó que las dosis de 4 y 8 mg/Kg de KM-34 (p.o) lograron revertir la afectación sobre el aprendizaje y la memoria de reconocimiento de plazo inducida por escopolamina. Los animales tratados con KM-34 fueron capaces de discriminar entre el objeto previamente conocido y el nuevo de forma similar a como lo hicieron los animales controles del experimento, y significativamente ($p < 0.01$) mayor a como lo realizaron los animales tratados sólo con escopolamina (Fig. 11).

Estos resultados predicen un posible efecto antiamnésico del KM-34. Las potencialidades estructurales del KM-34 y el conjunto de evidencias farmacológicas obtenidas justifican la posibilidad de que el KM-34 posea efectos neuroprotectores en el tratamiento de diferentes tipos de demencia, incluyendo la enfermedad de alzheimer.

EJEMPLO 11 ACTIVIDAD ANTIISQUÉMICA DEL KM-34

Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos ($n = 8$ por grupo): (1) control isquemia/reperfusión (I/R) tratado con vehículo, (2) I/R tratado con KM-34 0.1 mg/kg, (3) I/R tratado con KM-34 0.5 mg/kg, (4) I/R tratado con KM-34 1 mg/kg, (5) sham-operados tratado con vehículo y (6) grupo sham-operados tratados con KM-34 1 mg/kg. En todos los caso el tratamiento se administró por vía oral (con una cánula intragástrica). Para las diferentes dosis, las concentraciones se ajustaron con el objetivo de administrar un volumen constante de 10 mL/kg. Inmediatamente antes de su uso, el KM-34 se suspendió en carboximetil celulosa (CMC) 0,05%.

Inducción de isquemia cerebral focal transitoria en ratas

La isquemia cerebral transitoria se realizó mediante la OACM, utilizando el método del filamento intraluminal. Brevemente, los animales fueron anestesiados con ketamina (75 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg). Se expuso la arteria carótida común derecha realizando una incisión longitudinal en la línea media ventral del cuello y se ligaron las arterias carótidas común y externa con una sutura de seda 3-0. Posteriormente, se introdujo un monofilamento de nailon 4-0 (Somerville, Brasil), con la punta redondeada y recubierta con poli-L-lisina (44), hasta los 18-20 mm de longitud a través de la ACI, con el objetivo de obstruir el origen de la ACM. Después de 90 min de oclusión, se retiró el filamento para permitir la reperusión. La temperatura corporal se mantuvo entre 36,5°C y 37,5°C con una manta de calentamiento. Una hora después las ratas recibieron una dosis oral única de KM-34 (0.1, 0.5 o 1 mg/kg). Los animales del grupo sham (falsos-operados) se sometieron a igual procedimiento quirúrgico pero sin la inserción del monofilamento. Después de 23 horas de reperusión, se evaluó el déficit neurológico y se sacrificaron los animales para determinar el volumen de infarto y realizar las evaluaciones conductuales.

Evaluación del déficit neurológico

El déficit neurológico se evaluó de acuerdo a una escala de seis puntos: 0 = sin déficit neurológico observable; 1 = no extensión de la pata delantera izquierda; 2 = desplazamientos en círculos hacia la izquierda si se suspende al animal por la cola; 3 = desplazamientos espontáneos en círculos hacia la izquierda; 4 = sin actividad motora espontánea con disminución del nivel de conciencia; 5 = muerte.

Medición del tamaño de infarto cerebral

El infarto cerebral se determinó mediante la tinción con TTC, un compuesto incoloro en solución pero que al ser reducido por las deshidrogenasas de mitocondrias funcionales forma una sal de formazán de color rojo ladrillo. De esta forma el tejido que ha sido dañado por la isquemia permanece sin teñirse y puede ser reconocido macroscópicamente.

Los animales se anestesiaron nuevamente después de la evaluación neurológica y se perfundieron transcardialmente con 20 mL de solución salina a 4°C. Los cerebros se extrajeron y se colocaron a 0 °C durante 30 minutos. A continuación, se realizaron cortes coronales de 2 mm de espesor y se incubaron en una solución de TTC 2 %, a 37°C durante 30 min. Los cortes teñidos se fijaron en una solución de formol 4% tamponada con fosfato y se digitalizaron para la determinación del tamaño de infarto con un sistema de análisis de imágenes (ImageJ 1.41, *National Institute of Health*, EE.UU.). Se calculó el índice de edema (volumen del hemisferio ipsilateral a la OACM/volumen del hemisferio contralateral) y el volumen de infarto corregido (volumen de la lesión/índice edema), para evitar sobrestimación del volumen del infarto por el edema cerebral. El volumen de infarto se expresó como porcentaje del hemisferio contralateral.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc., EE.UU.). Los datos se expresaron como la media $\pm$ EEM (error estándar de la media). Las comparaciones entre los diferentes grupos se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, seguido de la prueba Newman-Keuls de comparación múltiple. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis se llevaron a cabo por un investigador que desconocía las asignaciones de los grupos experimentales.

RESULTADOS

El tratamiento con KM-34 redujo el volumen de infarto y déficit neurológico inducido por la oclusión de la arteria cerebral media en ratas

El modelo de oclusión de la arteria cerebral media en ratas, un modelo fiable y reproducible que provoca un déficit sensorimotor y cognitivo ampliamente caracterizado. El compuesto se administró por vía oral (empleando una cánula intragástrica) en dosis de 0.1, 0.5 y 1 mg/kg, 1 hora después de la reperusión. La tinción con TTC demostró que el KM-34 reduce en gran medida el tamaño del infarto (Fig.13 A). El análisis cuantitativo de estos datos reveló que el volumen total del infarto (expresado como porcentaje del hemisferio contralateral) en las ratas tratadas con 0.5 y 1 mg/kg de KM-34, disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en comparación con el grupo tratado con vehículo (de 27.5 % en el grupo tratado con vehículo a 15.7 % y 5.3 %, respectivamente) (Fig.13 B). Este efecto total es resultado de la reducción de los tamaños de infarto cerebral en áreas corticales como subcorticales.

En la evaluación neurológica no se observaron afectaciones conductuales significativas en el grupo sham (resultados no mostrados), mientras que en el grupo no tratado con KM-34 y sometido a la OACM se observó un déficit neurológico severo (Fig.13 C). Las ratas de este grupo mostraron movimientos en círculos, flexión de la pata delantera contralateral al daño y movimientos espontáneos disminuidos. El tratamiento con KM-34 (0.5 y 1 mg/kg) mejoró significativamente ($p < 0,05$) el déficit neurológico, lo que se refleja en la disminución de la puntuación neurológica. En ambos casos, las anomalías en el movimiento y postura de las ratas fueron menores, lo que sugiere que la disminución en el tamaño de infarto por el tratamiento repercute positivamente en el déficit neurológico postisquémico. Por otra parte, la administración de este compuesto no produjo ningún signo de daño tisular o alteraciones conductuales en el grupo sham, indicando que el compuesto no tiene efecto sobre estos parámetros en condiciones basales (sin OACM).

EJEMPLO 12. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS COMBINACIONES DE DERIVADOS TRICÍCLICOS DEL TIPO BENZODIAZEPINAS, PIRIDODIAZEPINAS Y PIRIMIDODIAZEPINAS FUSIONADAS A DERIVADOS DE 1,4-DIHIIDROPIRIDINAS COMBINADAS CON DERIVADOS FENÓLICOS O POLIFENÓLICOS

Para demostrar la superioridad de la combinación de derivados tricíclicos y tetracíclicos del tipo benzodiazepinas, piridodiazepinas y pirimidodiazepinas fusionadas a derivados de 1,4-dihidropiridinas con derivados fenólicos o polifenólicos, con respecto a cada uno de estos sistemas por separado, se emplearon cultivos de células PC12 expuestas a daño por glutamato y peróxido de hidrogeno

Los daños por peróxido de hidrogeno (daño radicalario) y por glutamato (excitotóxico), son representativos de la mayoría de los desórdenes vasculares y del sistema nervioso. En ambos gráficos (Figuras 14 y 15) se observa como los grupos tratados con JM-20 + KM 34 presentaron un porcentaje de sobrevivencia mayor al mostrado para cada uno de ellos por separados. Esto indica que la mezcla de ambos compuestos es superior en cuanto a efectividad terapéutica que cuando se emplean por separados, también predice que los efectos colaterales (responsables de la retirada de muchos medicamentos de la práctica clínica) serán menores cuando se emplea la combinación de derivados tricíclicos y tetracíclicos del tipo benzodiazepinas, piridodiazepinas y pirimidodiazepinas fusionadas a derivados de 1,4-dihidropiridinas con derivados fenólicos o polifenólicos, por la necesidad de emplear dosis menores para lograr un efecto farmacológico superior.

Como modelo de demencia vascular, los animales (ratones albinos suizos machos) fueron sometidos a oclusión transitoria de las arterias carótidas comunes durante 20 minutos y el deterioro cognitivo fue evaluado a través del ensayo de laberinto acuático de Morris. Los resultados muestran que los animales administrados con 4 mg/Kg de JM-20 (p.o), 1 hora después de iniciada la reperusión y durante todos los días de ensayo, disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) el tiempo de latencia de escape con respecto a los animales sin tratamiento. La combinación de JM-20 (4 mg/Kg) + KM-34 (2 mg/Kg) mostró una mejora en la demencia vascular superior a la Tacrina 8 mg/Kg

Como modelo de isquemia cortical permanente se indujo termocoagulación de las arterias piales y se cuantificó el porcentaje de asimetría.

La figura 16 muestra como la combinación de JM-20 (4 mg/Kg) + KM-34 (2 mg/Kg) disminuye la asimetría de los animales lesionados de manera más potente que cada uno de los compuestos por separado.

Para la demencia y el Parkinson, la combinación de JM-20 + KM-34 también potenció de manera significativa el poder neuroprotector de cada una de estas moléculas por separado. Esto posibilita el empleo de dosis inferiores para lograr un efecto superior y disminuye el riesgo de reacciones adversas.