

I. Introducción.

Desarrollo de nuevos fármacos en México

Dr. Guillermo Carvajal-Sandoval*

En nuestro país hay pocos grupos que recientemente se han formado para el desarrollo de nuevos fármacos con utilidad en varios padecimientos humanos.

En este simposio he invitado a 4 investigadores que trabajan en esta área.

El primer de ellos es el doctor Sergio Enrique Meza Toledo, que trabaja en mi laboratorio desarrollando nuevos fármacos antiepilépticos. El presentará el desarrollo de una nueva familia de fármacos que ha planeado contra la epilepsia.

El segundo en el orden de presentación es el doctor Carlos Wong Ramírez, también de la ENCB, quien ha desarrollado algunos nuevos fármacos contra el *Tripanosoma cruzi*.

La doctora Victoria Chagoya Haza junto con sus colaboradores nos hablará sobre un nuevo fármaco para el tratamiento de la Cirrosis hepática, derivado de la Adenosina.

Por último, les presentaré los resultados del efecto de la glicina en la prevención de los daños crónicos de la diabetes mellitus y el envejecimiento.

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Guillermo Carvajal-Sandoval. Departamento de Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, 11340 México, D.F., México. Tel. (52 55) 5729 6300.

IV. Nuevo fármaco para el tratamiento de la cirrosis

Victoria Chagoya-de Sánchez,* Juan Antonio Suárez-Cuenca y Rolando Hernández-Muñoz

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 20 de abril de 2006

Aceptado: 23 de junio de 2006

RESUMEN

La cirrosis es una de las causas más comunes de muerte a nivel mundial ya que la disfunción hepática resultante es una condición letal a mediano o largo plazo. Su etiología es diversa y no existe un tratamiento efectivo para la reversión de esta patología salvo, con sus limitaciones, el trasplante hepático. Estudios de laboratorio en hepatotoxicidad experimental aguda y crónica, usando inicialmente la 6-aminoribofuranosil purina (6-ARP) y posteriormente un derivado con mayor potencia (IFC-305), demostraron que a través de disminuir los inhibidores de las metaloproteinasas con actividad colagenolítica se recupera el metabolismo de la colágena y normaliza la función hepática, particularmente su capacidad regenerativa. La aplicación de este fármaco a pacientes está en el proceso de desarrollo farmacéutico y pruebas clínicas requeridas.

Palabras clave:

Cirrosis, colágena, hepatotoxicidad, inhibidores de metaloproteinasas

SUMMARY

Cirrhosis is one of the most common causes of mortality worldwide because the resulting hepatic dysfunction in the medium to long term constitutes a potentially lethal condition. Its etiology is variable and there is no treatment available to reverse this pathology except liver hepatic transplant that entails some limitations. Our experience regarding studies of acute and chronic experimental hepatotoxicity using 6-aminoribofuranosil purine (6ARP) and later on a potent derivative (IFC-305) shows an increase in collagenolytic activity through a decrease of tissue inhibitor metalloproteinases, favoring hepatic function thru the liver's regenerative capacity. We are currently applying these findings to cirrhotic patients exploring the possibility of a pharmaceutical breakthrough and its ensuing clinical trial.

Keywords:

Cirrosis, collagen, hepatotoxicity, tissue inhibitors metalloproteinases

Introducción

Se considera que la fibrosis hepática es irreversible. Se le denomina cirrosis desde que Laennec, al describir esta patología en 1826, la llamó por primera vez *cirrosis* por el aspecto café naranja que adquiere el hígado y que en griego se le denomina *kirrhos*.¹ Las alteraciones estructurales causadas por esta enfermedad fueron detectadas desde 1761 por el patólogo Gianbattista Morgagni quien, en un reporte de 500 autopsias, describió alteraciones morfológicas del hígado parecidas a las que se reportan en la cirrosis.

Los primeros intentos para entender esta patología datan de 1930 cuando Roessle sugiere que se parece a un proceso degenerativo en el que se observa cicatrización de una lesión y proliferación del tejido. Actualmente, la cirrosis se le sigue dando definiciones en términos morfológicos, siendo la más aceptada la que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 1977 como "un proceso difuso caracterizado por fibrosis y transformación de la arquitectura normal del hígado a nódulos estructuralmente anormales."^{2,3}

La cirrosis surge de un daño crónico e irreversible del parénquima hepático, presenta una fibrosis difusa con nódulos de regeneración que distorsionan la arquitectura lobular y vascular del tejido hepático, originando una pérdida de la masa funcional. La fibrosis es el resultado de la pérdida del equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas de la matriz extracelular (MEC), principalmente de la colágena que es la proteína más abundante en esta estructura. La colágena se acumula debido a una disminución importante en su degradación, proceso que se considera autoperpetuable e irreversible.

La cirrosis, por su alta tasa de mortalidad, es una de las diez principales causas de muerte a nivel mundial y ocupa en México el séptimo lugar como causa de muerte. Sólo en 1997, causó, en nuestro país, 20,420 muertes, siendo una de las tres primeras causas de muerte entre la población económicamente activa de 40 a 60 años de edad.⁴ En Estados Unidos, las tendencias estadísticas auguran un incremento de 223% de muertes por cirrosis para el año 2008 y de 360% para el 2028.⁵

Este problema no es solamente social sino también económico. Por lo general, en las últimas etapas de la enfermedad se presentan varices esofágicas, hipertensión portal, ascitis, encefalopatía, etc., por lo que se requiere

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Victoria Chagoya-de Sánchez. Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México. Tel.: (52 55) 5622 5614, Fax: (52 55) 5622 5611. Correo electrónico: vchagoya@ifc.unam.mx

hospitalización de los pacientes, con el consecuente impacto en el costo de los institutos de salud.

La etiología de la cirrosis es muy diversa. Las causas más frecuentes son el alcoholismo y el daño hepático crónico secundario debido a infección por virus de hepatitis B o C. Son menos frecuentes la cirrosis biliar y la cirrosis autoinmune, complicación de insuficiencia cardíaca congestiva, encontrándose no pocos casos de cirrosis criptogénica de etiología a determinar y que se ven en las autopsias.⁶

El hígado es un tejido anatómicamente heterogéneo, organizado en zonas de tamaño y forma irregular denominadas acinos. Posee diferentes tipos de células como los hepatocitos, las células endoteliales, ovaes, biliares, de Kupffer, de Pit y las estelares⁷ (HSC sus siglas en inglés Hepatic Stellate Cell). Los hepatocitos son células epiteliales poliédricas de 30 a 40 μm de diámetro, altamente polarizadas que constituyen el 70% del parénquima hepático cuya función es principalmente metabólica. Están dispuestos en cordones o hileras que conectan las diferentes zonas. El espacio entre hilera e hilera se denomina sinusoides hepáticos mientras que el espacio entre hilera y endotelio se conoce como espacio de Disse (Figura 1). El complejo formado por los hepatocitos, capilar de la arteria hepática, capilar porta, conductillo biliar, vasos linfáticos y nervios, forma la llamada triada o espacio porta. La conjunción del espacio porta con la vénula hepática constituye el acino.⁷

El tejido libre de células constituye el 20% del volumen hepático y está constituido por la MEC, formada principalmente por colágena. El hígado normal presenta diversos tipos de colágenas fibrilares (I, III, V) y las no fibrilares (IV, VI y XIV).^{8,9} En menor proporción, existen otros componentes como la fibronectina, la laminina, la elastina, los proteoglicanos y los glucosaminoglicanos.^{10,11}

Además de su estructura compleja, el hígado tiene una intensa y diversa actividad bioquímica. Así, dentro del metabolismo de carbohidratos, el hígado regula los niveles de glucosa en la sangre, almacenando, sintetizando y degradando el glucógeno; en el metabolismo de lípidos, sintetiza el colesterol, las lipoproteínas, los fosfolípidos y la oxida grasas y genera los cuerpos cetónicos.

El papel del hígado es importante en el metabolismo proteico ya que sintetiza las proteínas de la sangre entre las cuales figuran la albúmina y los elementos necesarios para la coagulación sanguínea. También es el único tejido que sintetiza la urea como mecanismo de eliminación del residuo nitrogenado de los aminoácidos. Este órgano sintetiza las bases nitrogenadas como purinas y pirimidinas y las distribuye al resto de los tejidos.¹²

Tiene funciones específicas como el almacenamiento de materiales de reserva, vitaminas, hierro, sangre, como la secreción de la bilis y la eliminación de la circulación los eritrocitos dañados; su papel es fundamental en el proceso de detoxificación de los compuestos endógenos tóxicos como el amonio y exógenos como las sustancias tóxicas y los medicamentos, transformándolos en compuestos fácilmente eliminables.

Dentro de este complejo sistema de confluencia estructural y bioquímica, cada población celular o componente de la MEC cumple con su papel para alcanzar la homeostasis que mantenga la estructura y la función del tejido hepático. A este equilibrio, contribuyen diversos metabolitos, citocinas y factores de crecimiento producidos en el hígado o fuera de él que preservan la comunicación célula-célula, célula-MEC y regulan la expresión de los genes responsables de la conservación de la estructura y la función del tejido hepático.¹⁰

Las alteraciones del equilibrio mantenido por la homeostasis pueden favorecer una respuesta regenerativa y por ende la restauración del órgano. Por ejemplo, después de una lesión aguda intensa en la que hay destrucción de células y se detecta disminución de su capacidad funcional, se induce la regeneración hepática. Esto implica proliferación inicial de hepatocitos, seguida por un incremento de las células no parenquimatosas, y por la producción de los componentes normales de la MEC en proporción y distribución adecuadas. Al final del proceso regenerativo, se restablecen las interacciones y funciones generales de los componentes celulares que vuelven a sus condiciones basales.^{10,13,14}

Si por el contrario el daño es pequeño, repetitivo y crónico, los intentos de recuperación de la homeostasis serán insuficientes produciendo la enfermedad del órgano,¹³ y activando procesos como la fibrogénesis y la remodelación tisular que no son proporcionales al origen específico de la lesión hepática.

Durante esta respuesta fibrogénica, los componentes colagénicos de la MEC se incrementan en una proporción de tres a cinco, llegando el hígado a contener hasta seis veces más colágena y proteoglicanos lo que modifica su composición en comparación con un órgano sano.^{15,16} Los componentes no colagénicos como los proteoglicanos y las glucoproteínas (fibronectina, laminina, y tenascina) aumentan en menor proporción,¹⁷⁻¹⁹ lo que provoca alteración en la estruc-

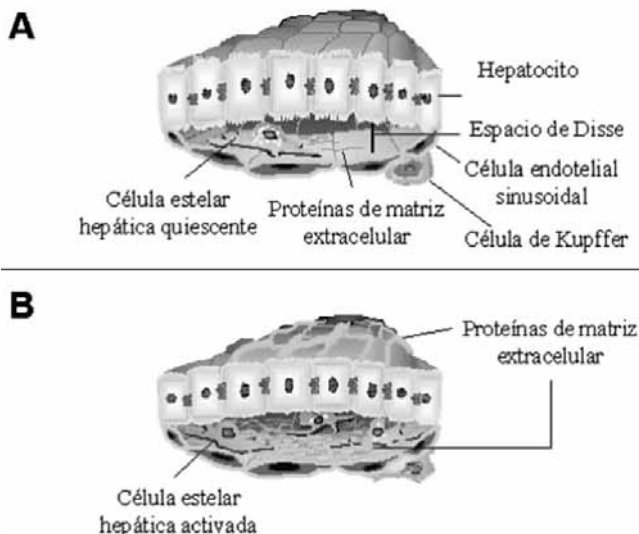


Figura 1. Representación de las poblaciones celulares hepáticas: A) hígado normal, B) hígado con cirrosis inducida con CCl₄.

tura y la función del hígado y su transformación en un tejido fibrótico con nódulos de regeneración del parénquima, dando lugar a la cirrosis.

Fundamentalmente, la respuesta fibrótica del hígado es la misma independientemente del tipo de estímulo que la origine, pudiendo ser genético, metabólico, infeccioso, tóxico, inmunológico y colestásico. El daño tisular debe permanecer meses o años antes de la formación de una fibrosis significativa.

Los mecanismos que originan la cirrosis no se conocen bien a bien; sin embargo, existen características comunes:

- a) un daño tisular que frecuentemente se debe a estrés oxidativo.²⁰
- b) una movilización de células inflamatorias que liberan citocinas reguladoras de la respuesta, contribuyendo a la activación y proliferación de las células efectoras (HSC).^{21,22}
- c) una vez activadas, las células HSC adquieren un fenotipo colagénico en el que se incrementa la biosíntesis de la colágena y de los inhibidores específicos de las colagenasas (TIMP-1 y TIMP-2).^{20,23}

La respuesta inflamatoria asociada al daño tisular juega un papel importante en el desarrollo de la cirrosis favoreciendo el proceso fibrogénico. Este proceso puede también desencadenarse en ausencia de inflamación evidente como ocurre durante la acumulación de metales, hierro o cobre, lo que llega a alterar la homeostasis del tejido, originando la cirrosis en ausencia de daño hepatocelular evidente como sucede en la hemocromatosis y la enfermedad de Wilson.²⁴

A pesar de los avances en el conocimiento de las enfermedades crónico-degenerativas del hígado, no existe un tratamiento curativo para estos padecimientos. Las estrategias terapéuticas están encaminadas al manejo paliativo que retrasa la aparición de la sintomatología asociada a la cirrosis y consiste principalmente en dietas con bajo contenido de grasas y en suplementos vitamínicos. Se han usado algunos medicamentos antifibróticos que tienen efectos colaterales como gastritis. El único tratamiento efectivo por el momento es el trasplante ortotópico del hígado con el cual se ha logrado sobrevida de hasta un 70% durante el primer año posterior a la cirugía. Sin embargo, sus desventajas son obvias; en efecto, todos los pacientes no son candidatos a trasplante, el procedimiento tiene un costo alto, la obtención de donadores es difícil y el tratamiento con inmunosupresores necesarios después del de la cirugía también son caros. Aunado a esto, existe alta posibilidad de reincidencia de la infección y de la fibrosis en el hígado trasplantado por cirrosis secundaria a infección por virus de hepatitis.

Los pacientes infectados con virus de la hepatitis C (HCV) desarrollan una hepatitis crónica recurrente; el 30% de ellos presenta fibrosis y el 10% cirrosis.²⁵ En casos específicos de infecciones virales de tipo C, se trata de evitar que el cuadro de hepatitis crónica evolucione a cirrosis intentando eliminar el virus con compuestos antivirales e interferones α y γ .

Una alternativa terapéutica muy promisoriosa para el tratamiento de esta enfermedad es el uso de un nuevo fármaco,

derivado del ácido aspártico y de la 6-aminorribofuranosil purina (6-ARP), llamado IFC305. Este compuesto tiene una vida media muy corta debido a su rápido metabolismo en el hígado; hasta el momento no se han observado efectos secundarios a las dosis y condiciones administradas.

La sustancia base de este compuesto, la 6-aminorribofuranosil purina (6-ARP), es un nucleósido con actividad fisiológica en los sistemas nervioso central y cardiovascular, es un modulador metabólico y de la respuesta inmune. La mayor parte de las células poseen receptores de cuatro tipos A1, A2a, A2b y A3; puede penetrar a la célula por transporte facilitado.

A continuación se señalan algunos efectos farmacológicos del 6-ARP en la hepatotoxicidad aguda inducida por diversos tóxicos:

1. Prevención parcial del hígado graso.²⁶
2. Recuperación del estado energético normal, disminuido por los tóxicos.²⁷
3. Mantenimiento del equilibrio redox entre citosol y mitocondria.²⁸
4. Prevención de la necrosis inducida por CCl₄ (Tetracloruro de Carbono).²⁹
5. Evitación de la propagación de los radicales libres generados durante el metabolismo del CCl₄ (Tetracloruro de Carbono).³⁰
6. Control del flujo sanguíneo de la arteria hepática.³¹

Con base en estos antecedentes, se evaluó el efecto de este compuesto en un modelo de cirrosis experimental inducido por administración crónica de CCl₄.³² Se encontró que previene parcialmente la fibrosis inducida por el tóxico, inhibe en un 50% el depósito de colágena, preserva el contenido de glucosaminoglicanos, aumenta la actividad de la colagenasa, normaliza el estado funcional del hígado, protege la estructura y la función de las mitocondrias e induce un aumento de la proliferación hepática disminuida en el hígado cirrótico.

Reversión de la cirrosis experimental

A medida que avanza el conocimiento de los mecanismos que desencadenan esta patología, se mantiene latente el interés de muy diversos grupos de investigación por revertir la cirrosis. Con base en los resultados antes mencionados, nos planteamos la posibilidad de probar, en un modelo experimental, el efecto de la 6-ARP y de una serie de sus derivados en el tratamiento, de la cirrosis provocada por la administración crónica de CCl₄. Se seleccionó el derivado más activo, el aspartato de adenosina que se denominó IFC-305. Se obtuvieron resultados fueron muy semejantes a los que se lograron con 6-ARP.

Métodos

La inducción de la cirrosis y el tratamiento se describieron en detalle con anterioridad.³² En resumen, se inyectaron por vía Lp unas ratas Wistar macho de 100 g tres veces a la semana con una pequeña dosis de CCl₄ (T-tetracloruro de carbono)

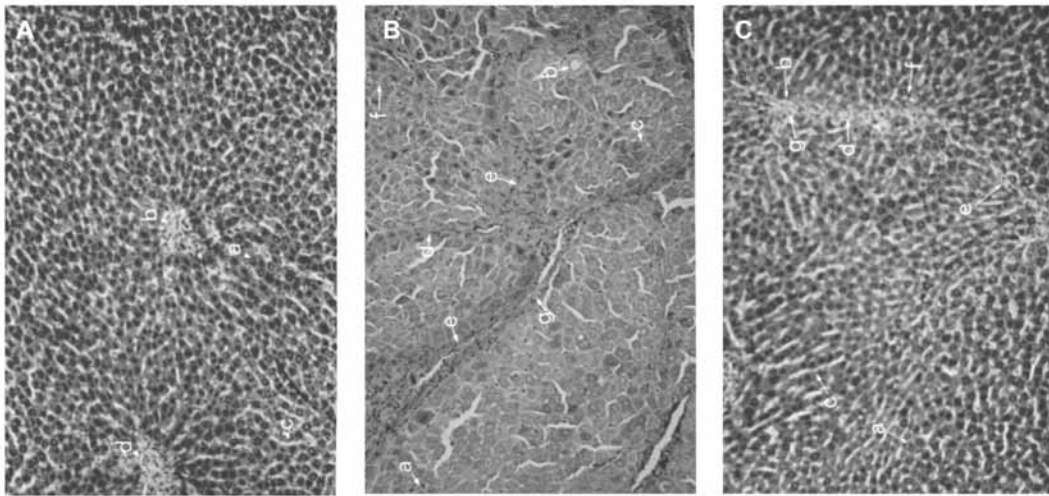


Figura 2. Evaluación histológica por microscopia de luz y tinción de Masson de: A) hígado normal, B) hígado con cirrosis inducida por CCl₄ y tratamiento posterior con salina por 5 semanas, C) hígado con cirrosis inducida con CCl₄ y tratamiento con 6-ARP por 5 semanas.

durante 10 semanas, provocando una cirrosis micronodular, muy similar a la cirrosis humana.³³ Se trabajó con 6 grupos experimentales:

1. un grupo control, sin ningún tratamiento;
2. un grupo control de cirrosis (TO) con animales tratados con el tóxico durante 10 semanas;
3. después de suspender la administración del tóxico y de separar los animales cirróticos del grupo TO, se dividen el resto de los animales en 4 grupos. Dos de ellos reciben tratamiento con administración por vía intraperitoneal de 6-ARP o IFC-305 (50 mg/kg) 3 veces por semana durante 5 o 10 semanas. Los otros 2 grupos fueron inyectados con salina.

Se sacrificaron los animales a tiempos predeterminados y se procedió al análisis histológico, fijando una muestra de tejido en formaldehído para la obtención de cortes con tricrómica de Mason y/o tejido bioquímico en suero, midiendo transaminasa glutámica pirúvica (ALT), albumina y bilirrubina como se describió previamente.³² Se evaluó en el tejido los niveles de colágeno³² que se cuantificó de acuerdo con Roj-kind and González.³⁴ La actividad colagenolítica se determinó con la técnica descrita por Pérez-Tamayo et al.³⁵ La actividad proliferativa se calculó midiendo el índice mitótico que corresponde al promedio de células en mitosis en 10 campos por muestra observadas con el objetivo 40X. La actividad de la timidina cinasa se midió con la técnica de Sayer y Willmanns.³⁶ Las metaloproteinasas y sus inhibidores (TIMP's) se determinaron por técnicas de Western blot, utilizando anticuerpos policlonales de cabra de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA., siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

En la figura 2, se presentan una micrografía de hígado normal, una de hígado dañado después de 10 semanas de

tratamiento con el tóxico y otra de una preparación de un hígado que recibió tratamiento.

En nuestro modelo experimental, el hígado cirrótico se caracteriza por un incremento de 5 veces de su contenido de colágeno, nivel que se mantiene después de 6 meses de discontinuar la administración del tóxico (no se muestra). En estos animales cirróticos, el tratamiento con adenosina promueve una disminución del 70% de la colágena acumulada (Figura 3).

Estudiando el metabolismo de la colágena en el hígado de ratas cirróticas, se evaluó el proceso de síntesis y degra-

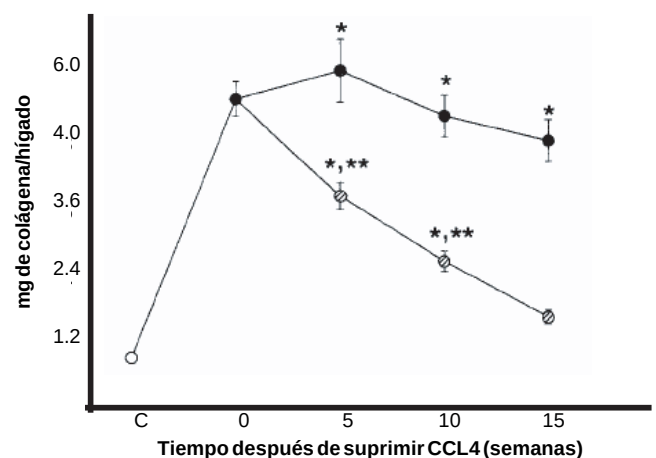


Figura 3. Efecto del tratamiento con 6-ARP en el contenido de colágena hepática en el grupo control de animales cirróticos más salina y el grupo de animales cirróticos tratados con 6-ARP. Los valores representan el promedio $\pm$ EE de 7 animales de cada grupo. Significancia estadística * $p < 0.01$ vs. grupo control; ** $p < 0.01$ animales cirróticos vs animales cirróticos tratados con 6-ARP.

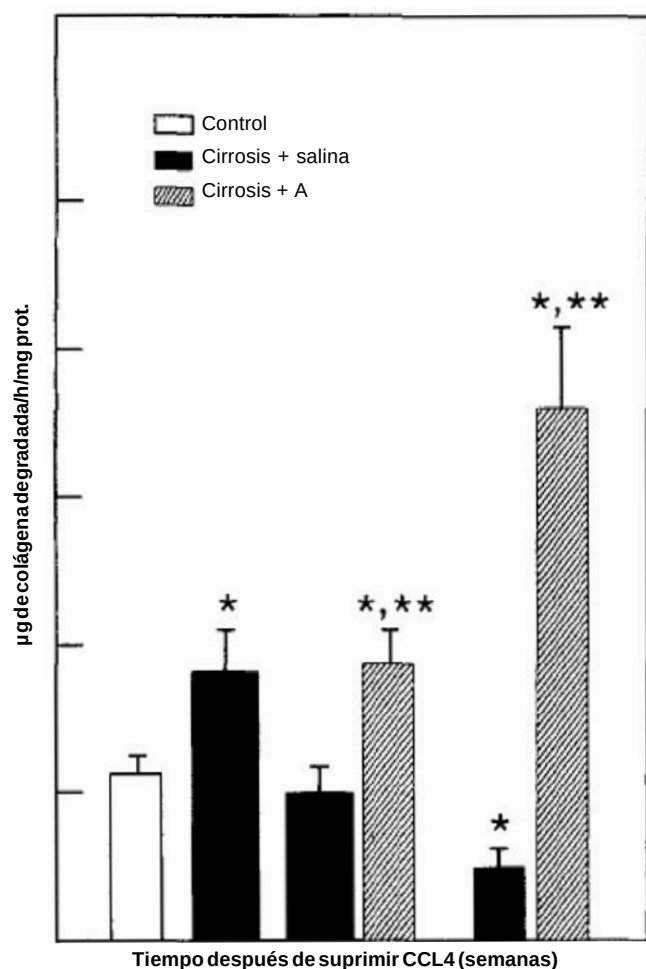


Figura 4. Efecto del tratamiento con 6-ARP en la actividad colagenolítica en el hígado de ratas cirróticas. Los resultados representan el promedio $\pm$ EE de 7 animales por grupo. Significado estadístico como se indica en la figura 2.

dación de esta proteína. Durante 10 semanas de tratamiento con CCl₄ y el desarrollo del proceso criogénico, la síntesis de la colágena aumentó en cuatro veces (no se muestra). Al evolucionar el proceso cirrótico en ausencia del inductor y compararlo con los animales cirróticos que fueron tratados con 6-ARP, no se detectaron diferencias significativas (no se muestra) que sugieran que la disminución de la colágena se explica por un aumento en su degradación. La actividad colagenolítica se muestra en la figura 4. Sin tratamiento de la cirrosis, se observa una importante disminución de la actividad colagenolítica mientras se nota un incremento de dos a cuatro veces después de 5 y 10 semanas de tratamiento con adenosina respectivamente.

Las proteinasas que degradan la MEC pertenecen a la familia de las metaloproteinasas, que se caracterizan por tener un átomo de zinc en el centro activo de la enzima. Las metaloproteinasas más importantes que participan en la degradación de la MEC del hígado cirrótico son la MMP-13, MMP-2, MMP-1 y sus actividades están moduladas por la

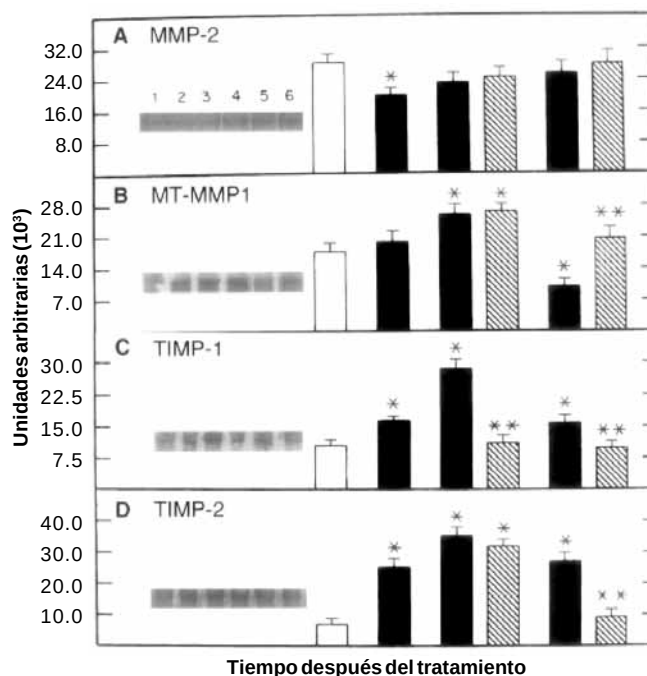


Figura 5. Efecto del tratamiento con 6-ARP en los niveles titulares de metaloproteinasas y de sus inhibidores tisulares (MMP-2, MMP-1, TIMP-1, TIMP-2) en el hígado de ratas cirróticas, estimados por la técnica de Western Blot. Las ratas cirróticas fueron tratadas con salina y tratadas con 6-ARP. Los valores representan el promedio $\pm$ EE de 5 animales por grupo. Significado estadístico como se indica en la figura 2.

presencia de inhibidores tisulares específicos llamados TIMP-1 y TIMP-2, del inglés tissue inhibitor of metalloproteinases. En la figura 5, se muestra la expresión de las metaloproteinasas y de sus inhibidores. Con el tratamiento con el nucleósido no se notan cambios significativos en la expresión de MMP-2 pero sí en la expresión de MMP-1 a las 10 semanas de tratamiento y en las expresiones de TIMP-1 y TIMP-2, lo cual nos indica que el incremento en la actividad colagenolítica se explica por la disminución de los inhibidores específicos. Los resultados sugieren que, a través de estos efectos, es la manera de recuperar la actividad colagenolítica disminuida en el hígado cirrótico.

En forma simultánea con esta recuperación estructural, con la cuantificación de los niveles de albúmina, bilirrubina y transaminasas, es manifiesta una clara recuperación de la función hepática (Cuadro I) y, a partir de las 5 semanas del tratamiento, se observa una evidente normalización de los valores. Estos resultados sugieren que hay recuperación integral de la estructura y de la función del tejido hepático después de un tratamiento con 6-ARP. Sin embargo, una de las características muy importante del hígado es su propia capacidad de regeneración.

Esta capacidad se evaluó midiendo el índice mitótico y la actividad de la timidina cinasa (Tk) que es una enzima limitante de la biosíntesis de ADN; los resultados se presentan en la figura 6. El hígado de las ratas controles es un tejido

Cuadro I. Efecto del tratamiento con adenosina en parámetros séricos indicadores de la función hepática

Tratamiento	ALT (IU/L)	Albúmina (g/dL)	Bilirrubina (mg/dL)
Control (5 a 10)	53 ± 3	4.4 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Cirrosis + salina			
Tiempo 0	238 ± 35*	1.6 ± 0.1*	1.6 ± 0.2*
Después de 5 semanas	277 ± 45*	3.4 ± 0.3*	1.3 ± 0.2*
Después de 10 semanas	65 ± 8	3.5 ± 0.3*	0.76 ± 0.1
Cirrosis + adenosina			
Después de 5 semanas	86 ± 9**	4.5 ± 0.2**	0.7 ± 0.1**
Después de 10 semanas	42.5 ± 5**	4.1 ± 0.2	0.6 ± 0.1

ALT = transaminasa de alanina; los resultados expresan el promedio ± ES de 7 determinaciones individuales.

* grupo control (p < 0.01) ** contra grupo cirrótico + salina (p < 0.01).

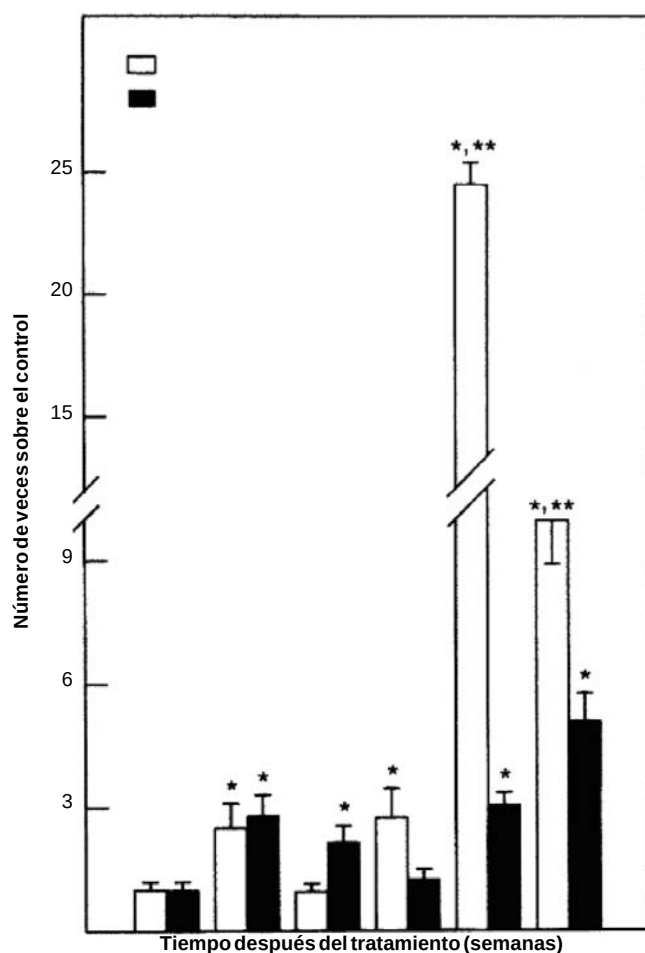


Figura 6. Efecto de 6-ARP en la actividad proliferativa de ratas cirróticas, evaluada por el índice mitótico (promedio de la actividad de timidina quinasa en citosol hepático). Los valores representan el promedio ± EE de veces sobre el control (Valor control 0.22 ± nmols de [3H]- TMP/h/mg proteína) de 6 experimentos por grupo. Significado estadístico como se indica en la figura 2.

quiescente que induce su capacidad regenerativa al verse dañado; el daño inducido durante el proceso cirrótico promueve una capacidad regenerativa pobre que disminuyó aun más a lo largo de las 5 o 10 semanas de evolución. En forma sorprendente, el tratamiento con el nucleósido aumentó de manera importante el índice mitótico y la actividad de la Tk.

En conclusión, constatamos, en nuestro modelo de cirrosis experimental, que la administración del nucleósido 6-ARP o su derivado IFC-305 revierte la cirrosis y la disfunción hepática consecuente, reestableciendo el potencial proliferativo del hígado. Estos hallazgos nos ofrecen un potencial terapéutico importante en pacientes con cirrosis.

Los resultados de estos estudios señalan que el compuesto se metaboliza activamente en el hígado y no muestra toxicidad ni efectos colaterales a la dosis y vía de administración usadas. Su administración favorece la recuperación de la función hepática y la disminución de las reacciones adversas de la enfermedad, evita su progresión e induce una reestructuración lenta pero progresiva de la arquitectura del tejido hepático.

Perspectivas

Los caminos por seguir son los siguientes:

1. Continuar con la investigación básica para ahondar en el conocimiento los mecanismos que se desencadenan durante el proceso cirrótico y para saber cuales se ven modificados por la administración del compuesto ya que por la heterogeneidad del tejido hepático y la complejidad de esta patología, estos mecanismos son difíciles de conocer. Los resultados pueden ser muy interesantes al aportar información sobre los procesos genéticos y moleculares que desencadenan esta patología y la forma de revertirlos, abriendo la oportunidad de mejorar el presente y de diseñar nuevos fármacos más eficaces.
2. Buscar la posibilidad de aplicación de este hallazgo en

el tratamiento de la cirrosis. Esta posibilidad implica una serie de estudios farmacológicos de toxicidad en diversas especies animales y en humanos en relación con vías de administración, dosis, acción del compuesto en el órgano blanco (en este caso en el hígado), efectos colaterales, etc.

3. Tener un proyecto clínico piloto autorizado por la Secretaría de Salud y el Comité de Ética en pacientes cirróticos.
4. Realizar un desarrollo farmacéutico con algún laboratorio interesado en el fármaco. En este caso la empresa Probiomed está interesada en participar en este desarrollo, terminando los estudios y pruebas clínicas y realizando las pruebas de estabilidad médica necesarias para realizar los trámites en la Secretaría de Salud.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo en la investigación del Instituto de Fisiología Celular UNAM con la participación de la Biol. Susana Vidrio, la QFB Lucía Yáñez, M en C Lidia Martínez; el Sr. Juan Manuel Barbosa (Unidad de Computo), y el M en C Rodolfo Paredes (Unidad de Microscopia) así como del Instituto de Cardiología Ignacio Chávez con el Dr. Alberto Aranda y la Dra. María Lilia Loreda. Agradecemos también el apoyo secretarial de la señorita Rosario Villaseñor Ávila; el apoyo clínico del Dr. Norberto García García; y el apoyo financiero de DGAPA (IN206195, IN2123997, IN226199) y de CONACYT 41433-0. También agradecemos a Corporativa de Fundaciones, A.C., a Laboratorios Sophia, al Ing. Jaime Uribe, Director General de Probiomed y al Dr. Carlos Robles, Director de Planeación de Probiomed.

Referencias

1. **Laennec R.** Traité de l'auscultation médicale. Chaude, Paris, France, 1826, pp 196.
2. **Conn HO, Atterbury CE.** Cirrhosis. En: Diseases of the liver. Schiff L, Schiff ER (Eds.). 7a. Edición, Philadelphia, EUA, 1993, pp 815-934.
3. **Anthony PP, Ishak KG, Nayac NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH.** The morphology of cirrhosis: Definition, nomenclature and classification. Bull World Health Organ 1977;55:521.
4. **Pineda-Corona BE.** Epidemiología de la hepatopatía alcohólica. En: Enfermedad hepática por Alcohol. Encuesta Nacional de Adicciones 1993, pp 1-5.
5. **Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seff LB.** Diagnosis and monitoring of hepatic injury. 1. Performance characteristics of laboratory tests. Clin Chem 2000 46:2027-2049.
6. **Crawford JM.** Liver cirrosis. En: Pathology of the liver. Burt AD, Portmann BC, et al. (Eds.) Mac Sween R.N.M. Churchill Livingstone, Edinburgh 2002, pp 576-577.
7. **Rappaport AM, Wanless IR.** Physioanatomic Considerations. En: Diseases of the liver. Schiff L, Schiff ER (Eds.). Lippincott Company, 7a. Edición, Philadelphia, EUA, 1993.
8. **Rescan PY, Loreal O, Hassell JR, Yamada Y, Guillozo A, Clement B.** Distribution and origin of the basement membrane component perlecan in rat liver and primary hepatocytes culture. Am J Pathol 1993;142:199-208.
9. **Roskams T, Rosenbaum J, De Vos R, David G, Desmet V.** Heparan sulfate proteoglycan expression in chronic cholestatic human liver disease. Hepatology 1992; 24:524-532.
10. **Rojkind M, Rojkind MH, Cordero-Hernández J.** In vivo collagen synthesis and deposition in fibrotic and regeneration rat livers. Collagen Rel Res 1983;3:335-347.
11. **Rojkind M, Mourelle M.** The liver is a Bioecological System: Modifications during Regeneration and Repair. En: Collagen Vol. II. Nimni ME (Eds) CRC Press Inc. Florida, EUA, 1988.
12. **Chagoya V.** Interrelaciones metabólicas entre tejidos. En: Bioquímica. Herrera E (Eds.) Emalsa S.A. 1986, pp 1183-1194.
13. **Rockey DC.** Pathophysiology of Liver Disease. Clinics in Liver Disease 2000;4:1-36.
14. **Martínez-Hernández A, Amenta PS.** The extracellular matrix in hepatic regeneration. FASEB J 1995;9:1401-1410.
15. **Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L.** Collagen types in normal and cirrhotic liver. Gastroenterology 1979;76:710-719.
16. **Gressner AM, Bachem MG.** Molecular mechanism of fibrogenesis – a homage to the role of activated fat-storing cells. Digestion 1995;56:335-346.
17. **Jezequel AM, Ballardini G, Mancini CH, Paolucci F, Bianchi FB, Orlandi F.** Modulation of extracellular matrix components during dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. J Hepatol 1990;11:206-214.
18. **Maher JJ, McGuire RF.** Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. J Clin Invest 1990;86:1641-1648.
19. **Van Eyken P, Geerts A, De Bleser P, Lazou JM, Vrijzen R, Sciort R, et al.** Localization and cellular sources of the extracellular matrix proteins tenascin in normal and fibrotic rat liver. Hepatology 1992;15:909-916.
20. **Wyler DJ, Stadelcker MJ, Dinarello CH, O'Dea JF.** Fibroblast stimulation in Schistosomiasis. Egg Granuloma macrophages spontaneously secrete a fibroblast stimulating factor. J Immunol 1984;132:3142-3148.
21. **Wyler DJ, Wahl SM, Wahl LM.** Hepatic fibrosis and schistosomiasis egg granulomas secrete fibroblast stimulating factor in vitro. Science 1978;202:438-440.
22. **Arthur MJP.** Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000;279:G245-G249.
23. **Rojkind M, Greenwel P.** Pathophysiology of liver fibrosis. En: Oxford Textbook of Clinical Hepatology. McIntyre N, Benhamou JP, Burcher J, Rizzeto M, Rode J (Eds.) Oxford Medical Publication. New York, EUA, 1991, pp 375-380.
24. **Chojkier M, Brenner DA.** Therapeutic strategies for hepatic fibrosis. Hepatology 1988;8:176-182.
25. **Chagoya-de Sánchez V, Brunner A, Piña E.** In vivo modification of the energy charge in the liver cells. Biochem Biophys Res Commun 1972;46: 1441-1445.
26. **García-Sainz JA, Hernández-Muñoz R, Santamaría A, Chagoya-de Sánchez V.** Mechanism of the fatty liver induced by cycloheximide and its reversibility by adenosine. Biochem Pharmacol 1979;28:1409-1413.
27. **Hernández-Muñoz R, Santamaría A, García-Sainz JA, Piña E, Chagoya-de Sánchez V.** On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. Arch Biochem Pharmacol 1978;190:155-162.
28. **García-Sainz JA, Hernández-Muñoz R, Glender W, Piña E, Chagoya-de Sánchez V.** Effects of adenosine in ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox-state, purine and fatty acid metabolism. Biochem Pharmacol 1980;29:1709-1714.
29. **Hernández-Muñoz R, Glender W, Díaz-Muñoz M, García-Sainz JA, Chagoya-de Sánchez V.** Effect of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. Biochem Pharmacol 1984;33:2599-2604.
30. **Chagoya-de Sánchez V, Hernández-Muñoz R, Yañez L, Vidrio S, Díaz-Muñoz M.** Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase. J Biochem Toxicol 1995;10:41-50.
31. **García-Sainz JA, Hernández-Muñoz R, Glender W, Piña E, Chagoya-de Sánchez V.** Effects of adenosine in ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox-state, purine and fatty acid metabolism. Biochem Pharmacol 1980;29:1709-1714.
32. **Hernández-Muñoz R, Glender W, Díaz-Muñoz M, García-Sainz JA, Chagoya-de Sánchez V.** Effect of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. Biochem Pharmacol 1984;33:2599-2604.
33. **Pérez-Tamayo R.** Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄. Hepatology 1983;3:112-120.
34. **Rojkind M, González E.** An improved method for determining specific radioactivities of praline-14C in collagen and noncollagenous proteins. Anal Biochem 1974;57:1-7.
35. **Pérez-Tamayo R, Montfort I, González E.** Collagenolytic activity in experimental cirrosis of the liver. Exp Mol Pathol 1987;47:300-308.
36. **Sauer H, Willmanns W.** Thymidine kinase. En: Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer HU, Bergmeyer J (Eds.) Verlag Chemie. Deefield Beach, Florida, EUA, 1983. pp 468-473.

III. Diseño, síntesis y estudio de un compuesto con posible actividad tripanosomicida

Charmina Aguirre-Alvarado,^a Fabiola Zaragoza-Martínez,^b Lorena Rodríguez-Páez,^a Benjamín Noguera-Torres,^b Isabel Baeza-Ramírez^a y Carlos Wong-Ramírez^{a*}

^aDepartamentos de Bioquímica y ^b Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, INP, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 20 de abril de 2006

Aceptado: 23 de junio de 2006

RESUMEN

En el simposio sobre "Desarrollo de nuevos fármacos en México", hicimos un resumen de los trabajos que nos han permitido desarrollar compuestos con posible actividad tripanosomicida. Se describió el estado actual de la enfermedad de Chagas y la ineficiencia de los fármacos empleados para su tratamiento.

La estrategia que se siguió para desarrollar un compuesto con actividad tripanosomicida fue la siguiente: se utilizó como enzima blanco la α -hidroxideshidrogenasa isoenzima II de *T. cruzi* para tratar de inhibir el metabolismo energético de este parásito. Se diseñó y sintetizó el compuesto y se determinó su actividad biológica; el ácido *N*-isopropil oxámico resultó ser un inhibidor selectivo de esta enzima y presentó, además, actividad tripanosomicida en cultivos de epimastigotes, tripomastigotes circulantes y amastigotes en tejido. Los estudios preliminares muestran el efecto tripanosomicida del éster etílico del *N*-isopropil oxámico sobre los amastigotes intracelulares. Este compuesto reduce en un 60 a 80% el número de nidos de amastigotes en músculos cardíaco y esquelético, mientras que el nifurtimox, uno de los fármacos empleado actualmente para el tratamiento de esta enfermedad, produce una disminución de 20 a 30%, lo cual concuerda con lo que se informa en relación con el poco efecto de este fármaco en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave:

Enfermedad de Chagas, fármacos tripanosomicidas

SUMMARY

During the symposium "Design of new drugs in Mexico", we presented a summary of the research that led us to develop substances with trypanocidal activity. The epidemiological pattern of Chagas' disease was briefly described as well as the factor that explains the low cure rate seen among chagasic patients.

The strategy used to develop a new compound with trypanocidal activity was the following: we used *T. cruzi* α -hydroxyacid dehydrogenase isoenzyme II, as a target enzyme, trying to inhibit the energetic metabolism of this parasite. *N*-isopropyl oxamic acid the substance we designed was synthesized and its biological activity was determined. It is a selective inhibitor of this enzyme and in addition, showed trypanocidal activity on cultured epimastigotes, circulating trypomastigotes and intracellular amastigotes. Preliminary studies show the trypanocidal effect of the ethyl ester of *N*-isopropyl oxamic acid on intracellular amastigotes. This compound reduced by 60-80% the number of amastigotes nests on both cardiac and skeletal muscle, whereas Nifurtimox, the currently drug used for treatment of this disease, produced a reduction on amastigotes nests of 20-30%, in agreement with previous reports describing the low trypanocidal effect of this compound, in chronic stages of Chagas' disease

Keywords:

Chagas' disease, trypanocidal drugs

Introducción

La enfermedad de Chagas, llamada así después de que el médico brasileño Carlos Chagas la describió en 1909, existe sólo en el continente americano, desde México hasta el sur de Argentina. Afecta entre 16 y 18 millones de personas; 20,000 de ellas mueren anualmente y alrededor de 100 millones más (25% de la población de América latina) están en riesgo de adquirir esta enfermedad; dicho riesgo está en relación directa con la pobreza.^{1,2}

La enfermedad de Chagas es causada por el Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), un parásito protozoario flagelado que es

transmitido a los humanos en un 80% por un vector, un insecto hematófago de la familia Triatominae que se conoce comúnmente como chinche hemicón y en un 20% por transfusión de sangre contaminada o por vía congénita. Los humanos y un gran número de especies animales, tanto domésticas como salvajes, constituyen los reservorios naturales de *T. cruzi*.^{1,2}

En humanos, la enfermedad presenta dos etapas, una aguda que aparece poco tiempo después de la infección y la otra crónica que aparece después de un periodo silencioso o asintomático que puede durar varios años. Las lesiones de la fase crónica afectan irreversiblemente órganos internos como el corazón, el esófago, el colon y el sistema nervioso perifé-

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Carlos Wong-Ramírez. Departamento de Bioquímica, ENCB-IPN, Apartado postal 4-129, 06401 México D.F., México. Correo electrónico: cwong@encb.ipn.mx.

rico. Después del periodo asintomático, un 27% de los individuos infectados desarrollan síntomas cardíacos que los pueden conducir a una muerte súbita, un 6% trastornos digestivos, principalmente megavisceras y un 3% trastornos del sistema nervioso periférico.^{1,2}

Quimioterapia

La enfermedad de Chagas sigue siendo el mayor problema de salud en varios de los países de Latinoamérica; en efecto, los pacientes con la enfermedad crónica severa empeoran progresivamente y con frecuencia mueren debido a un fallo cardíaco. Hasta hoy no existe ningún tratamiento completamente efectivo para esta enfermedad,³ por lo que permanece prácticamente incurable. Aunado a esto, existe poco interés de la industria farmacéutica para desarrollar nuevos fármacos antichagásicos.⁴ El benznidazol (Bz) y el nifurtimox (Nf) son los fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, son efectivos durante la fase aguda pero casi no tienen efecto durante la fase crónica. Además, la existencia de cepas de *T. cruzi* resistentes a estos fármacos explica el bajo índice de curación en los pacientes chagásicos. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas está plenamente justificada.

Metabolismo energético del *Tripanosoma cruzi*

Los tripanosomas que se encuentran en la circulación san-

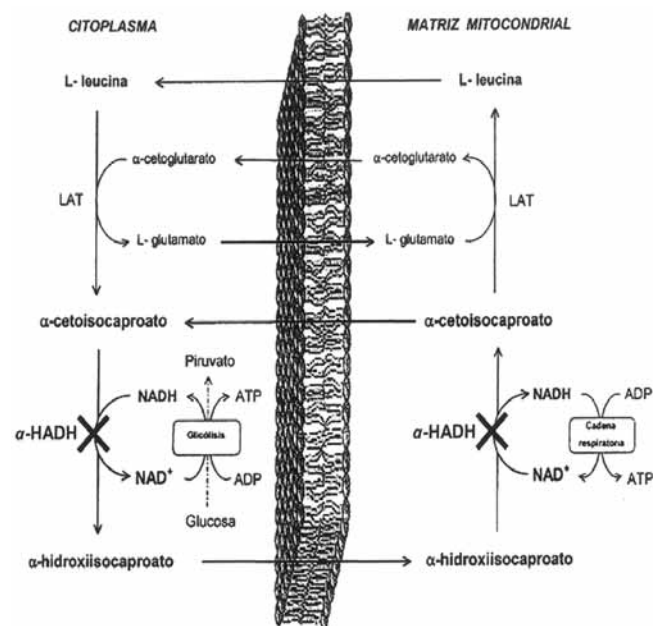


Figura 1. Esquema del metabolismo energético de *Tripanosoma cruzi* e inhibición de la α -hidroxiácido deshidrogenasa isoenzima II (HADH).

guínea (tripomastigotes) utilizan solamente glicólisis para generar la energía que requieren para su motilidad y sobrevivencia,⁵ por lo que esta vía metabólica se ha visto como un blanco prometedor para el diseño de nuevos fármacos con actividad tripanosomicida.^{6,7} Se argumenta que aquellos compuestos capaces de inhibir esta vía metabólica deben lograr una disminución de la motilidad y la muerte del parásito.

T. cruzi posee una enzima llamada α -hidroxiácido deshidrogenasa (HADH) con dos formas moleculares (HADH-isoenzima I y HADH-isoenzima II) que se han purificado y caracterizado con base en su especificidad de sustratos y sus constantes cinéticas.⁸ La isoenzima I es responsable de la poca actividad del lactado deshidrogenasa que se encuentra en extractos de *T. cruzi*,⁹ mientras que la isoenzima II no presenta actividad sobre el piruvato⁹ pero es activa sobre una amplia gama de sustratos, tanto lineales como ramificados. El ácido α -ceto-isocaproico es el sustrato sobre el cuál presenta su máxima actividad.⁸ Se ha demostrado que la HADH-isoenzima II participa en un sistema de lanzadera que le permite a *T. cruzi* transferir los equivalentes reductores (NADH) del citoplasma al interior de la mitocondria,¹⁰ en donde son oxidados en la cadena respiratoria. Además, la HADH isoenzima II participa en la reoxidación del NADH que se genera en la glicólisis (Figura 1).

Diseño de un inhibidor de la α -HADH-isoenzima II de *Tripanosoma cruzi*

Como ya se mencionó, la glicólisis es la principal ruta metabólica que emplea este parásito, por lo que la inhibición de la isoenzima II podría conducir a una disminución de su motilidad y sobrevivencia.^{11,12}

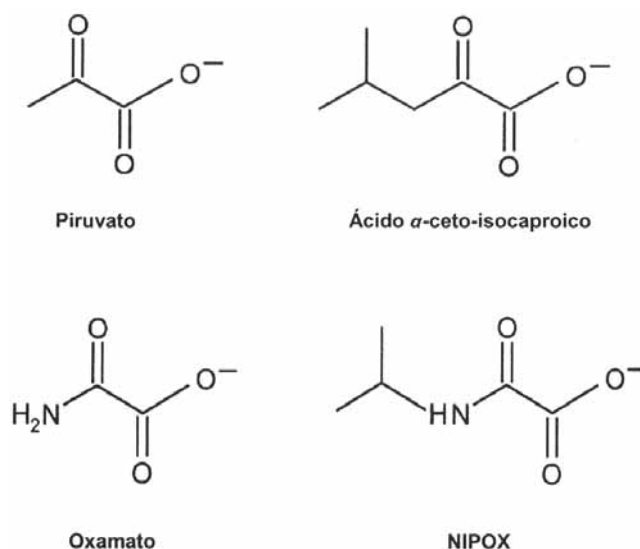


Figura 2. Relación química y estructural entre el piruvato y el ácido α -ceto-isocaproico, sustratos de la α -hidroxiácido deshidrogenasa y los inhibidores oxamato y NIPOX.

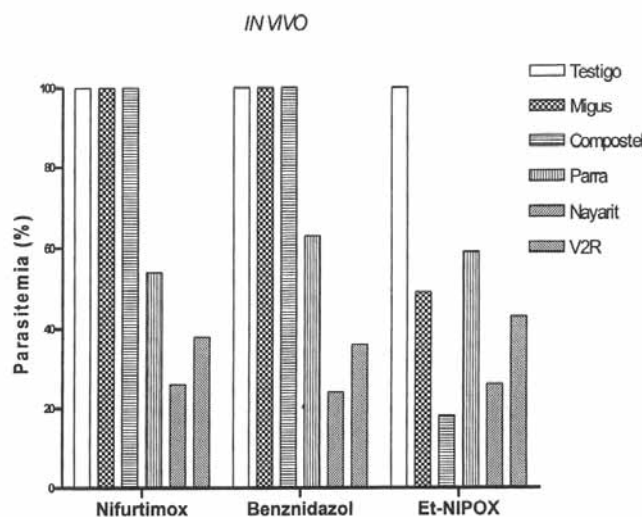


Figura 3. Efecto del nifurtimox (Nf), del benznidazol (Bz) y del éster etílico del NIPOX sobre la parasitemia inducida en ratones con diferentes cepas de *T. cruzi*. En el pico máximo de la parasitemia, se administró una sola dosis de fármaco de 500 mg/kg por vía oral y la parasitemia se determinó a las 6 horas de acuerdo con el método propuesto por Filardi y Brener.¹⁸ Tomado de (17).

De acuerdo con lo anterior, diseñamos un compuesto, posible inhibidor de la HADH-isoenzima II de *T. cruzi*, el ácido N-isopropil oxámico (NIPOX),¹² un análogo estructural del ácido α -ceto-isocaproico. Con base en la similitud estructural de estos dos compuestos (Figura 2), supusimos que el N-isopropil oxamato cumpliría con los requerimientos estéricos y estructurales para comportarse como un inhibidor competitivo y selectivo de la HADH-isoenzima II.¹² Se procedió a la síntesis y la caracterización del NIPOX,¹² el cual resultó ser un excelente inhibidor competitivo y selectivo de la HADH-isoenzima II (Figura 3), pues no tiene efecto sobre otras deshidrogenadas.¹² Los estudios cinéticos mostraron además que la introducción de isopropilo, una cadena hidrocarbonada no polar, en el nitrógeno del oxamato incrementa significativamente la afinidad del NIPOX sobre el sitio activo de la HADH-isoenzima II.¹²

Mecanismo de acción del éster etílico del NIPOX

También se investigó la actividad tripanosomicida del NIPOX, para lo cual hicimos ensayos en cultivos de epimastigotes. Sorprendentemente no detectamos actividad tripanosomicida con el NIPOX, más bien la encontramos con el Nf y el Bz cuyo efecto tripanosomicida fue evidente.¹² Supusimos entonces que el NIPOX no llegaba al interior del parásito por la carga negativa que presenta su grupo carboxilato a pH fisiológico, ya que los compuestos polares difícilmente atraviesan las membranas biológicas por difusión simple. Para reducir la polaridad de este inhibidor, se sintetizó el éster etílico del NIPOX (Et-NIPOX),¹² para transformar un compuesto polar

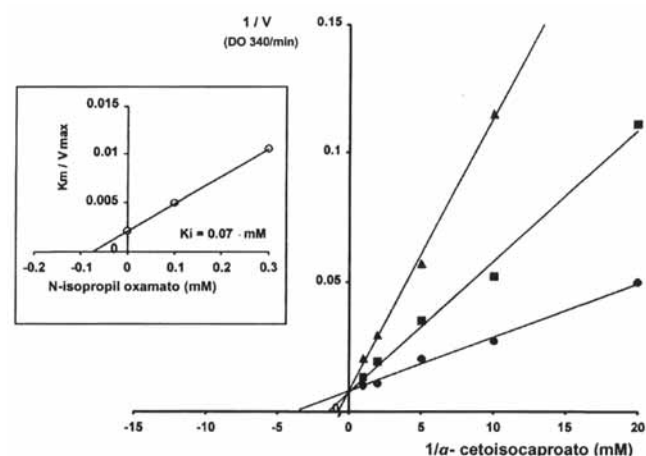


Figura 4. Efecto del N-isopropil oxamato sobre la HADH-isoenzima II con un homogeneizado de la cepa NINOA de *T. cruzi* y el ácido α -ceto-isocaproico como sustrato. La concentración de sustrato usada fue 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mM; la concentración de NADH se mantuvo constante en 0.12mM. Ensayos sin (●) y con (■) 0.1 mM o (▲) 0.3mM NIPOX en la mezcla de reacción. La K_m para el ácido α -ceto-isocaproico fue 0.3mM. La K_i se muestra en el recuadro en la parte superior izquierda y se determinó en la gráfica de los valores de las pendientes contra la concentración del inhibidor. Tomado de (16).

en un hidrofóbico que tiene afinidad por las membranas y que las puede atravesar fácilmente por difusión simple. Con este nuevo compuesto, se observó un efecto tripanosomicida mayor que el obtenido con el Nf y Bz;¹² este efecto se debe a que el Et-NIPOX es hidrolizado por las esterasas inespecíficas que posee *T. cruzi*^{13,14} y da lugar a la producción *in situ* del NIPOX, el cual inhibe a la HADH-isoenzima II de este parásito, con la consecuente inhibición de su metabolismo energético y reducción de su motilidad y sobrevivencia (Figura 1).¹⁴

Efecto del éster etílico del NIPOX sobre la parasitemia

La poca eficacia del Nf y el Bz se debe a que hay cepas resistentes a estos fármacos, por lo que era importante probar el Et-NIPOX, tanto en cepas resistentes como en cepas sensibles a estos fármacos. Así probamos también el efecto de este nuevo compuesto sobre la parasitemia en ratones, inducida por cinco diferentes cepas de *T. cruzi*. En el pico máximo de la parasitemia, se aplicó una sola dosis de 500 mg/kg por vía oral y se determinó la disminución de la parasitemia a las 6 horas. El Et-NIPOX mostró un buen efecto tripanosomicida *in vivo* ya que disminuyó significativamente la parasitemia en las cinco cepas de *T. cruzi* que se estudiaron, mientras que el Nf y el Bz redujeron la parasitemia sólo en tres de estas cinco cepas.¹⁴ Cabe señalar que en una de las cepas (Compostela), la cual fue resistente a Nf y Bz, la parasitemia promedio de 2.5 millones de tripomastigotes/mL se redujo, con una sola dosis del éster etílico del NIPOX, en un

80% en tan solo 6 horas (Figura 4). Esto sugiere que el Et-NIPOX podría tener un buen efecto tripanosomicida en la fase aguda de la enfermedad de Chagas; es durante esta fase que la parasitemia está en su nivel máximo.

Efecto del éster etílico del NIPOX sobre amastigotes intracelulares

En la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, *T. cruzi* se encuentra en los tejidos principalmente en forma de amastigotes intracelulares (fase replicativa de este parásito) y esto es lo que produce las lesiones irreversibles en órganos internos como el corazón etc., lo que a menudo conduce a una muerte súbita debido a un fallo cardíaco.^{1,2}

Por lo anterior, era de vital importancia determinar si el Et-NIPOX podría tener efecto tripanosomicida sobre estos amastigotes intracelulares. Para lograr esto se utilizó un modelo experimental en ratones en los cuales, a los 50 días de parasitados, se alcanzó un máximo de nidos de amastigotes intracelulares sin parasitemia prácticamente. Estudios preliminares muestran que el éster etílico del NIPOX disminuye en un 60 a 80% los amastigotes intracelulares, tanto en el músculo cardíaco como en el esquelético, mientras que el Nf, que se emplea como control positivo, reduce los nidos de amastigotes sólo un 20 a 30% (Figura 5).¹⁵ Estos experimentos sugieren que el Et-NIPOX podría tener un buen efecto tripanosomicida en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

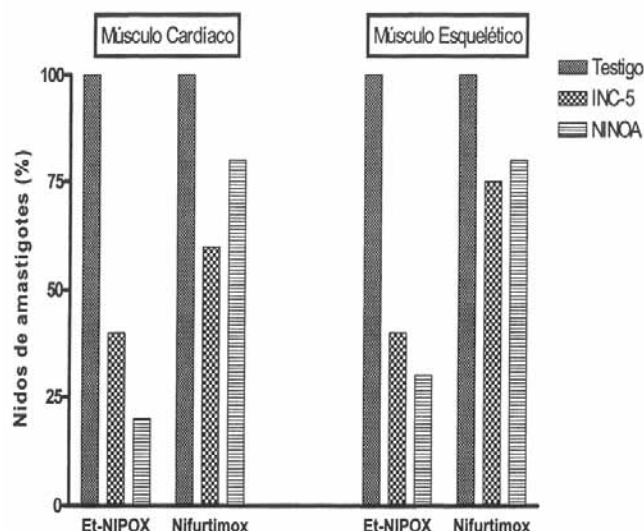


Figura 5. Efecto del nifurtimox Nf y del éster etílico del NIPOX sobre nidos de amastigotes de dos cepas de *T. cruzi*. El tratamiento fue de 10 mg/kg/día por vía oral durante 50 días. Se sacrificaron los ratones y se buscaron nidos de amastigotes en los músculos cardíaco y esquelético. Tomado de (15).

Discusión

Como la glicólisis proporciona virtualmente toda la energía para los tripomastigotes circulantes, las enzimas que participan en la glicólisis o en su regulación han sido propuestas como blancos bioquímicos para el diseño de fármacos con actividad tripanosomicida.^{6,7} De acuerdo con lo anterior se diseñó, sintetizó y caracterizó el ácido N-isopropil oxámico (NIPOX) como posible inhibidor de la α -hidroxiácido deshidrogenada (HADH) isoenzima II de *T. cruzi*,^{12,14} ya que esta enzima está involucrada en el metabolismo energético del parásito. Esta sustancia demostró ser un excelente inhibidor competitivo y selectivo de la HADH-isoenzima II,¹² pero no mostró ningún efecto tripanosomicida. Supusimos que la polaridad de esta sustancia le impedía penetrar al interior de este parásito. Para reducir esta polaridad se sintetizó el Et-NIPOX con el cual si se obtuvo la actividad tripanosomicida esperada.^{12,14} Esto se debe a que dicho compuesto por ser una sustancia no polar (hidrofóbica) penetra con mayor facilidad al interior de *T. cruzi*; su eficiente hidrólisis dentro del parásito genera el NIPOX,¹⁴ el cual inhibe la HADH-isoenzima II de *T. cruzi* y el metabolismo energético de este parásito con una consecuente disminución de su motilidad y sobrevivencia.^{12,14}

Estos experimentos muestran claramente que la elección de la HADH-isoenzima II como blanco bioquímico para tratar de obtener sustancias con actividad tripanosomicida fue acertada ya que el Et-NIPOX mostró un notable efecto tripanosomicida tanto en epimastigotes en cultivo como en tripomastigotes sanguíneos^{12,14} y amastigotes intracelulares;¹⁵ estos últimos son los responsables de las lesiones irreversibles producidas principalmente en corazón, las cuales conducen a la muerte de los pacientes. Además el Et-NIPOX mostró mejor efecto tripanosomicida que el Nifurtimox y el Benznidazol, mostrando incluso efecto en cepas de *T. cruzi*; resistentes a estos fármacos.^{12,14}

Estos hallazgos sugieren que el Et-NIPOX podría tener un buen efecto tripanosomicida tanto en la fase aguda, caracterizada por abundantes tripomastigotes circulantes, como en la fase crónica de la enfermedad de Chagas cuando la mayoría de los parásitos se encuentran en los tejidos.

Referencias

1. World Health Organization. Chagas disease special program for research and training in tropical diseases. 1993, pp 67-75.
2. World Health Organization. Control of Chagas disease. Tech Rep Ser. 2002;905:1-109.
3. Urbina JA. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:349-355.
4. Coura RJ, De Castro S. A critical review on Chagas disease. Chemotherapy 2002;97:3-24.
5. Oppenheimer FR. Biochemical peculiarities of trypanosomes, African and South American. Br Med Bull 1985;41:130-136.
6. Bakker BM, Westerhoff HV, Oppenheimer FR, Michels PAM. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. Mol Biochem Pharmacol 2000;106:1-10.
7. Verlinde CL, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Perie JJ, Fothergill-Gilmore IA, et al. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. Drug Resist Update 2001;4:130-136.
8. Coronel CE, Roval LE, Gerez-de Burgos NM, Burgos C, Blanco A. Properties of α -hydroxyacid dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1981;4:29-38.

9. **Coronel C, Gerez-de Burgos NM, Burdos C, Blanco A.** Separación y propiedades catalíticas de las isoenzimas de la α -hidroxiácido deshidrogenasa de *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 1980; 40:159-164.
10. **Montamat EE, Arauso SS, Blanco A.** Subcellular localization of leucine aminotransferase and α -hydroxyacid dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1987;22:185-93.
11. **Gerez de Burgos NM, Burgos C, Montamat EE, Rovai LE, Blanco A.** Inhibition by gossypol of oxidoreductases from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol* 1984;33:955-959.
12. **Elizondo S, Chena MA, Rodríguez-Páez L, Noguera B, Baeza I, Wong C.** Inhibition of *Trypanosoma cruzi* α -hydroxyacid dehydrogenase isozyme II by N-isopropyl oxamate and its effect on intact epimastigotes. *J Enz Inhib Med Chem* 2003;18:265-271.
13. **Adunate J, Repeto V, Letelier M, Morillo A.** The carboxyl esterases of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol* 1987;86:67-71.
14. **Chena M, Elizondo S, Rodríguez-Páez L, Noguera B, Baeza I, Wong C.** Trypanocidal activity of N-isopropyl oxamate on culture epimastigotes and murine trypanosomiasis using different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Enz Inhib Med Chem* 2005;20:189-197.
15. **Zaragoza M.** Efecto tripanosomicida de tres ésteres etílicos de oxamatos N-sustituidos, sobre estadios de *Trypanosoma cruzi*, presentes en huésped vertebrado. Tesis de Maestría ENCB-IPN, 2005.
16. **Noguera B.** Desarrollo de inhibidores de oxidoreductasas de *T. cruzi* con posible actividad tripanosomicida. Tesis Doctoral ENCB-IPN, 1995.
17. **Elizondo S.** Estudio de inhibidores de la α hidroxiácido deshidrogenasa de *Trypanosoma cruzi* con posible actividad tripanosomicida. Tesis de Maestría ENCB-IPN, 1999.
18. **Filardi L, Brener Z.** Rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:221-225.

II. Preparación de nuevas fenilamidas anticonvulsionantes

Sergio Enrique Meza-Toledo* y Guillermo Carvajal-Sandoval

Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 20 de abril de 2006

Aceptado: 23 de junio de 2006

RESUMEN

En el presente trabajo se prepararon una serie nueva de fenilamidas anticonvulsionantes conteniendo los grupos trifluorometilo, flúor, bromo y cloro en el anillo aromático de los compuestos DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida (DL-HEPA), DL-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida (DL-HEPP) y DL-4-hidroxi-4-etil-4-fenilbutiramida (DL-HEPB). Los compuestos preparados presentaron una actividad anticonvulsionante bastante significativa contra las convulsiones y la muerte provocadas por el metrazol en ratones. La incorporación de halógenos en el anillo aromático de DL-HEPA, DL-HEPP y DL-HEPB condujo a compuestos con una actividad anticonvulsionante similar a la del fenobarbital. Se presentan evidencias de que las fenilamidas preparadas podrían actuar como antagonistas de los receptores del GABA.

Palabras clave:

Anticonvulsionantes, fenilamidas, antagonistas del GABA

SUMMARY

In this manuscript we describe a novel series of anticonvulsants containing trifluoromethyl, fluorine, bromine and chlorine groups at the phenyl ring of compounds DL-2-hydroxy-2-ethyl-2-phenyl acetamide (DL-HEPA), DL-3-hydroxy-3-ethyl-3-phenyl propionamide (DL-HEPP) and DL-4-hydroxy-4-ethyl-4-phenyl butyramide (DL-HEPB). Synthesized compounds exhibited a significant anticonvulsant activity against seizures and death induced by metrazol in mice. Incorporation of halogens at the phenyl ring of DL-HEPA, DL-HEPP and DL-HEPB lead to compounds with an anticonvulsant activity similar that of phenobarbital. The latter constitutes evidence that prepared phenylamides could act as GABA receptor antagonists.

Keywords:

Anticonvulsants, phenylamides, GABA antagonists

Introducción

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más comunes que afecta el 1 % de la población mundial.¹ A pesar de los antiepilépticos utilizados en clínica, un número significativo de pacientes, entre el 20 y el 30%, se muestra resistente a los antiepilépticos disponibles,² por lo que existe la clara necesidad de desarrollar nuevos medicamentos.

Cuando se produce un desequilibrio entre los dos principales neurotransmisores en el cerebro, el L-glutamato (neurotransmisor excitador) y el ácido gamma-amino butírico (conocido como GABA, que es un neurotransmisor inhibitorio), se originan las convulsiones. Por lo que la estrategia farmacológica en el tratamiento de la epilepsia consiste en utilizar fármacos que reduzcan la excitabilidad neuronal o que potencien los mecanismos inhibitorios mediados principalmente por GABA en el caso de los antiepilépticos de uso clínico como son las benzodiazepinas, el fenobarbital, la tiogabina y el vigabatrin.³

Sin embargo, la teoría del desbalance excitación-inhibición de la epileptogénesis ha sido cuestionada por el hallazgo de que el GABA no siempre inhibe la actividad neural. Si bien, en el cerebro adulto, el GABA induce usualmente

hiperpolarización neuronal, en el cerebro juvenil es despolarizante.^{1,4-8} Asimismo, el incremento de la neurotransmisión GABAérgica de las interneuronas de las regiones tálamo-corticales se ha asociado con las crisis de ausencias que ocurren tanto en personas como en animales.⁷⁻¹³

La serie homóloga de compuestos anticonvulsionantes se desarrolló en México.¹⁴ Los compuestos son el HEPA, el HEPP y el HEPB (Figura 1). Presentan un amplio perfil anticonvulsionante en el caso de convulsiones provocadas por drogas como: el metrazol, la bicuculina, la tiósemicarbazida, por electrochoque y en el caso del kindling.¹⁴⁻¹⁶ El amplio espectro de actividad anticonvulsionante que exhiben el DL-HEPA, el DL-HEPP y el DL-HEPB es similar al del fenobarbital y del valproato. Sus dosis efectivas medias son superiores a las del valproato y de la etosuccimida e inferiores a las de la difenilhidantoina y de las benzodiazepinas, teniendo en relación con éstos la ventaja de su amplitud de espectro antiepiléptico.

Los resultados obtenidos con estos compuestos los hacen candidatos a antiepilépticos mayores.

En otros estudios realizados, el DL-HEPP disminuyó la descarga del foco epiléptico en la fase inicial del síndrome de abstinencia al GABA.¹⁷ Este síndrome era considerado

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Sergio Enrique Meza-Toledo. Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Apartado postal 256, 06400 México D.F. Correo electrónico: semeza@hotmail.com.

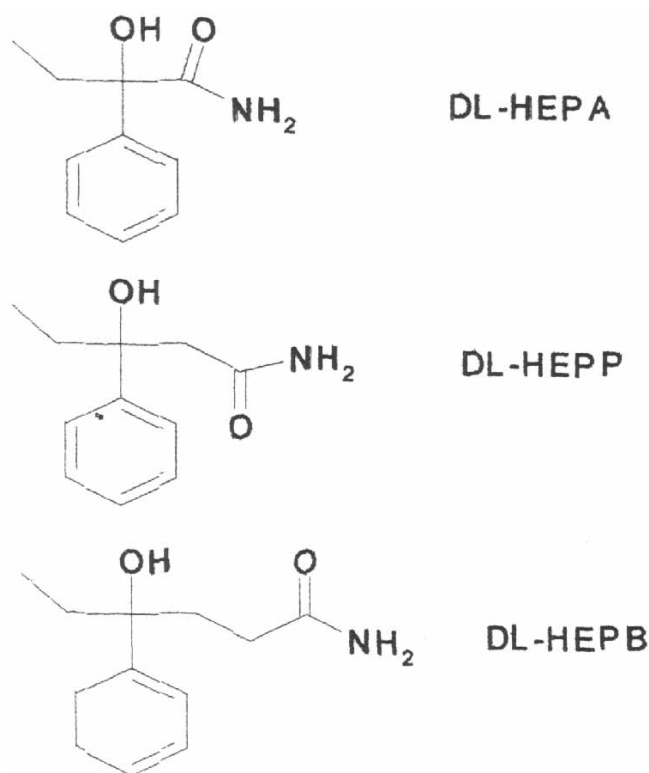


Figura 1. Serie homóloga anticonvulsionante.

como un modelo de epilepsia intratable por su resistencia a la terapéutica con los antiepilépticos clásicos, incluso con el diazepam que se utiliza en el tratamiento del estatus epiléptico y con otros compuestos como el pentobarbital a dosis de anestésico.¹⁷ Adicionalmente, tanto el DL-HEPP como el DL-HEPB incrementan el aprendizaje y la memoria en diferentes modelos animales. Asimismo, el DL-HEPP protegió a una cepa de ratas que presentó un modelo de epilepsia congénita generalizada, tipo ausencias, denominado GAERS.¹⁷

En Francia, Marescaux y Vergnes estudiaron la neuroquímica de los receptores y de los neurotransmisores afectados en el modelo del GAERS. Encontraron que la inyección estereotáxica de R-baclofén en los núcleos talámicos, relevador y reticular, incrementó la duración de las descargas de espiga y de onda registradas.¹⁰ Así mismo la administración estereotáxica de un antagonista del receptor GABA_B como la sal del ácido fosfo-dietoximetil-amino-propilfosfínico, conocida como CGP35348, presentó un efecto antiepiléptico similar al que se obtiene con el DL-HEPP.^{10,17}

Entre los compuestos que potencian la actividad epiléptica en el GAERS se encuentran: 1) algunos agonistas en el receptor GABA_A como el muscimol. 2) los inhibidores de la transaminasa del GABA como el gamma-vinil GABA. 3) los inhibidores de la proteína transportadora del GABA (GAT-1) como el ácido difenil nipecótico. De manera complementaria, los compuestos que presentan actividad antiepiléptica en el GAERS son: 1) los antagonistas del receptor GABA_B, 2) la etosuccimida, la trimetadiona y el clonazepam.^{10,11}

Aunque compuestos diferentes a los señalados arriba reducen la actividad de los ataques espontáneos de ausencia en el GAERS, Marescaux y Vergnes, sugirieron que el receptor GABA_B es el responsable de la génesis del síndrome.^{10,11}

La similitud estructural que presenta el DL-HEPP con los ligandos del receptor GABA_B, principalmente con el antagonista DL-2-hidroxisaclofén, hace pensar que el DL-HEPP y sus homólogos el DL-HEPA y el DL-HEPB podrían probablemente antagonizar las acciones del GABA en los receptores GABA_B.¹⁸ Los estudios para determinar la relación estructura-actividad realizados con una serie de compuestos derivados de R-baclofén y de DL-2-hidroxisaclofén indicaron que la posición de sustitución para de su anillo aromático era crítica para su actividad biológica. La presencia en ella de halógenos como el cloro incrementó la afinidad del receptor GABA_B hacia los ligandos.^{19,20} Considerando la similitud estructural entre el DL-2-hidroxisaclofén y el baclofén y los estudios de relación estructura-actividad, se prepararon una serie de análogos halogenados en la posición 4' del grupo fenilo del HEPA, del HEPP y del HEPB con la idea de aumentar la afinidad del receptor hacia los mismos e incrementar su actividad anticonvulsionante. Asimismo, la presencia de un halógeno en la posición 4' del anillo aromático del DL-HEPP podría bloquear una de las posiciones en su transformación metabólica y conducir a productos con una actividad anticonvulsionante más prolongada.²¹

Material y métodos

Síntesis de las DL-hidroxifenil amidas^{14,18,21,22}

La serie DL-hidroxifenil butiramidas (serie DL-HEPA) se preparó haciendo reaccionar una cetona con cianuro de trimetilsilil para formar las cianhidrinas correspondientes, las cuales mediante una hidrólisis parcial en medio ácido produjeron las amidas respectivas. La serie DL-hidroxifenil pentanamidas (serie DL-HEPP) se preparó mediante una condensación entre una cetona con bromoacetato de etilo para formar los hidroxiésteres correspondientes, los cuales al tratarse con amoníaco produjeron las amidas esperadas. La serie DL-hidroxifenil hexanamidas (serie DL-HEPB) se sintetizó mediante una condensación de Stobbe entre una cetona con el succinato de dietilo en presencia de hidruro de sodio. El tratamiento de los hemiésteres formados en medio ácido condujo a las lactonas esperadas, las cuales al tratarse con amoníaco produjeron las amidas respectivas.

Los compuestos sintetizados se caracterizaron mediante espectrofotometría infrarroja y resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono 13.

Actividad anticonvulsionante^{14,22}

La evaluación de la actividad anticonvulsionante se realizó en ratones albino macho, cepa CF-1 de 17 a 25 g de peso, utilizando metrazol como agente convulsionante a una dosis de 100 mg/kg de peso tal como se publicó previamente. Los compuestos se administraron por vía intraperitoneal. Las

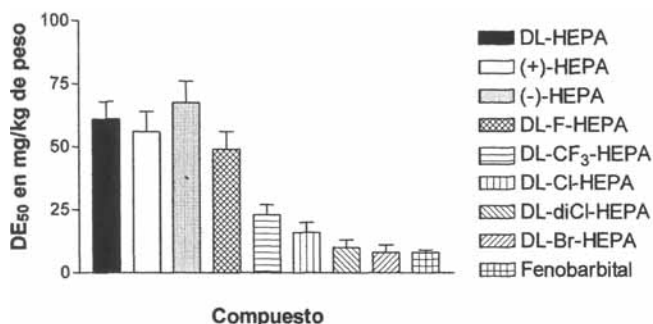


Figura 2. Actividad anticonvulsionante del DL-HEPA y de sus análogos halogenados.

dosis efectivas 50 se determinaron utilizando el análisis probit.²³

Estudios de liberación de [³H]-GABA²⁴

Se estudió la liberación de [³H]-GABA utilizando un método previamente publicado.²³ Se prepararon rebanadas de sustancia nigra (250 μ m x 250 μ m) a partir de ratas Wistar macho (160 a 240 g) que se incubaron en [³H]-GABA (45 nM durante 20 min a 35°C). Luego se lavaron con fluido cerebroespinal artificial (FCA) conteniendo tiogabina (10 μ M), ácido aminoacético (50 μ M) y β -alanina (100 μ M) para prevenir la reincorporación y el metabolismo del GABA. Entonces, se perfundieron alícuotas de 150 μ l de la suspensión de rebanadas (0.4 ml.min⁻¹, a 35°C, Brandel 2000) durante 36 minutos antes de colectar muestras consecutivas cada 4 minutos. Las rebanadas se estimularon eléctricamente (40 mA, 4 Hz durante 3.5 min) a los 48 minutos (S1) y de nuevo a los 88 minutos (S2) después del inicio de la perfusión. Los ligandos se adicionaron a la solución de perfusión 30 minutos antes de S2. Se determinó el porcentaje de [³H]-GABA liberado con respecto al [³H]-GABA que contenía la rebanada al momento de la estimulación.

En otro experimento realizado, las rebanadas de sustancia nigra conteniendo [³H]-GABA se estimularon durante 2 minutos con FCA conteniendo 15 mmol/l de KCl, 48 minutos después del inicio de la perfusión. Los ligandos se adicionaron a la solución de perfusión 30 minutos antes de la

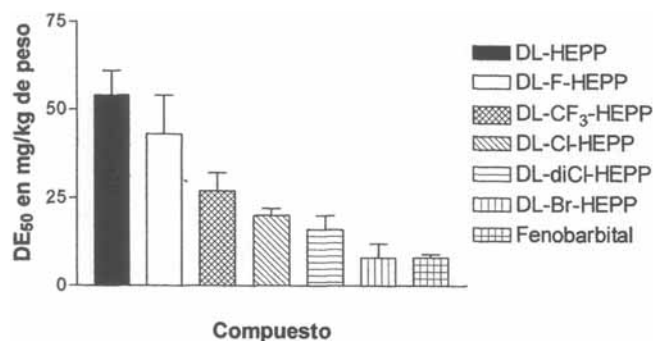


Figura 3. Actividad anticonvulsionante del DL-HEPP y de sus análogos halogenados.

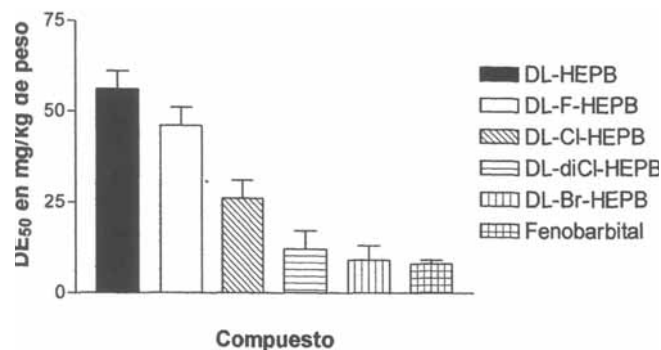


Figura 4. Actividad anticonvulsionante del DL-HEPB y de sus análogos halogenados.

estimulación con KCl. Se determinó el porcentaje de [³H]-GABA liberado con respecto al [³H]-GABA que contenía la rebanada al momento de la estimulación.

Resultados

Para los compuestos preparados, los resultados obtenidos en su caracterización fueron compatibles con sus estructuras propuestas.

Para la serie DL-HEPA, la ausencia de estereoselectividad en la actividad anticonvulsionante de los enantiómeros del DL-HEPA, el (+)-HEPA y el (-)-HEPA, sugiere que la resolución de los racematos no es necesaria para estudios posteriores.²² Las dosis efectivas medias obtenidas para el DL-Cl-HEPA, el DL-diCl-HEPA y el DL-Br-HEPA fueron muy similares a la dosis efectiva media del fenobarbital (Figura 2).

Para las series DL-HEPP y DL-HEPB se aprecia que la incorporación de los grupos trifluorometilo, cloro, dicloro y bromo en el anillo fenilo incrementó en forma significativa la actividad anticonvulsionante, siendo las dosis efectivas medias de éstos últimos similar a la del fenobarbital (Figuras 3 y 4).

El GABA a una concentración de 10 μ M inhibió en un 50% la liberación de GABA tritiado incitada eléctricamente y con KCl con respecto al FCA (control) (Figuras 5 y 6). Por otro lado, el DL-HEPP a una concentración de 100 μ M revirtió el efecto inhibitorio que tiene el GABA sobre su propia liberación.

Discusión

Para las series DL-HEPA, DL-HEPP y DL-HEPB, la incorporación de halógenos en su anillo aromático elevó en forma significativa su actividad anticonvulsionante, lo que indica que el anillo fenilo es importante en el reconocimiento del receptor hacia los compuestos preparados.

Con anterioridad, se sugirió que el DL-HEPA, el DL-HEPP y el DL-HEPB son antagonistas del GABA.¹⁸ En otros estudios realizados, el DL-HEPB, produjo una disminución en la duración de las postdescargas producidas por la estimulación del hipocampo en gatos y, en algunos de ellos, bloqueó su propagación hacia la sustancia nigra y la amígdala.²⁵ La sustancia nigra es una región del cerebro que está relacio-

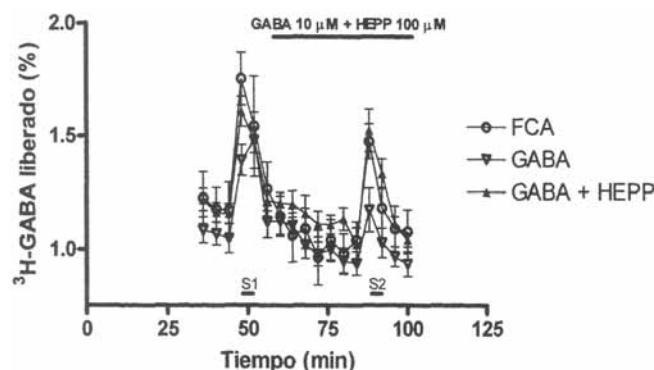


Figura 5. El DL-HEPP revierte la inhibición de la liberación de [3 H]-GABA producida por el GABA en rebanadas de sustancia nigra estimuladas con KCl. Inicialmente, se perfundieron las rebanadas de sustancia nigra conteniendo [3 H]-GABA con fluido cerebroespinal artificial (FCA). Durante el periodo indicado por la barra horizontal S1, el tejido se estimuló con KCl 15 mM durante 2 minutos. Se colectaron fracciones de perfusión cada 4 minutos. El tejido se estimuló con FCA (control, $n = 11$), con GABA (10 μ M, $n = 6$) o con GABA (10 μ M) más DL-HEPP (100 μ M, $n = 11$). Los compuestos se adicionaron durante el periodo indicado por la barra.

nada con la propagación de las descargas epileptiformes donde el GABA parece tener una participación importante.²⁶ En las terminales presinápticas de la sustancia nigra, encontramos receptores GABA_A y GABA_B que podrían participar en el control de la liberación de GABA.^{27,28} En general, en los mecanismos que modulan la liberación de neurotransmisores hacia el espacio sináptico participan autorreceptores o heterorreceptores. En el primer caso, cuando la concentración de GABA se incrementa en la sinapsis, ésta activa su autorreceptor localizado en la neurona presináptica el cual, a su vez, si es de tipo B, al activarse inhibe la entrada de iones calcio a la terminal lo que reduce la liberación vesicular de GABA. Este mecanismo de retroinhibición permite, en algunas regiones del cerebro regular, las concentraciones sinápticas de GABA.²⁹

La activación de los receptores GABA_B presinápticos se ha relacionado con una inhibición de la liberación de GABA, L-glutamato, serotonina, somatostatina, sustancia P y catecolaminas.²⁹ Si en este sistema se bloquea la señal de activación del receptor presináptico del GABA, se esperaría que la liberación de GABA no se inhibiera ya que el GABA no activaría a su receptor. Esto parece ser una de las acciones que realiza el DL-HEPP. A fin de estudiar lo anterior, se estimularon rebanadas de sustancia nigra de rata ya sea eléctricamente o químicamente (KCl). Como puede apreciarse en las figuras 5 y 6, el DL-HEPP revirtió el efecto inhibitorio del GABA sobre su propia liberación, lo que sugiere que el DL-HEPP podría estar antagonizando las acciones del GABA en sus receptores presinápticos B, A o ambos. El origen de este antagonismo no se ha elucidado claramente y podría asociarse a una acción directa del DL-HEPP en el sitio de unión del GABA en los receptores A o B, o bien el DL-HEPP podría estar actuando como un modulador alostérico negativo de la unión del GABA a sus receptores.

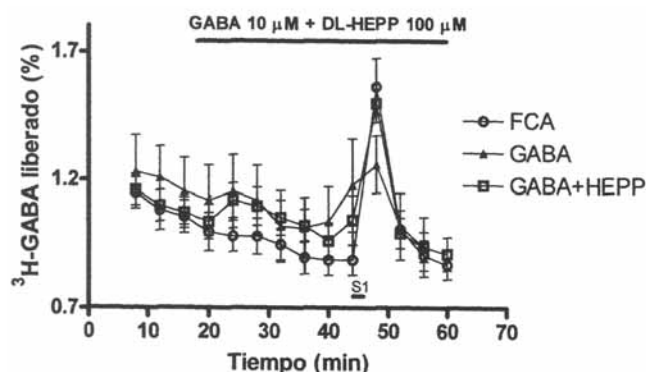


Figura 6. El DL-HEPP revierte la inhibición de la liberación de [3 H]-GABA producida por el GABA en rebanadas de sustancia nigra estimuladas eléctricamente. Las rebanadas de sustancia nigra conteniendo [3 H]-GABA se perfundieron inicialmente con fluido cerebroespinal artificial (FCA). Durante los periodos indicados por las barras horizontales S1 y S2, el tejido se estimuló (4Hz, 40 mA durante 3.5 min). Se colectaron fracciones de perfusión cada 4 minutos. El primer periodo de estimulación se realizó durante la perfusión de las rebanadas con FCA. El segundo periodo de estimulación fue en presencia de FCA (control, $n = 9$) o de los compuestos GABA (10 μ M, $n = 7$) o GABA (10 μ M) más DL-HEPP (100 μ M, $n = 9$), los cuales se adicionaron durante el periodo indicado por la barra.

Entre los antagonistas del GABA que presentan actividad anticonvulsiónante encontramos al bilobalide, el cual es una lactona sesquiterpénica que se aisló de las hojas de *Ginkgo biloba* que, además de incrementar el aprendizaje y la memoria en animales, también antagoniza las acciones del GABA en los receptores recombinantes GABA_A constituidos por las subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ expresados en oocitos de *Xenopus*. Lo inusual de este compuesto es que es un antagonista del receptor GABA_A que carece de propiedades convulsiónantes y se comporta como un anticonvulsiónante.³⁰ La sal del ácido fosfo-butil-amino-propil-fosfínico y el clorhidrato del ácido (+)-5,5-dimetil-2-morfolinoacético son antagonistas del GABA en los receptores GABA_B y presentan actividad anticonvulsiónante en modelos experimentales de ausencia.^{12,31} Las amidas sintetizadas en el presente trabajo no están relacionadas estructuralmente con los antagonistas del GABA mencionados previamente. Por lo anterior, las fenilamidas preparadas podrían ser una herramienta importante en el entendimiento y en la comprensión de la participación del GABA en la epilepsia y, eventualmente, alguna de ellas podría convertirse en un nuevo medicamento antiepileptico de segunda generación.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo de la SIP-IPN y de la DEDICT-COFAA-IPN.

Referencias

- Kohling R. GABA becomes exciting. *Science* 2002;298:1350-1351.
- Dichter MA. Emerging insights into mechanisms of epilepsy: implications for new antiepileptic drug development. *Epilepsia* 1994;35:S51-S57.

3. **Martínez-Muñoz D, Meza-Toledo SE.** Acciones bioquímicas de los compuestos antiepilépticos. En: *Farmacología Clínica*. Víctor Uriarte-Bonilla V, Trejo-Caso SS (Eds.) Trillas, 1a. Edición, México D.F., México, 2003, pp 799-806.
4. **Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulae M, Miles R.** On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 2002;298:1418-1421.
5. **Fukuda A.** Diuretic soothes seizures in newborns. *Nature Med* 2005;11:1153-1154.
6. **Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumbaek AC, Mathews GC, Benke TA, et al.** NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nature Med* 2005;11:1205-1213.
7. **Vergnes M, Marescaux C, Micheletti G, Depaulis A, Rumbaek L, Warker JM.** Enhancement of spike and wave discharges by GABAergic drugs in rats with spontaneous petit mal like seizures. *Neurosci Lett* 1984;44:91-94.
8. **Gloor P, Fariello RG.** Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy. *Trends Neurosci* 1988;11:63-68.
9. **Snead OC.** The ontogeny of GABAergic enhancement of the γ -hydroxybutyrate model of generalized absence seizures. *Epilepsia* 1990;31:363-368.
10. **Liu Z, Vergnes M, Depaulis A, Marescaux C.** Involvement of intrathalamic GABA_B neurotransmission in the control of absence seizures in the rat. *Neurosci* 1992;48:87-93.
11. **Marescaux C, Liu Z, Bemaseoni R, Vergnes M.** GABA_B receptors are involved in the occurrence of absence seizures in rats. *Pharmacol Commun* 1992;2:57-62.
12. **Hosford DA, Wang Y, Che-Liu C, Snead OC.** Characterization of the antiabsence effects of SCH50911, a GABA_B receptor antagonist, in the lethargic mouse, γ -hydroxybutyrate, and pentylenetetrazole models. *J Pharm Exp Ther* 1995;274:1399-1403.
13. **Guerrini R, Belmonte A, Genton P.** Antiepileptic drug-induced worsening of seizures in children. *Epilepsia* 1998;39:52-510.
14. **Meza-Toledo SE, Zenteno-García MT, Juárez-Carvajal E, Martínez-Muñoz D, Carvajal-Sandoval G.** A new Homologous series of anticonvulsants: phenyl alcohol amides. Synthesis and pharmacological evaluation. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1990;40(II):1289-1291.
15. **Pérez-de la Mora M, Tapia R.** Anticonvulsant effect of 5-ethyl, 5-phenyl, 2-pyrrolidinone and its possible relationship to γ -aminobutyric acid-dependent inhibitory mechanisms. *Biochem Pharmacol* 1973;2635-2639.
16. **Solis H, Jurado JL, Fernández-Guardiola A.** La acción de la butiramida sobre el desarrollo del "Kindling" y el "Kindling amigdalino" ya establecido en el gato. En: *Neurobiología, Simposium Internacional*. Velasco-Suárez MM, Escobedo-Ríos F (Eds.) Progreso, México D.F., México, 1979, pp 83-94.
17. **Brailowsky S, Montiel T, Hernández E, Marescaux C, Vergnes M.** Effects of 3-hydroxy, 3-ethyl, 3-phenylpropionamide (HEPP) on rat models of generalized and focal epilepsy. *Epilepsy Res* 1992;11:167-172.
18. **Meza-Toledo SE, Juárez-Carvajal E, Carvajal-Sandoval G.** Synthesis of a new homologous series of p-chlorophenyl alcohol amides, their anticonvulsant activity and their testing as potential GABA_B receptor antagonists. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1998;48:797-801.
19. **Hill DR, Bowery NG.** ³H-baclofen and ³H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature* 1981;290:149-152.
20. **Kerr DIB, Ong J.** GABA agonists and antagonists. *Med Res Rev* 1992;12:593-636.
21. **Carvajal-Sandoval G, Juárez-Carvajal E, Cruz-Peinado C, Meza-Toledo SE.** Synthesis and pharmacological evaluation of a new homologous series of ($\pm$)-p-fluoro-phenyl alcohol amide anticonvulsants. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1998;48:349-352.
22. **Meza Toledo SE, Ortega-González C, Juárez-Carvajal E, Carvajal-Sandoval G.** Stereoselective anticonvulsant activity of the enantiomers of ($\pm$)-2-hydroxy-2-phenylbutyramide. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1995;45:756-759.
23. **Litchfield JT, Wilcoxon F.** A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 1949;96:99-113.
24. **Meza Toledo SE, Bowery NG.** Baclofen inhibits electrically evoked GABA release from rat substantia nigra slices without evidence for autoreceptors. *Br J Pharmacol* 2000;131:46p.
25. **Tapia R, Drucker-Colín RR, Meza-Ruiz G, Durán L, Levi G.** Neurophysiological and neurochemical studies on the action of the anticonvulsant γ -hydroxy, γ -ethyl, γ -phenylbutyramide. *Epilepsia* 1979;20:135-145.
26. **Iadarola MJ, Gale K.** Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science* 1982;218:1237-1240.
27. **Arbilla S, Kamal L, Langer SZ.** Presynaptic GABA autoreceptors on GABAergic nerve endings of the rat substantia nigra. *Eur J Pharmacol* 1979;57:211-217.
28. **Floran B, Silva I, Nava C, Aceves J.** Presynaptic modulation of the release of GABA by GABA_A receptors in pars compacta and by GABA_B receptors in pars reticulata of the substantia nigra. *Eur J Pharmacol* 1988;150:277-286.
29. **Bowery NG.** GABA_B receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993;33:109-147.
30. **Chebib M, Hanrahan JR, Mewett KN, Duke RK, Johnston GAR.** Ionotropic GABA receptors as therapeutic targets for memory and sleep disorders. *Ann Rep Med Chem* 2004;39:13-23.
31. **Froesti W, Mickel SJ, Von-Sprecher O, Diel PJ, Hall RG, Maier L, et al.** Phosphinic acid analogues of GABA. 2. Selective, orally active GABA_B antagonists. *J Med Chem* 1995;38:3313-3331.

V. Prevención de los daños producidos por la diabetes mellitus y la senescencia

Guillermo Carvajal-Sandoval,^{a*} Pedro Zamudio-Cortes,^b María Elena Carvajal-Juárez^a y Enedina Juárez-de Carvajal^a

^aDepartamento de Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México D.F., México

^bInstituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Secretaría de Salud, México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 20 de abril de 2006

Aceptado: 23 de junio de 2006

RESUMEN

La diabetes mellitus y el envejecimiento son dos problemas de salud similares con iguales causas en ambos trastornos. Recientemente se ha encontrado que los daños producidos en ambos problemas de salud son la consecuencia de la glicosilación no-enzimática (glicación) que conduce a la formación de una gran variedad de productos avanzados de la glicosilación, conocidos como AGE's (abreviatura de Advanced Glycosylation End products). Al medir las concentraciones de hemoglobina glicosilada (HbA1c) en ratas wistar diabéticas con estreptozotocina (60 mg/kg de peso) que ingirieron glicina al 1 % ad libitum en la bebida, se ha demostrado que la glicina evita la glicación de las proteínas. Se administraron diariamente, a pacientes diabéticos, 20 gramos de glicina divididos en cuatro tomas, observando también una disminución de la HbA1c. En los animales de experimentación, la glicina corrigió la neuropatía diabética modificando la velocidad de conducción del nervio ciático. Asimismo, las ratas diabéticas disminuyeron la deformidad de los eritrocitos mientras que las que tomaron glicina mejoraron su deformidad al pasar por una membrana. La capacidad proliferativa de mononucleares totales de sangre periférica de rata aumentó ante los mitógenos. En las ratas diabéticas que tomaron glicina, fue muy notoria la mejoría de la inmunidad humoral (placas de Cunningham) y no se presentó leucocoria (principio de cataratas). En estas ratas, tampoco se reportó hipertrigliceridemia que, en las ratas diabéticas, puede producir hipertensión y depósito excesivo de grasa retroperitoneal, alteraciones. Además, las ratas hipertrigliceridémicas presentan elevación del nivel de los ácidos grasos libres séricos los cuales disminuyen a valores normales en las ratas que toman glicina. También, se observó disminución de la microalbuminuria en las ratas diabéticas lo cual sugiere protección al daño renal. El caso más espectacular se dio en un diabético que presentó inicialmente una hiperglicemia muy elevada y HbA1c de 21 %; a los seis meses de consumir glicina, su curva de tolerancia a la glucosa normal y HbA1c era normal.

Palabras clave:

Diabetes mellitus, envejecimiento, glicina, glicación

SUMMARY

Diabetes mellitus and aging are two similar health problems where causes of death are the same for both. Recently they described that damages produced are the result of "non enzymatic glycosylation" ("glycation") that leads to the formation of a wide variety of advanced products of glycosylation, known as AGE's (Advanced Glycosylation End products). Research with streptozotocin-induced diabetic rats (60 mg/kg of weight) that consumed glycine 1% ad libitum in drinking water measured the concentration of glycosylated hemoglobin (HbA1c), and showed that glycine avoids the "glycation" of proteins. We administered 20 gr of glycine four times per day and also observed a decrease of HbA1c in diabetic patients. In animal experiments glycine corrected the diabetic neuropathy modifying the speed conduction of the sciatic nerve. Also among diabetic rats it diminished erythrocyte deformity whereas those who took glycine improved the deformity associated with having passed through a membrane. Glycine increased the capacity of mononuclear proliferation of peripheral blood among rats exposed to mitogens. The improvement has been described in the humoral immunity of diabetic rats that took glycine (Cunningham plaques). Leucocoria (first stage cataracts) were not observed among diabetic rats that took glycine. The hypertriglyceridaemia brought about in diabetic rats can produce hypertension and excessive deposit of retroperitoneal fat whereas in rats that take glycine this phenomenon is not observed. In addition hypertriglyceridaemic rats display an increase of serum free acids whereas among rats that take glycine this diminishes to normal values. Decrease of microalbuminuria observed in diabetic rats, suggests protection against renal damage. The most striking case was seen in a diabetic patient who presented initially very high hyperglycemia and 21%, HbA1c. Six months after glycine intake, values showed a normal tolerance curve to glucose and normal HbA1c.

Keywords:

Diabetes mellitus, aging, Advanced Glycosylation End products

* Correspondencia y solicitud de sobretiros: Guillermo Carvajal-Sandoval. Departamento de Bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, 11340 México D.F., México. Tel. (52 55) 5729 6300.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa que afecta a cerca del 10% de la población de nuestro país y que constituye la tercera causa de mortalidad.¹

La esperanza de vida de los mexicanos se ha incrementado progresivamente. Si, en 1940, era de 41 años, se elevó a 53 años en 1953 y a 70 años en 1990. En 1997, llegó a 74 años. Este aumento espectacular se debe a las medidas preventivas y sobre todo a la disminución de la mortalidad infantil.

Los avances en el conocimiento científico en general y de la medicina en particular nos han enseñado que las principales causas de muerte por diabetes son las enfermedades cardíaca (ateroesclerótica) en el 50% de los casos; cerebro-vascular en el 12% y renal en el 10%. En conjunto, las enfermedades vasculares producen la muerte de casi el 72% de los diabéticos. En el resto de los casos, el 10% fallece por cáncer, el 6% por infecciones respiratorias y renales, el 1 % por coma diabético y el 11 % por otras causas.

En 1981, se sugirió explicar los daños crónicos producidos por la diabetes mediante mecanismos bioquímico-moleculares. Se pudo observar que estos daños son similares a los que produce el envejecimiento,²⁻⁴ al grado que se consideró la diabetes mellitus como una forma de envejecimiento acelerado.^{3,4} De igual forma, las causas de muerte, mencionadas arriba, debido a la diabetes y a la vejez son las mismas, así como los mecanismos bioquímico-moleculares que explican los daños ocasionados por la enfermedad o el envejecimiento.

Estos mecanismos se presentan en las figuras 1 y 2 en donde se considera que la glicosilación no enzimática de las proteínas (glicación) conduce a la formación de una gran variedad de productos, denominados genéricamente "AGEs" ("Advanced Glycosylation End products"), que son los principales responsables de los daños vasculares, neurológicos, inmunológicos, etc.

De acuerdo con lo anterior, se pensó en la posibilidad de evitar la glicación de las proteínas con la administración de dosis relativamente altas del aminoácido glicina que pudiera proteger las proteínas, se glicosilara en vez de ellas (Figura 3) y se metabolizaría como lo describieron Borsok et al.⁵

Se escogió la glicina porque ya se está utilizando, desde 1935, este aminoácido en dosis de hasta 30 gramos/día durante varios meses, sin observarse efectos secundarios indeseables, en el tratamiento de la miastenia gravis, en la distrofia muscular progresiva y en la pseudohipertrofia.⁶

Se siguió la glicación de las proteínas por medio de la determinación de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) que se usa en la diabetes.⁷⁻⁹ La glicación de la hemoglobina es una forma de saber como se están glicosilando otras proteínas del organismo y como esto expresa la gran diversidad de daños ocasionados por la diabetes y el envejecimiento.¹⁰⁻¹⁵

Las glicosil-proteínas sufren un conjunto muy variado de reacciones (que requieren días o semanas) para dar los AGEs (Figura 2). Estos AGEs encaminan hacia la producción de los daños de la diabetes y el envejecimiento (Figura 4). La glicina tendría el efecto de prevenir la glicación inicial y en consecuencia detener la formación de los AGEs en una gran proporción si no en su totalidad.

En nuestros estudios, utilizamos ratas Wistar que diabeteizamos con el antibiótico estreptozotocina¹⁶ a dosis de 60 mg/kg de peso. Este compuesto destruye selectivamente las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, produciendo una diabetes insulina-dependiente de Tipo 1.

En el cuadro I, se consignan los resultados obtenidos con los diferentes grupos de ratas: ratas sanas con agua de bebida sin glicina (grupo 1, testigo), ratas sanas con glicina al 1 % en agua de bebida (grupo 2), ratas diabéticas con agua de bebida sin glicina (grupo 3) y ratas diabéticas con glicina en el agua de bebida (grupo 4). En el grupo 1, las ratas presentaron una glicemia de 50.29:1. 2.53 mg/dl y en el grupo 2, 55.5 ± 2.89. En el grupo 4 de las ratas diabéticas que tomaron glicina al 1% en el agua de bebida *ad libitum*, la hemoglobina glicosilada fue de 2.9% y en el grupo 3 de las diabéticas fue de 4.2%. Estos resultados muestran claramente que la glicina normalizó la hemoglobina glicosilada ($p < 0.00005$, valor altamente significativo).

En el cuadro II, se presentan, en porcentaje, los valores de Hb glicosilada antes y después de la ingesta de glicina en

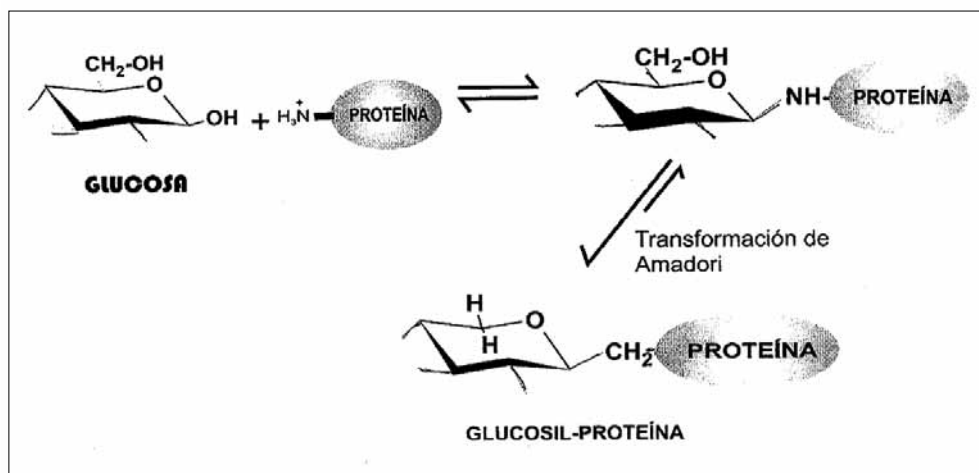


Figura 1. Glicosilación no enzimática de las proteínas.

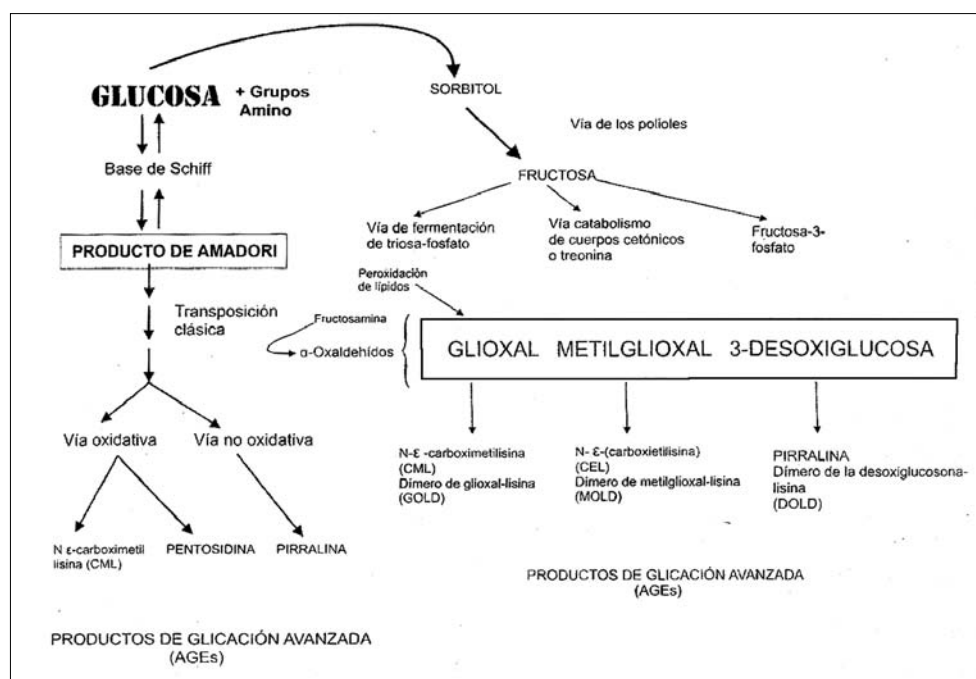


Figura 2. Formación de productos de glicación avanzada.

38 pacientes diabéticos, tanto del Tipo II (30 pacientes) como del Tipo I (8 pacientes). La ingesta del aminoácido en cuatro tomas diarias de 5 g cada 6 horas (20 g/día) fue de duración variable (meses). Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con las ratas. El valor de p fue de 7×10^{-12} lo que hace altamente significativa la diferencia entre los valores de Hb glicosilada antes y después de la glicina.

Hasta la fecha son muy escasos los hipoglicemiantes orales que disminuyen los niveles de Hb glicosilada; sin embargo, la glicina (que tiene un ligero efecto hipoglucemiante) lo logra en forma espectacular, como se aprecia en muchos casos individuales (Cuadro II), hecho que sugiere el

efecto protector de la glicosilación de las proteínas por el aminoácido glicina.

Los productos terminales de la glicación avanzada (AGEs) relacionan tanto los daños producidos por la diabetes mellitus como los provocados por el envejecimiento (Figura 4). Creemos que estos productos no se dan, o lo hacen en mucho menor cantidad, en presencia de la glicina, porque ella evita la formación de las glicosil-proteínas o productos de Amadori iniciales.

En el cuadro III, se aprecia el resultado obtenido en la neuropatía diabética experimental en ratas Wistar tratadas con estreptozotocina (70 mg/kg) dos semanas después de la

Cuadro I. Efecto de la glicina sobre la hemoglobina glicosilada en ratas²⁴

Ratas no diabéticas				Ratas diabéticas			
Grupo control		Ratas con glicina		Grupo control		Ratas con glicina	
Glucosa mg/dL	Hb-Glic %	Glucosa mg/dL	Hb-Glic %	Glucosa mg/dL	Hb-Glic %	Glucosa mg/dL	Hb-Glic %
40.0	2.3	57.0	3.0	200.0	4.5	308.0	2.8
51.0	2.3	53.0	3.2	347.0	4.2	210.0	2.7
62.0	2.5	63.0	3.1	302.0	4.7	200.0	3.1
39.0	2.7	45.0	2.7	291.0	4.3	231.0	2.8
57.0	2.6	52.0	2.6	252.0	4.1	260.0	3.4
54.0	2.5	57.0	2.5	230.0	3.5	301.0	3.2
49.0	2.8	61.0	3.1	304.0	4.1	277.0	2.3
50.3	2.5	55.4	2.9*	275.1	4.2	256.6	2.9
S.D.	8.48	0.2	0.3	50.3	0.4	43.2	0.4

* $p < 0.02$ vs. Hb-Glic. del grupo control de ratas no diabéticas.

$p < 0.00005$ vs. Hb-Glic. del grupo control de ratas diabéticas.

Cuadro II. Efecto de la glicina sobre la hemoglobina glicosilada en pacientes

Paciente	Sexo	Edad en años	Tipo de diabetes	Hb-Glic (%)			Tratamiento con glicina/meses
				Antes	Después	Var.	
1	M	43	II	14.9	12.3	-2.6	3.0
2	M	58	II	11.2	7.5	-3.7	29.0
3	M	40	II	15.1	13.1	-2.0	2.0
4	F	84	II	10.5	7.8	-2.7	5.0
5	M	48	II	14.4	9.4	-5.0	3.0
6	M	55	II	14.2	6.2	-8.0	16.0
7	M	61	II	15.1	6.3	-8.8	25.0
8	M	43	II	13.0	6.9	-6.1	8.0
9	F	58	II	10.5	7.8	-2.7	4.5
10	M	64	II	12.1	9.8	-2.3	4.5
11	M	60	II	21.9	6.0	-15.9	9.0
12	M	55	II	13.7	10.5	-3.2	5.0
13	F	45	II	12.6	7.3	-5.3	3.0
14	M	70	II	7.7	6.3	-1.4	9.0
15	M	45	II	8.8	6.7	-2.0	13.0
16	M	60	II	13.1	6.7	-6.4	6.0
17	M	53	II	7.2	6.0	-1.2	4.0
18	M	75	II	15.3	9.7	-5.6	6.0
19	M	40	II	8.9	6.3	-2.6	16.0
20	M	61	II	10.2	6.5	-3.7	18.0
21	M	48	II	10.1	7.0	-3.1	6.0
22	M	45	II	10.2	4.4	-5.8	2.5
23	M	57	II	12.0	6.6	-5.4	17.5
24	F	37	II	14.6	10.9	-3.7	11.0
25	F	58	II	9.8	7.0	-2.8	20.0
26	F	63	II	10.6	9.5	-1.1	4.0
27	M	48	II	12.2	9.4	-2.8	4.0
28	M	64	II	9.3	6.1	-3.2	24.0
29	M	64	II	8.6	6.8	-1.8	13.0
30	M	70	II	15.7	8.4	-7.3	11.0
31	M	29	I	12.0	7.5	-4.5	7.0
32	M	13	I	12.8	10.8	-2.0	10.0
33	M	42	I	15.7	9.3	-6.4	14.0
34	M	29	I	12.0	8.5	-3.5	7.0
35	M	33	I	14.2	12.9	-1.3	12.0
36	M	39	I	15.8	11.3	-4.5	7.0
37	M	31	I	21.0	8.9	-12.1	57.0
38	M	48	I	18.0	11.0	-7.0	9.0
S.D.				12.8	8.3*	-4.5	11.2
				3.3	2.2	3.1	10.2

*p = 7×10^{-12} Prueba de rangos señalados de Wilcoxon.²⁴

diabetización y que tomaron glicina al 1 % en el agua de bebida.¹⁷

El resultado obtenido es realmente espectacular, pues, la velocidad de conducción del nervio ciático prácticamente se normalizó en las ratas diabéticas, aun cuando la Hb glicosilada no se haya modificado. Esto sugiere que la glicina evita el daño neural inicial. La glicina no modificó el nivel de HbA1c, muy probablemente porque fue insuficiente el tiempo de ingesta continua del aminoácido. En esta misma prueba, utilizando aminoguanidina, que evita la formación de enlaces cruzados entre proteínas glicosilada (AGEs) en monos babún (*Papio hamadryas*), se tuvo un resultado negativo¹⁸

En ratas diabetizadas con estreptozotocina, se notó una alteración muy marcada en la fórmula blanca de la sangre con disminución de los leucocitos totales tanto en los linfocitos como en los neutrófilos polimorfonucleares. Esta disminución tiende a normalizarse en las ratas diabéticas que toman glicina al 1% en el agua de bebida.

También se observó una disminución en el efecto estimulante de los mitógenos como la fitohemoglutina, la concanavalina y el interferón gama (Figura 5), juzgado por la incorporación de la timidina tritiada. Fue interesante observar que los linfocitos del grupo testigo de ratas sanas que tomaron glicina en el agua de bebida incorporaron más timidina tritiada que las

Cuadro III. Neuropatía diabética experimental en ratas Wistar (estreptozotocina 70 mg/Kg)

Ratas	Número	Glicemia mg/dl	Velocidad de conducción del nervio crítico MIS	HbA1c %
Testigo	6	58.5 ± 4.6	61.0 ± 3.6	2.55 ± 0.14
Diabéticas	4	174.5 ± 29.0	38.2 ± 3.2 **	3.90 ± 0.40*
Diabéticas tratadas con glicina	5	211.2 ± 27.0*	55.8 ± 5.4	4.22 ± 0.13 **

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p = 0.001.

sanas que solo tomaron agua. Así mismo, se dio un resultado parecido comparando las ratas diabéticas que solo tomaron agua y las que la tomaron con glicina. Lo anterior sugirió que la glicina parece ejercer un efecto inmunoestimulante.

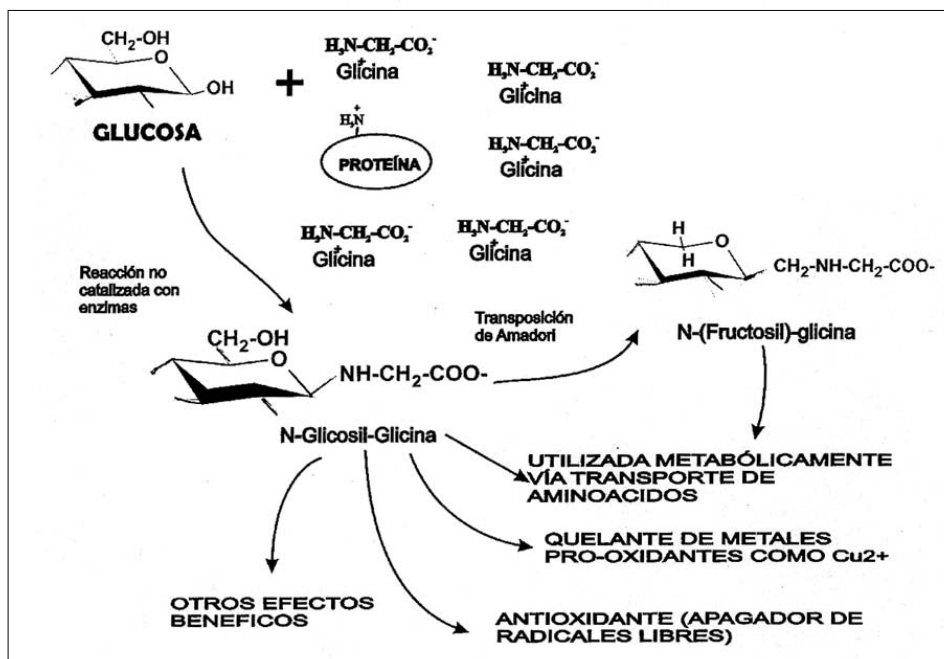
Esto condujo a estudiar directamente el efecto de la glicina sobre la respuesta inmune en ratas sanas y diabéticas, con y sin glicina en el agua de bebida, inmunizadas con eritrocitos de borrego.¹⁹ Se sacrificaron las ratas así tratadas a las cuatro semanas; se extirpó el bazo para obtener de éste células (esplenocitos) que fueron tratadas en portaobjetos con los glóbulos rojos de borrego y para observar la hemólisis producida (en forma de placas hemolíticas o de Cunningham) al microscopio. Como se puede ver en el cuadro IV, las ratas normales presentan 206 células formadoras de placas y las diabéticas 83 (menos de la mitad). Sin embargo, las ratas diabéticas que tomaron glicina presentan 182 placas, acercándose a valores normales. Lo realmente espectacular fue que las ratas sanas que tomaron glicina presentaron 504 células formadoras de placas, es decir más del doble de las otras ratas sanas; esto demuestra que la glicina actúa como

inmunoestimulante. Una de las características del envejecimiento es la disminución de numerosas funciones orgánicas entre las cuales se encuentra la inmunidad. El hecho es que la glicina podría producir los mismos resultados en personas de edad avanzada. Con este antecedente y a los 64 años de edad, empecé a ingerir la glicina tres veces por día en dosis de 7g (21g/día) antes de cada comida. Hace ya dieciséis

Cuadro IV. Células formadoras de placa en los diferentes grupos de rata

Grupo	Células formadoras de placa
I Normales	206.39 ± 125.0
II Normales	504.46 ± 120.0
III Diabéticas	83.03 ± 54.2
IV Diabéticas/glicina	182.82 ± 67.2

I vs II p < 0.0003; I vs III p < 0.006; I vs IV p = 0.44.

**Figura 3.**

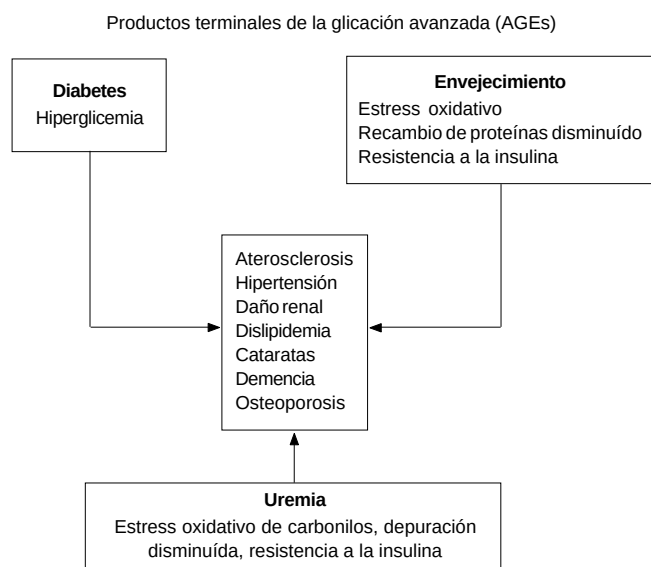


Figura 4. La vía común para las complicaciones de la diabetes, el envejecimiento y la uremia.

años que la tomó con regularidad y he notado que mi inmunidad ha mejorado, cosa que percibí de la forma siguiente. Unos años antes de los 64, presentaba un episodio gripal cada año; en estos últimos 16 años, sólo he tenido 5 episodios gripales y muy moderados. Quizás sea una observación trivial, pero después de iniciar con este tratamiento mi envejecimiento es igual ahora que hace 16 años.

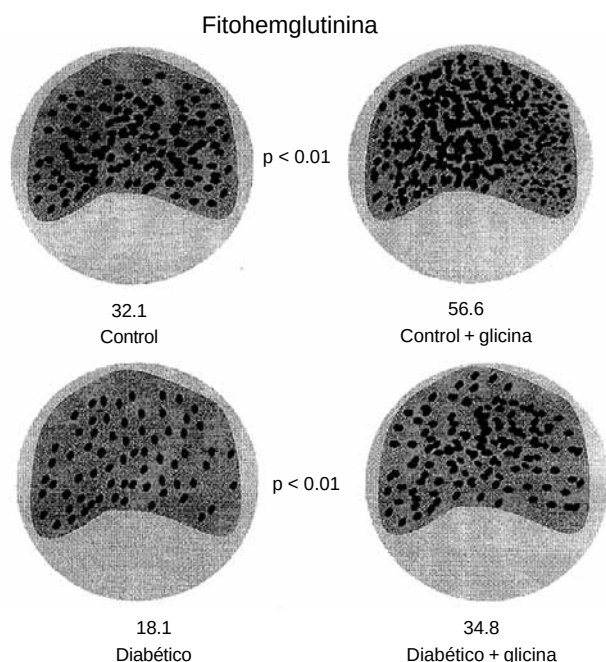


Figura 5. Diabetes y glicina. Índice de estimulación (cpm basal/cpm est.).

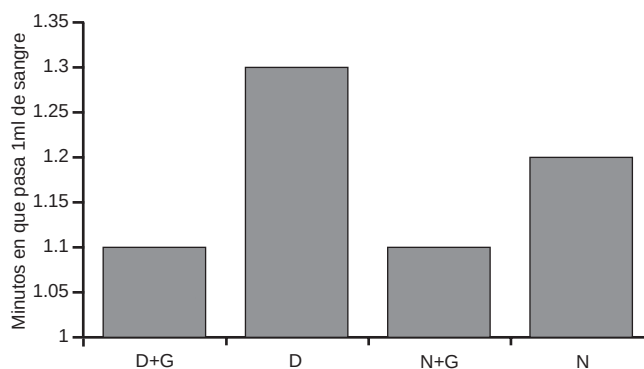


Figura 6. Deformación de eritrocitos. Se pasa un volumen conocido de sangre con la presión de una bomba peristáltica. Se mide el tiempo y la resistencia del paso de los eritrocitos a través de una membrana.

También se determinó, en las ratas diabéticas y sanas que toman o no glicina, la deformabilidad de los eritrocitos que está disminuida en la diabetes.^{20,21} Los glóbulos rojos (G.R.) de las ratas normales tardan 1.2 minutos en atravesar la membrana de policarbonato empleada en este experimento (Figura 6). Los G.R. de ratas normales que toman glicina pasan en 1.1 minutos y los G.R. de las diabéticas requieren 1.3 minutos. Los G.R. de las diabéticas que toman glicina tardan 1.1 minutos. Es decir que la deformabilidad es mayor tanto en los G.R. de ratas normales que toman glicina como en las diabéticas que toman glicina; esto sugiere que la microcirculación de ratas diabéticas se corrige, ya que la deformabilidad aumentada permitirá la movilidad en los capilares sanguíneos de los animales diabéticos y de los normales que toman glicina.

Al estudiar la química sanguínea de las ratas normales y diabéticas con y sin glicina en el agua de bebida, se observó un espectacular resultado en los niveles de triglicéridos en sangre. En la figura 7, se constató que las ratas normales con y sin glicina presentaron una concentración de cerca de 200 mg/dl, cuando las diabéticas sin glicina tuvieron, en cambio, una hipertrigliceridemia de cerca de 800 mg/dl y las ratas diabéticas con glicina una de poco más de 200 mg/dl. Es una diferencia altamente significativa desde el punto de vista estadístico ($p < 0.001$).

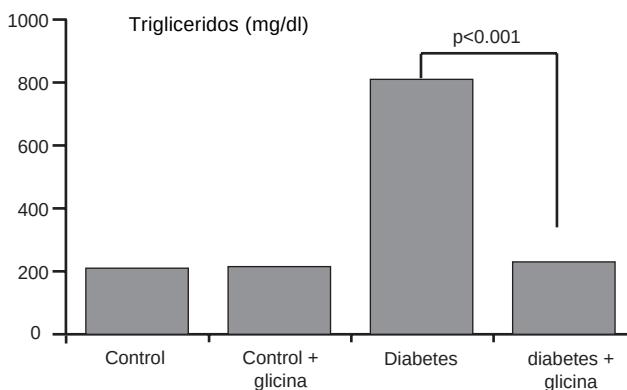


Figura 7. Diabetes experimental y glicina.

Cuadro V. Efecto de la glicina en ratas hipertensas trigliceridémicas

Grupos	PA/mm Hg (sistólica)	Triglicéridos (mg/dl)	TAR (g)
1. Control	120 ± 2.9 (4)	154 ± 8 (11)	11.5 ± 2 (4)
2. Glicina al 1%	127 ± 20.9 (4)	162.0 ± 13 (6)	12.0 ± 1.0 (5)
3. Sacarosa al 3%	147.0 ± 3.0 (5)	264.0 ± 26 (19)	28.0 ± 1 (3)
4. Sacarosa más glicina	115.0 ± 6.0 (4)	222 ± 8 (5)	12.0 ± 0.7 (4)
	p < 0.001 vs sacarosa (Gpo. 3)		p < 0.001 vs sacarosa (Gpo. 3)

() = Número de ratas; PA = presión arterial; TAR = tejido adiposo retroperitoneal.

Debido a lo anterior, la doctora Baños de McCarthy, del Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez", estudió el efecto de la glicina en ratas hipertrigliceridémicas mediante la administración de cantidades elevadas de sacarosa (al 30% en el agua de bebida). Estas ratas mostraron hipertrigliceridemia e hipertensión, así como una acumulación de grasa en la cavidad retroperitoneal. La administración de glicina en el agua de bebida (junto con la sacarosa al 30%) produjo una marcada disminución de la hipertrigliceridemia y normalizó la presión arterial. Así mismo, el depósito de grasa retroperitoneal fue normal en las ratas que tomaron sacarosa y glicina en el agua de bebida (Cuadro V).

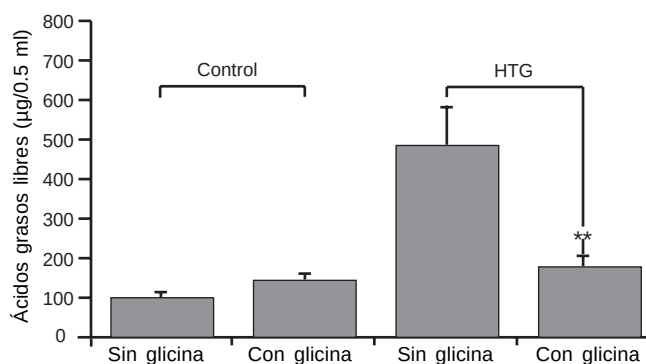
En las ratas diabéticas de 5 meses de diabetizadas, apareció leucocoria en los ojos, que no se presentó en las ratas diabéticas⁵ que tomaron glicina durante ese tiempo. La leucocoria (Figura 8) es un principio de cataratas (juugada de acuerdo con el estudio histopatológico realizado por una oftalmopatóloga muy calificada, la Dra. Patricia Cheves). Este estudio se repitió con resultados idénticos en un número mayor de animales.

Más recientemente, un colaborador de la doctora Baños de McCarthy, Mohammed El Hafidi del Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez", repitió el estudio anterior determinando, esta vez, el nivel de los ácidos grasos libres en el suero sanguíneo de las ratas hipertrigliceridémicas hipertensas; encontró este nivel muy elevado (Figura 9); en con-

traste en las ratas que tomaron glicina, se encuentra prácticamente normal.²² Este resultado es especialmente importante porque sugiere que la glicina (al bajar el nivel de los ácidos grasos libres en la sangre circulante) muy probablemente disminuye la hiperinsulinemia de muchos diabéticos Tipo II, ya que el aumento de los ácidos grasos libres condiciona la resistencia a la insulina que es característica de esta diabetes.²⁰

En nuestras ratas diabéticas con estreptozotocina, observamos la presencia de microalbuminuria (Figura 10). De 10 ratas diabéticas, siete presentaron 100 mg/L y tres 50 mg/L, cifras claramente anormales. Sin embargo, en las 10 ratas diabéticas que tomaron durante los cinco meses, glicina al 1% en el agua de bebida (Figura 11) solo 2, presentaron 50 mg/L en la orina; 5 no presentaron nada de albúmina y 3 presentaron 10 mg/L. Así, podemos decir que 8 de 10 ratas, fueron protegidas de la nefropatía diabética por la glicina, resultado muy alentador que sugiere que este efecto benéfico se presentará también en los enfermos diabéticos que toman el aminoácido.

En conclusión presentamos el caso de un paciente diabético de Tipo II, con antecedentes familiares, que tenía una hemoglobina glicosilada de 21.9%; a los 9 meses después de tomar la glicina regularmente (4 tomas de 5 g c/u) bajó a un nivel de 6.0%. Con este enfermo que presentaba una glicemia normal (90 mg/dl), realizamos una curva de tolerancia a la glucosa, administrando 1 g de glucosa por kilogramo de peso corporal y determinamos paralelamente tanto insulina

**Figura 8.****Figura 9.**

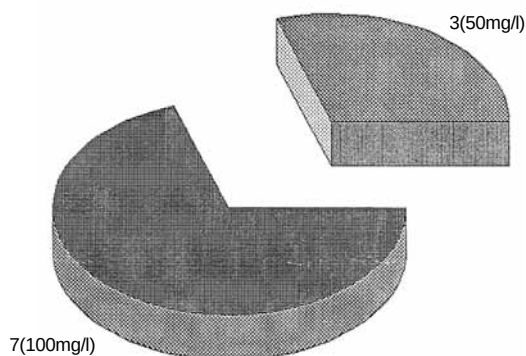


Figura 10. Microalbuminuria en rata Wistar albino con 5 meses de diabetes tratadas con glicina. Micral-test Boehringer Mannheim.

Valor normales: 0 y 10 mg/l y valores anormales: 20, 50 y 100mg/l

como al péptido c. La figura 12 muestra el resultado.²³ Puede apreciarse que la curva de la glucosa es normal (como la de una persona no-diabética) así como las curvas de insulina y péptido c.

Esto demuestra que la glicina tomada regularmente (como lo hizo este enfermo) normaliza la glucosa así como la secreción de insulina. Desafortunadamente no hubo forma de comparar cómo se encontraba el enfermo antes de iniciar la ingesta de glicina; pero dado que tenía una hiperglucemia muy elevada, no fue posible realizar este estudio. En general nunca se hace curva de tolerancia en pacientes hiperglicémicos declarados. La curva de tolerancia se practica en familiares de diabéticos para saber quien es prediabético.

Todo lo anterior demuestra que el uso de la glicina, en las dosis que empleamos en los enfermos, protege de los daños que la enfermedad produce y podría revertir aquellos daños que son aparentemente reversibles. También, el empleo de este aminoácido en las dosis de aproximadamente 20 g/día

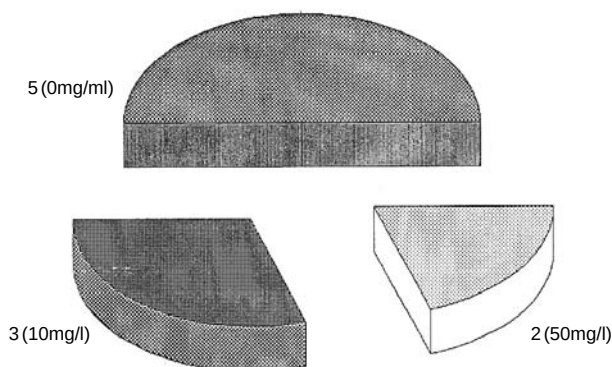


Figura 11. Microalbuminuria en rata Wistar albino con 5 meses de diabetes. Micral-test Boehringer Mannheim. Valor normales: 0 y 10 mg/l y valores anormales: 20, 50 y 100mg/l.

Meses de tratamiento	HbGly %	Glucosa (mg/dl)
Inicio	21.9	658
3	12.0	108
7	7.0	77
11	6.6	140
13	6.0	177
15	6.5	123

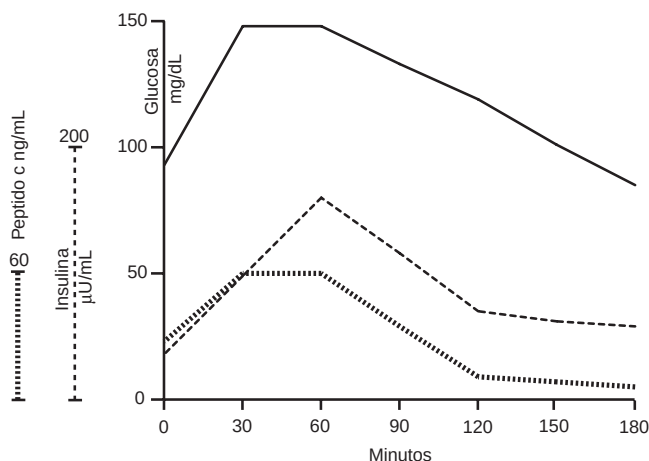


Figura 12. Resultados de un paciente diabético de tipo II.

en tres tomas de 7g c/u puede proteger de los daños del envejecimiento.

Referencias

1. Kumate Rodríguez J. Atlas de la salud. 1a impresión 1993. pp 39 y XI.
2. Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic Browning in vivo: Possible Process for Aging of Long-Lived Proteins. Science 1981;211:491-493.
3. Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. Ann Rev Biochem 1991;50:385-432.
4. Brownlee M. Advanced Glycation End products in diabetes and ageing. Ann Rev Med 1995;46:223-234.
5. Borsook H, Abrams A, Lowy PH. Fructose-amino acids in liver: Stimuli of amino acid incorporation "in vitro" 1. Biol Chem 1995;270: 111-124.
6. New and nonofficial remedies. J Am Med Assoc 1935;104:1241.
7. Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cell of diabetes. Clin Chim Acta 1968;22:296-298.
8. Koenig R, Peterson CM, Kilo C, Cerami A, Williamson JR. Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. Diabetes 1976;25(3):230-232.
9. Koenig R, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of Glucose Regulation and Hemoglobin A1c in Diabetes mellitus. New Engl J Med 1976;295(8):417-420.
10. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic Glycosylation and the Pathogenesis of Diabetic Complications. Ann Intern Med 1984;101:527-537.
11. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. The biochemistry of the complications of Diabetes mellitus. Ann Rev Biochem 1981;50:385-432. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. J Intern Med 2002;251:87-101.
12. Koenig R, Peterson CM, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissues and the biochemical basis of diabetic complications. New Engl J Med 1988;318:1315-1321.
13. Pierpaoli W, Fabris N. Physiological Senescence and its Postponement. Ann NY Acad Sci 1991; Vol 621.
14. Harman D, Holliday R, Meydani M. Towards prolongation of the healthy life span. Practical Approaches to Intervention. Ann NY Acad Sci 1998; Vol. 854.

15. **Park Sch, Hwang ES, Kim HS, Park WY.** Healthy Aging for Functional Longevity., *Molecular & Cellular Interactions in Senescence*. Ann NY Acad Sci 2001; Vol. 928.
16. **Nakhoda A, Y Wong HA,** The induction of diabetes in rats by intramuscular administration of streptozotocin. *Experientia*. 1979;35:1679-1680.
17. **Velasco DE, De la Cruz LF, Chambert CG, De Carvajal EJ, Ramos MG, Carvajal-S G.** Efecto protector de la glicina sobre la velocidad de conducción del nervio ciático de ratas diabéticas. *Cong Nac Cienc Fisiol Puebla (México) Ago.* (1985) Trabajo No. 230.
18. **Birrell AM, Hefferman SJ, Ansselin AD, Mc Lennan S, Church DK, Gitlin AG, et al.** Functional and Structural abnormalities in the nerves of Type I diabetec baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 2000;43:110-116.
19. **Lazcano MD.** Efecto de la Glicina en la respuesta inmune a eritrocitos de borrego en ratas. Tesis de Maestría. ENCB. IPN, México, 1996.
20. **McMillan DE, Utterback NG, La Puma J.** Reduced Erythrocyte Deformability in Diabetes. *Diabetes*. 1978;27:895-901.
21. **Miller JA, Gravallesse E, Bunn HF.** Nonenzymatic Glycosylation of Erythrocyte Membrane Proteins. *J Clin Invest* 1980;65:896-901.
22. **El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal SG, Baños G.** Glycine Intake Decreases Rat Plasma Free Fatty Acids. Adipose cell size, Visceral Fat Accumulation and Blood Pressure in Sucrose fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R1387-R1393.
23. **Carvajal SG, Juárez de CE, Ramos MG, Carvajal JME.** "Curación o Regresión espontánea de la Diabetes mellitus Tipo II tratada con Glicina". *Taxco, Guerrero. México: Resúmenes XI Cong Nac De Farmacol* 1987, pp 45.
24. **Carvajal-Sandoval G, Juárez de Carvajal E, Ramos-Martínez G, Carvajal-Juárez ME.** Inhibición de la glicosilación no enzimática de la hemoglobina en la diabetes mellitus. *México: Rev Inst Nal Enf Resp.* 1995;(3)185-188.