

Potencial Antiepiléptico de Nuevos Derivados de 5-Bencilideno Pirimidinas

Beatriz H. Guevara, Gricela Lobo, Christian Rodríguez, Trina Collman, Jaime Charris

Unidad de Neurofarmacología y Farmacología Clínica. Unidad de Investigación de Síntesis de Medicamentos y Unidad de Modelado Molecular. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

Resumen

Tres series de los compuestos 4,6-[(diamino)-5-benciliden]pirimidina-2(5H)-tiona (4a), (5E)-6-amino-5-[4-(dimetilamino)benciliden]pirimidina-2,4(3H,5H)-diona (5a), su análogo: 4-fluoro (5b); y el 4,6-[(diamino-5-benciliden]pirimidina-2(5H)-ona (3a) con los derivados: 3,4 -dicloro (3b), 2-metoxi (3c) y 4-dimetil amina (3d) de anillo sustituido fueron sintetizados en dos pasos de reacción. En el primer paso se sintetizaron los intermediarios claves, mediante una reacción de condensación entre benzaldehídos y malononitrilo. Los intermediarios de estructura general 1 bencilidenomalononitrilo e intermediarios de estructura general 2 (2E)-2-ciano-3-arilacrilato de metilo. La reacción de ciclación entre 1 y urea produjo las bencilideno pirimidinas de estructura general 3 derivados 4,6-[(diamino-5-benciliden]pirimidina-2(5H)-ona. La ciclación entre 1 con tiourea condujo a las bencilideno pirimidinas de estructura 4 derivados 4,6-[(diamino-5-benciliden]pirimidina-2(5H)-tiona. Por otra parte, la ciclación de 2 con urea dio las bencilideno pirimidinas de estructura general 5 derivados (5E)-6-[amino-5-benciliden]pirimidina-2,4(3H, 5H)-diona. Las estructuras de los compuestos sintetizados se confirmaron por IR, 1H-RMN, 13C RMN y EM. Se evaluó la actividad anticonvulsivante y la neurotoxicidad de las 5-bencilideno pirimidinas obtenidas de 3, 4 y 5, y siguiendo las pautas indicadas en el Programa de Desarrollo de Fármacos Antiepilépticos en Desarrollo (ADD) del Departamento de Salud, de USA, que establece como modelos primarios de actividad anticonvulsivante la técnica de electroshock máximo (MES) y la prueba de Pentilenetetrazol subcutáneo (scPTZ). Se utilizaron ratones de la cepa NMRI. La neurotoxicidad mínima fue evaluada utilizando el ensayo de rotarod. Los compuestos fueron administrados por vía intraperitoneal (ip) 30 minutos y 4 horas antes de la inducción de las crisis convulsivas. Los compuestos análogos son 4a, 5a y 3a. Los compuestos 3b, 3c y 3d son derivados del compuesto 3a. A excepción del compuesto 3d, todos los compuestos protegen del evento convulsivo inducido por los modelos de MES y PTZsc, al prevenir las crisis a los 30 min y a las 4 h en dosis superiores al fenobarbital (FBT). Las nuevas bencilideno pirimidinas son menos potentes que el FBT en el modelo PTZ. Ninguno de los compuestos previno el evento convulsivo en el modelo de crisis psicomotoras. Los compuestos más tóxicos fueron: 3a > 4a > 3c. El compuesto 3d presentó el mayor índice de protección (IP); superando incluso al FBT. El tiempo de efecto pico de los compuestos 5a, 3b y 3c fue de 30 min, mientras que el tiempo pico de los compuestos 4a, 3a, 5b y 3d se obtuvo a las 4h. Estos hallazgos nos permiten sugerir que de los compuestos evaluados, la 4,6-diamino-5-(4-dimetilamino-2-benciliden]pirimidina-2(5H)-ona (3d) tiene con un perfil farmacológico superior que el FBT.

PALABRAS CLAVE: 5- bencilideno pirimidinas, Electroshock máximo (MES), Pentilenetetrazol (PTZ), Antiepileptic potential, Neurotoxicidad mínima.

Abstract

ANTIEPILEPTIC POTENCIAL OF NEW DERIVATIVES OF 5-BENZYLIDENE-PYRIMIDINES

Three series of compounds 4,6-[(diamine)-5-benzylidene]-pyrimidine-2(5H)-thione (4a), (5E)-6-amine-5-[4-(dimethylamine)benzylidene]-pyrimidine-2,4(3H, 5H)-dione (5a), its analog: 4-fluoro (5b), and 4,6-[(diamine-5-benzylidene] pyrimidine-2(5H)-one (3a) with its derivatives: 3,4-dichloro (3b), 2-methoxy (3c) and 4-dimethylamine (3d) substituted ring were synthesized in two reaction steps. In the first step key intermediates were synthesized by a condensation reaction between benzaldehyde and malononitrile. The intermediates of general structure were 1 benzylidene malononitrile and brokers of general structure 2 (2E)-2-cyano-3-methyl aril acrylate. The cyclization reaction between 1 and urea produced the benzylidene pyrimidine derivatives of general structure 3 4,6- [(diamine-5-benzylidene] pyrimidine-2 (5H)-one. The cyclization of 1 with thiourea led to structure 4 benzylidene derivatives pyrimidines: 4,6-[(diamine-5-benzylidene]pyrimidine-2(5H)-thione. Moreover, the cyclization of 2 with urea gave the benzylidene pyrimidine derivatives of general structure 5 (5E)-6- [amine-5-benzylidene]pyrimidine-2,4(3H,5H)-dione. The structures of the compounds were confirmed by IR, 1H-NMR, 13C NMR and MS. We evaluated the anticonvulsant activity and neurotoxicity of 5-benzylidene pyrimidine obtained from 3, 4 and 5, following of Development of Antiepileptic Drugs in Development Program (ADD), Program procedures (NIH, USA). This protocol states Maximal Electroshock Model (MES) and subcutaneous Penthylenetetrazole Model (scPTZ) as first step paramount tests. Albino mice from NMRI strain were used for all tests. Minimal neurotoxicity test was assessed using the rotarod test. The compounds were administered intraperitoneally (ip) 30 minutes to 4 hours before seizure stimuli. Analog compounds are 4a, 5a and 3a. Compounds 3b, 3c y 3d are 3a derivatives. Every compound but 3d did protect in MES and PTZsc models by preventing seizures at 30 min and 4 h in higher doses than phenobarbital (PBT). None of compounds could prevent seizures induced by 6 Hz model. Most toxic compounds were: 3a > 4a > 3c. 3d had the higher protection index (PI); even higher than PBT. Time to peak effect of 5a, 3b y 3c was 30 min, while 4a, 3a, 5b y 3d was at 4h. Altogether let as conclude that 4,6-diamino-5-(4-dimehylamino-2-benzylidene)pyrimidine-2(5H)-one (3d) had the highest performance among all compounds evaluated and even higher than the control drug PBT.

KEY WORDS: 5-benzylidene-pirimidines, Maximal electroshock (MES), Pentylenetetrazole, Antiepileptic potential, Minimal neurotoxicity.

Introducción

La epilepsia, un síndrome neurológico que afecta a nivel mundial el 1 - 2% de la población,¹ conforma un grupo diverso de trastornos que, en términos generales, se caracterizan por la repetición imprevisible e incontrolable de crisis episódicas de aparición brusca y de breve duración, caracterizadas fisiopatológicamente por descargas anormales y excesivas de grupos de neuronas muy excitables en corteza y en hipocampo, responsables de la aparición de las crisis epilépticas. Clínicamente se manifiestan con síntomas que afectan al control de los movimientos, la sensibilidad, e inclusive pueden generar trastornos transitorios de la visión u olfato y, en algunos casos, manifestaciones de tipo psiquiátrico. La excitabilidad presente se debe a cambios neuroquímicos que incluyen el incremento de los aminoácidos excitatorios, disminución de la actividad inhibitoria y alteraciones en el potasio.^{2,3,4}

La elección médica para el uso de un fármaco antiepiléptico se basa en la eficacia dependiendo del tipo específico de crisis que presente un paciente, criterios que se definen siguiendo la clasificación internacional de las crisis epilépticas. Hasta el presente, se han caracterizado más de 40 síndromes epilépticos.

Según la OMS, hay 50 millones de epilépticos en el mundo. Según reportes del "Bureau" en Venezuela, existía para el año 2.004 una incidencia de 17,5 pacientes por cada 1000 habitantes en la población venezolana (datos no publicados).

Modelos experimentales de epilepsia

Los modelos animales de epilepsia que se emplean para evaluar los nuevos fármacos y su eficacia específica en los diferentes tipos de crisis epilépticas permiten clasificar la eficacia preclínica de nuevos compuestos, sus mecanismos de acción y sus potencialidades ante mecanismos de resistencia.⁵ El test de crisis inducidas por electroshock máximo (MES) ha sido empleado como modelo de convulsiones tónico-clónicas, mientras que la prueba subcutánea con pentilenetetrazol (scPTZ) se ha sido sugerido como modelo de crisis de ausencia, evaluando la aparición y severidad de las convulsiones clónicas. El primero consiste en convulsiones tónicas inducidas por estimulación eléctrica corneal bilateral y se considera que un compuesto es efectivo en este modelo cuando evita la extensión de las patas pos-

teriores del animal durante la convulsión.^{1,4,5} El test inducido por pentilenetetrazol (PTZsc), evalúa las contracciones mioclónicas y clónicas generalizadas inducidas por la administración subcutánea sistémica de dosis convulsivantes del agente PTZ, sugerido como modelo para la ausencia generalizada y convulsiones mioclónicas en humanos.^{3,6,7} Un nuevo modelo derivado del MES ha sido empleado como modelo de efectividad contra crisis parciales.^{8,9} Se conoce como modelo de la convulsión psicomotora o de baja frecuencia (6Hz) y se distingue de su predecesor (además del espectro de efectividad que evalúa crisis parciales) en que emplea una frecuencia del estímulo de 6Hz, una intensidad de 32 mA y una duración de 3 seg (el MES emplea 60Hz, 50 mA y 0,2 seg, respectivamente). Por otro lado, el déficit neurológico o neurotoxicidad mínima que podrían generar los agentes en estudio es evaluado utilizando el ensayo de rotarod.^{8,9,10}

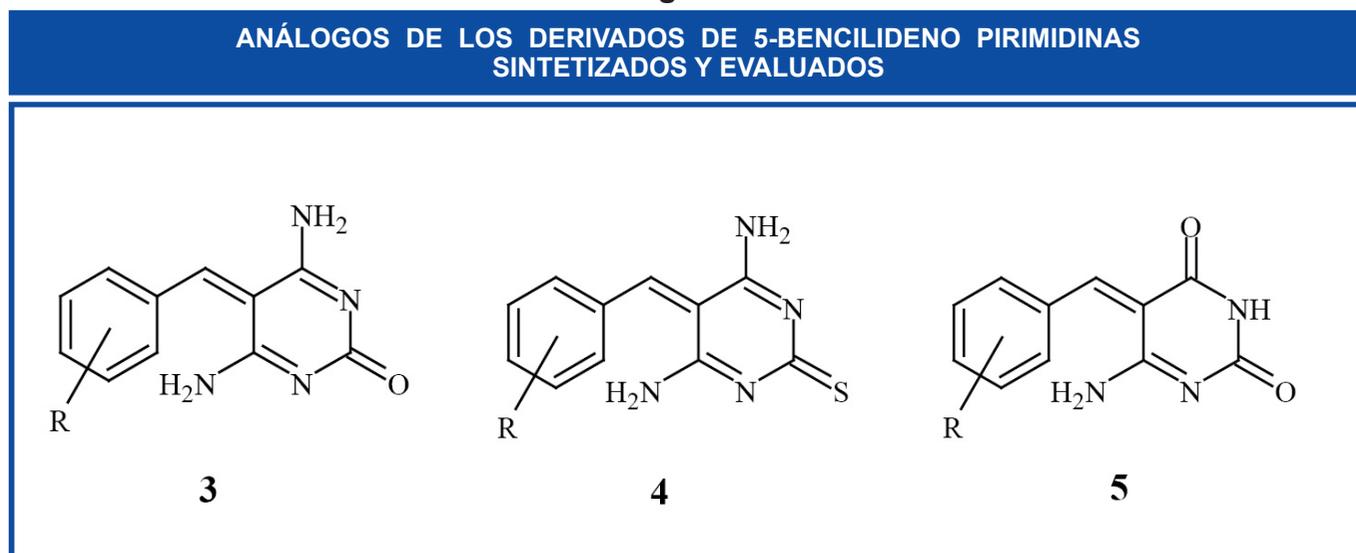
Los compuestos evaluados mediante los mencionados modelos animales tienen en común en su estructura química la presencia de un grupo pirimidínico. Respecto de los efectos farmacológicos de las pirimidinas descritos en la literatura, estudios previos indican que estos compuestos muestran actividad antiviral, fungicida, antibacteriana, antihipertensiva, antihistamínica y antiepiléptica.^{11,12,13} Compuestos con estructura pirimidínica como el fenobarbital (FBT) cuyo nombre químico es el 5-etil-5-fenil-2,4,6-(1H,3H,5H) pirimidina triona y la primidona, 5-etildihidro-5-fenil-4,6(1H,5H) pirimidina diona, son empleados en clínica como antiepilépticos.^{4,7} El FBT es un antiepiléptico efectivo a dosis inferiores a las hipnóticas, empleado desde 1912 en el manejo de crisis generalizada tónico-clónica y crisis parciales simples.^{3,14,15} En el modelo de electroshock, logra suprimir la fase tónica de la respuesta y aumentar el umbral necesario para producir las convulsiones. También ha resultado eficaz en el control de las convulsiones inducidas con el modelo de pentilenetetrazol (scPTZ). Aunque sus efectos adversos centrales (sedación) han contribuido a disminuir su uso, sigue considerándose un antiepiléptico de elección por ser efectivo en diversos tipos de crisis, ser de bajo costo y de versátil administración (oral e inyectable).

La primidona, derivado del FBT, es un fármaco útil en todos los tipos de epilepsia excepto en las ausencias. Químicamente similar al FBT, comparte la mayor parte de sus propiedades, ya que producto de su

metabolismo hepático forma FBT y otro metabolito activo, la feniletilmalonamida.^{3,8,12,15} Estudios previos sugieren que los efectos terapéuticos (y tóxicos) de la primidona se deben en realidad a su conversión en FBT. Primidona es menos neurotóxica que el FBT, igual de potente en el modelo de electroshock máximo (MES), pero no protege del evento epiléptico inducido con PTZsc.^{16,17}

Estos antecedentes con importante relevancia clínica, nos motivaron llevar a cabo la síntesis y evaluación del potencial antiepiléptico de nuevas series de 5-bencilideno pirimidinas con la estructura general 3, 4 y 5 (**Figura 1**), a fin de evaluar si estas moléculas son efectivas en el tratamiento de las convulsiones inducidas por los modelos de MES, PTZ y crisis psicomotoras, perfil de neurotoxicidad asociado a efectos en el sistema nervioso central.

Figura 1



Materiales y Métodos

Síntesis de derivados de 5-bencilideno pirimidinas

La síntesis de los nuevos derivados de 5-bencilideno pirimidinas que fueron evaluadas se indican en la (**Figura 2**). En el primer paso de síntesis, se obtienen los derivados intermediarios bencilideno malononitrilo **1** mediante la condensación de benzaldehídos con malononitrilo y los derivados intermediarios (2E)-2-ciano-3-(fenil)arilacrilato de metilo **2** mediante la condensación entre benzaldehídos y cianoacetato de metilo. Las condiciones de reacción para la obtención de **1** fueron metanol como solvente, sin catalizador y agitación a temperatura ambiente. Para la obtención de 2a-b, se utilizó metanol como solvente, una cantidad catalítica de metóxido de sodio como base y bajo agitación a temperatura ambiente. Los derivados 4,6-diamino-5-bencilideno pirimidina-2(5H)-ona **3** se obtuvieron haciendo reaccionar el intermediario de estructura general

1 con urea. Los derivados 4,6-diamino-5-bencilideno pirimidina-2(5H)-tione **4** se lograron mediante la reacción de **2** con tiourea. Los derivados (5E)-6-amino-5-bencilideno pirimidina-2,4(3H, 5H)-dione **5** se obtuvieron mediante la reacción de **2** con urea. El análisis de los datos de los espectros de Infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protones (¹H RMN), resonancia magnética de carbono 13 (¹³C RMN) y de masas (EM) fueron consistente con las estructuras asignadas.

Evaluación del efecto antiepiléptico

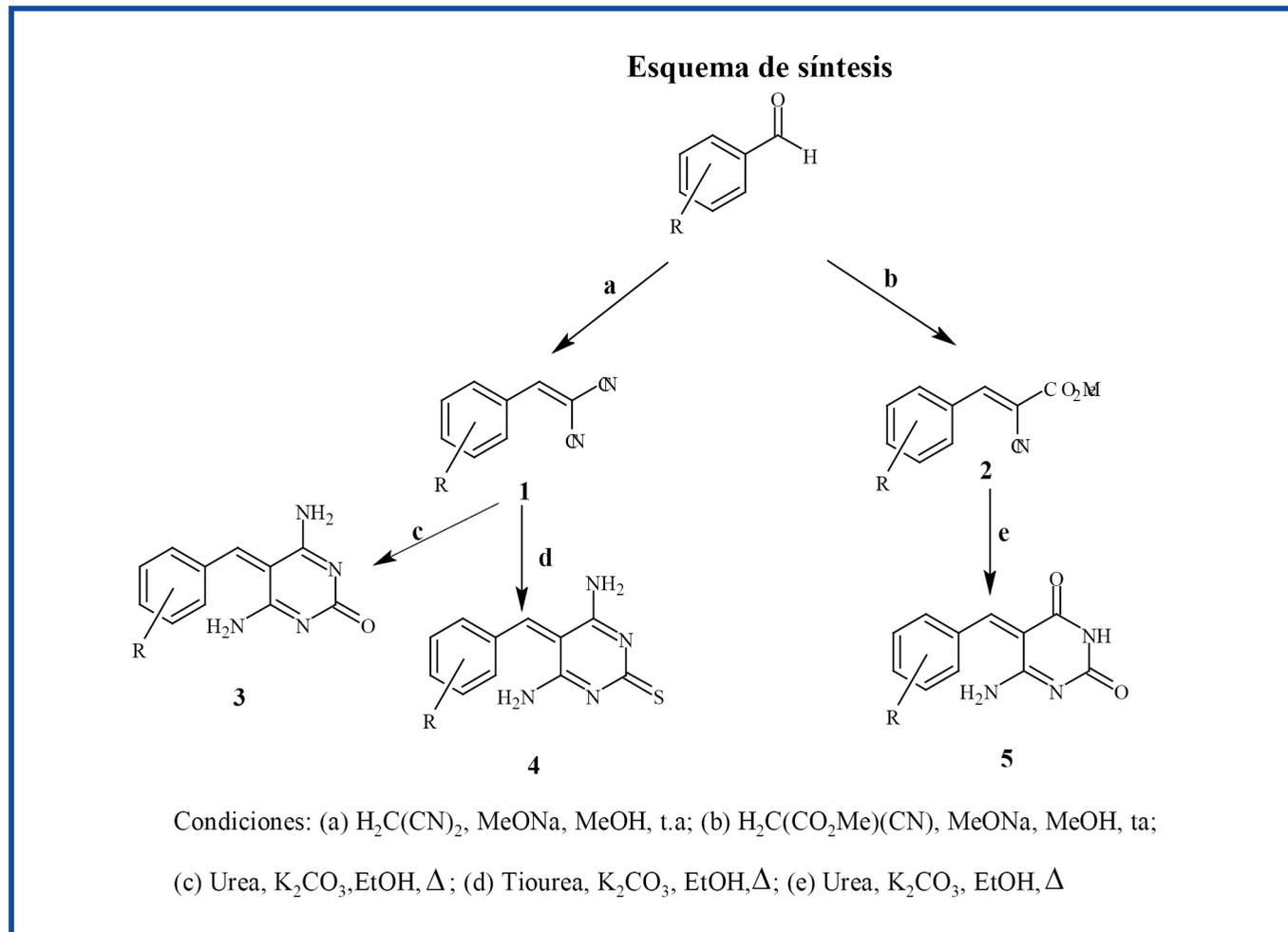
Se utilizaron ratones NMRI suministrados por el Bioterio del Instituto Nacional de Higiene, Caracas, en un rango de peso entre 20 y 25 g. Se mantuvieron en un ciclo de 12 h luz, 12 h oscuridad y se les administró agua y comida "ad libitum", excepto durante el periodo de ensayo. Los ratones fueron sacrificados finalizado el ensayo siguiendo las normas Bioéticas establecidas por FONACIT para animales de laboratorio.

Cada grupo experimental por dosis y por droga (nuevo derivado de 5 bencilideno pirimidina), consistió de 6 animales. Los compuestos evaluados fueron administrados (ip) a los 30 minutos y 4 h

antes del ensayo en un solvente constituido por polietilenglicol-400 al 30% en solución salina. Las dosis evaluadas fueron de 10, 30, 100 y 300 mg/kg. Los controles recibieron el mismo volumen de solvente.

Figura 2

SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 5-BENCILIDENOPIRIMIDINAS 3, 4 Y 5.



Cada grupo experimental por dosis y por droga (nuevo derivado de 5 bencilideno pirimidina), consistió de 6 animales. Los compuestos evaluados fueron administrados (ip) a los 30 minutos y 4 h antes del ensayo en un solvente constituido por polietilenglicol-400 al 30% en solución salina. Las dosis evaluadas fueron de 10, 30, 100 y 300 mg/kg. Los controles recibieron el mismo volumen de solvente.

Las pruebas de MES, scPTZ y rotarod, se realizaron siguiendo el protocolo de los ensayos preclínicos de-

finidos en el Proyecto de Desarrollo de Fármacos Antiepilepticos del Instituto Nacional de Salud de USA.¹ También se evaluó la efectividad de los compuestos en crisis parciales mediante la prueba de convulsión psicomotora.

La prueba de MES evaluó la capacidad de evitar la propagación de la convulsión, la prueba de scPTZ, la capacidad de aumentar el umbral de la convulsión; la prueba convulsión psicomotora (6Hz) como modelo de efectividad en crisis parciales; y la prueba de

rotarod evaluó la neurotoxicidad de los compuestos que fueron evaluados.

La prueba de electroshock máximo (MES), consistió en la aplicación de una estimulación eléctrica en la córnea del animal. Previo al estímulo, se colocó una gota de una solución de tetracaína al 0,5% como anestésico local. Las condiciones del ensayo fueron: frecuencia de pulso 60Hz, intensidad de corriente 50 mA, duración del estímulo: 0,2 seg. La abolición del componente extensor tónico de la crisis se considero como criterio de protección de la propagación de las crisis inducidas por MES.

La prueba de scPTZ requirió la administración de una dosis convulsivante 97 (CD97) (100 mg/kg en el ratón por vía subcutánea). Los animales fueron observados durante 30 min y se evaluó el número de convulsiones clónicas ocurridas en este periodo. La ausencia de espasmos clónicos con una duración mayor de 5 seg durante los 30 min posteriores a la administración de PTZ fue indicativo que el compuesto previno las crisis.¹

El déficit neurológico o neurotoxicidad mínima, manifestado como déficit motor, producido por cada una de las drogas a evaluar, se determinó usando el test de ataxia del rotarod. Los animales divididos por grupos experimentales fueron entrenados en el rotarod a 6 revoluciones por minuto los días previos al estudio. El diámetro de la base giratoria fue de 3,2 cm. La ausencia de efectos neurotóxicos por parte de la droga se evidenció en aquellos animales que lograban mantener el equilibrio en dicha base al menos una vez durante 1 min en 3 intentos sucesivos. Se determinó la dosis tóxica 50 (DT50) cuando la mitad de los animales evaluados en dicha dosis perdían el balance. Los compuestos con significativo potencial anticonvulsivante no exhibieron neurotoxicidad substancial o muerte siguiendo las pautas indicadas en el Programa de desarrollo de drogas antiepilépticas.^{1,9,10,13}

Finalmente, el modelo de crisis psicomotoras consistió en la aplicación de una estimulación eléctrica en la córnea del ratón, al cual se le colocó tetracaína al 0,5% como anestésico local, a una frecuencia de pulso de 6Hz, ancho de pulso 0,2 Hz y una corriente de 32mA durante 3 seg. Esta prueba evaluó la capacidad de las nuevas pirimidinas de abolir la fase clónica seguida de comportamiento estereotipado o automatismos. La actividad antiepiléptica se reportó positiva cuando al menos 50% de los ratones fueron protegidos del evento convulsivo.

Análisis Estadístico

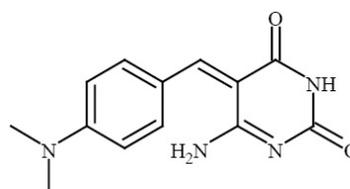
Los datos obtenidos fueron analizados por un análisis de varianza de una vía siguiendo el test de Dunnett.

Un análisis de regresión lineal permitió estimar la dosis toxica (DT) y la dosis efectiva (DE) al 50%.¹⁸

La eficacia de cada ensayo de drogas antiepilépticas fue determinada como DE50 (concentración requerida para proteger el 50% de los animales en convulsiones inducidas por MES, scPTZ y prueba de convulsión psicomotor). La neurotoxicidad mínima fue determinada como valores de DT50. El Índice de protección fue calculado como una relación DT50/DE50 para crisis inducidas en los distintos modelos. La relación de seguridad fue estimada al determinar la DT3 (valor de toxicidad mínima) y DE97 (valor de dosis efectiva máxima) en las crisis inducidas eléctrica y químicamente.¹⁸ Todos los datos se analizaron usando el software Prisma Graph Pad,⁵ basado en el método de Finney (1971).

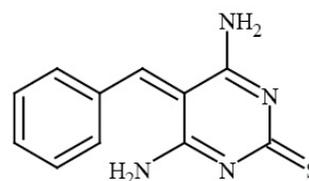
Resultados y Discusión

Estructuras químicas de los nuevos 5-bencilideno pirimidinas obtenidos por síntesis. Análogos obtenidos por síntesis (5E)-6-amino-5-[4-(dimetilamino)bencilideno]pirimidina-2,4(3H,5H)-diona (5a)



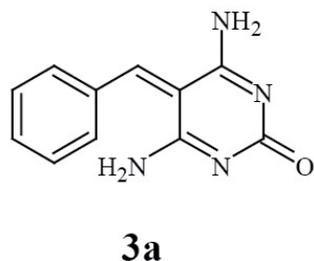
5a

4,6-(diamino)-5-bencilideno-pirimidina-2(5H)-tiona (4a).

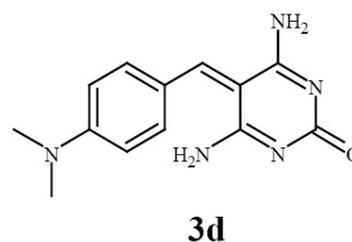


4a

4,6-(diamino)-5-benciliden-pirimidina-2(5H)-ona (3a).

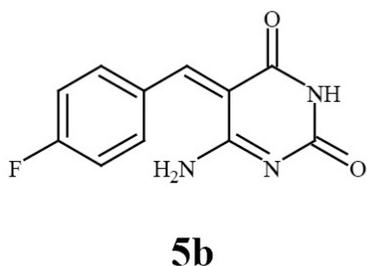


4,6-diamino-5-[(4-dimetilamino)-2-benciliden]pirimidina-2(5H)-ona (3d)



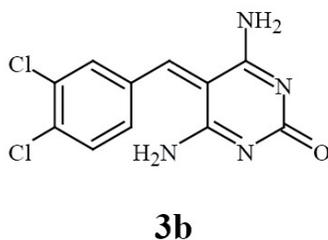
I. Derivado de (5E)-4-amino-5-[4-(dimetilamino) benciliden]pirimidina-2,4(3H,5H)-diona (5a):

(5E)-4-amino-5-[(4-fluoro)benciliden]pirimidina-2,4(3H,5H)-diona (5b).

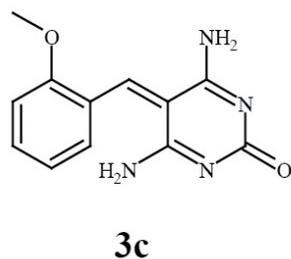


II. Derivados del 4,6-diamino-5-bencilidenopirimidin-2(5H)-ona (3a):

4,6-diamino-5-[(3,4-dicloro)benciliden]pirimidina-2(5H)-ona (3b)



4,6-diamino-5-[(2-metoxi)benciliden]pirimidina-2(5H)-ona (3c)



Actividad antiepiléptica

Los parámetros farmacológicos estimados para los nuevos derivados de 5-bencilideno pirimidina en la fase I del “*screening antiepiléptico*” se detallan en la (Tabla 1). Dichos parámetros fueron cuantificados en la fase II, se indican en la (Tabla 2).

La actividad antiepiléptica fue expresada en términos de la DE50 para el modelo de MES, PTZsc y crisis psicomotoras y la neurotoxicidad como dosis toxica 50 (DT50). Para la determinación de la DE50 y DT50, se evaluaron al menos 3 dosis por vía (ip), 6 ratones por grupo, con la finalidad de establecer: el rango de protección de las crisis entre un 10 y 90%.¹⁸ Se graficó la DE50 y DT50 (Figura 3).

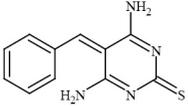
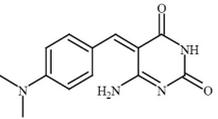
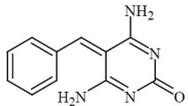
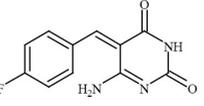
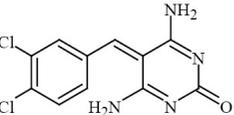
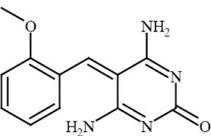
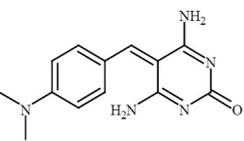
Se determinó el tiempo pico de cada compuesto. Fue de 4h para los siguientes nuevos derivados de 5 bencilideno pirimidinas: 4a, 5b, 3a, 3c y 3d; y 30 min, para los compuestos: 5a, 5b y 3b. De todos los compuestos evaluados, el compuesto 3d (ona) fue efectivo en prevenir las crisis inducidas por MES a dosis de 10 mg/kg, mientras que los compuestos 5a y 5b (dionas) mostraron un efecto a dosis mayores de 30 mg/kg. Compuestos 4a (tiona), 3a y 3d (ona) presentaron actividad antiepiléptica a 30 mg/kg (molécula 3a).

En el modelo de scPTZ, los compuestos 4a y 5a mostraron un efecto protector a 30mg/kg (Tablas 1 y 2).

El compuesto 3d fue el más activo en la prueba de MES y mostró una baja toxicidad, significativamente menor a la producida con la pirimidina clásica utilizada en clínica, el FBT. Ninguno de los compuestos fue eficaz en el modelo de crisis psicomotora (6Hz) (Figura 3, Tabla 1 y 2).

Tabla 1

EVALUACIÓN ANTIPILEPTICA Y TOXICIDAD DE LOS NUEVOS DERIVADOS DE 5-BENCILIDENO PIRIMIDINAS

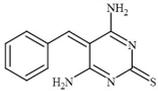
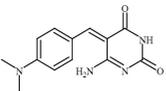
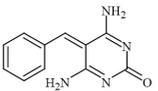
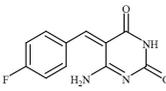
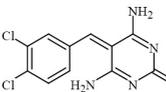
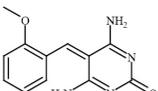
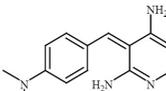
| Compuestos | MES ^a | | scPTZ ^b | | 6 Hz ^c | | Rotarod ^d | |
|--|------------------|--------|--------------------|-------|-------------------|----|----------------------|--------|
| | 0.5h | 4h | 0.5h | 4h | 0.5h | 4h | 0.5h | 4h |
|  4a | - | 30 | 30 | >30 | - | - | - | 30 |
|  5a | 30-100 | 100 | 30 | 10-30 | - | - | 30-100 | - |
|  3a | >30 | 30 | 10-30 | >30 | - | - | 30-100 | - |
|  5b | 100 | 30-100 | >30 | 10-30 | - | - | 100 | 30-100 |
|  3b | 100 | 100 | 30 | 30 | - | - | - | - |
|  3c | >100 | >100 | 30-100 | - | - | - | 30 | 100 |
|  3d | - | 10 | >30 | >30 | - | - | >100 | - |

a. Prueba de MES (número de animales protegidos/ número de animales ensayados).

b. Prueba PTZsc (número de animales protegidos/ número de animales ensayados)

c. Prueba de crisis psicomotoras (6Hz)

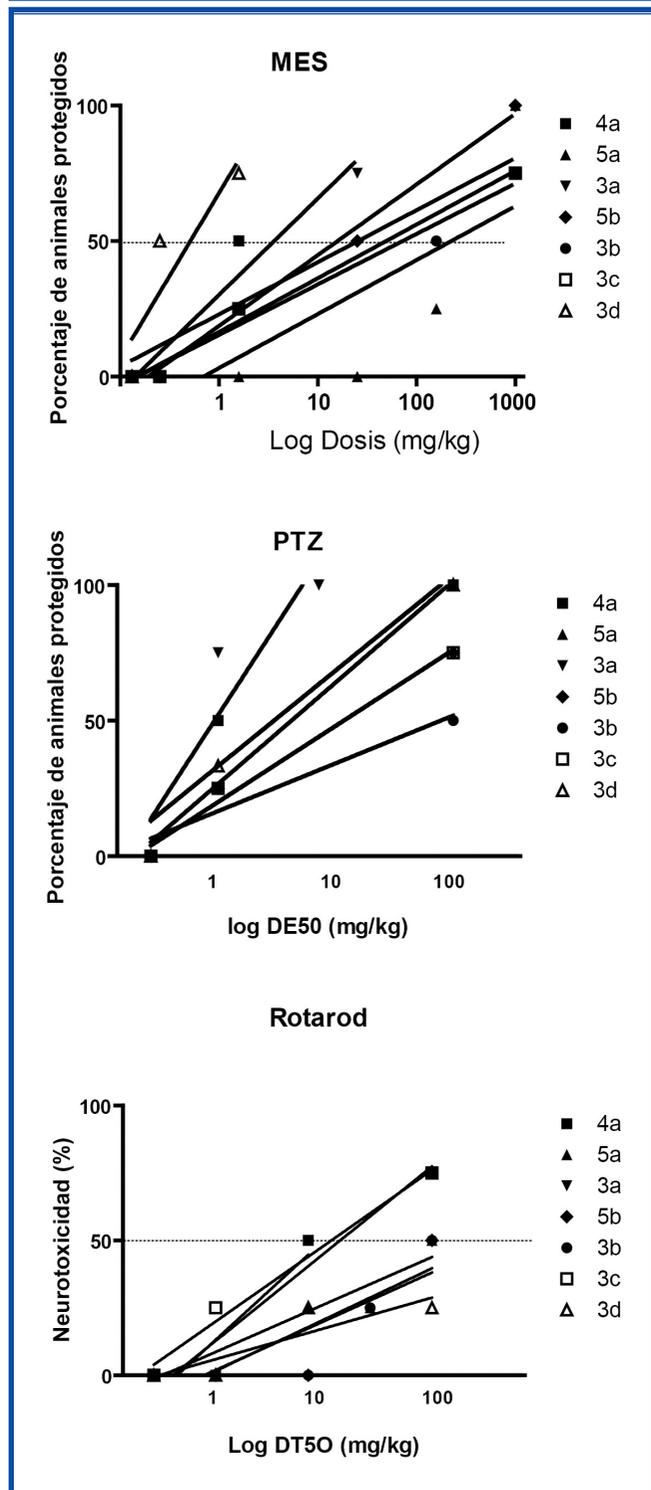
Tabla 2

| DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIEPILÉPTICA CUANTITATIVA EN LOS RATONES | | | | | |
|--|--------------|--|--|-------------|--------------------------|
| Compuestos | MES | ED ₅₀ ^a scPTZ | Rotarod - Toxicidad ^c DT50 c | MES | IP ^d scPTZ |
|  4a | 60,91 | 30,1 | 70,29 | 1,15 | 2,33 |
|  5a | 86,69 | 30,1 | 114,01 | 1,31 | 3,78 |
|  3a | 38,44 | 23,2 | 67,08 | 1,75 | 2,89 |
|  5b | 55 | 60,2 | 126,02 | 2,27 | 2,09 |
|  3b | 71 | 101,09 | 131,13 | 1,84 | 1,29 |
|  3c | 67,64 | 60,2 | 98,54 | 1,45 | 1,63 |
|  3d | 18,82 | 45,2 | 173,59 | 9,22 | 3,84 |
| Fenitoina ^a | 9,5 | >300 | 65,5 | 6,9 | <0,22 |
| Carbamazepina ^a | 8,8 | >100 | 71,6 | 8,1 | <0,22 |
| Fenobarbital ^a | 21,8 | 13,2 | 69 | 3,2 | 5,2 |
| Valproato ^a | 272 | 149 | 426 | 1,6 | 2,9 |

a. (Las nuevas 5-bencilideno pirimidinas fueron administradas vía ip). Dosis en mg/kg. b IP = DT50 / DE50
 b. IP=TD50/ED50
 c. Neurotoxicidad mínima fue determinada en el test del rotarod 30 min después de administrar los compuestos ip.
 d. Datos reportados por Ucar, H y col, 1998 (19).

Figura 3

DETERMINACIÓN DE LA ED₅₀ DE LOS NUEVOS DERIVADOS DE 5-BENCILIDENO PIRIMIDINAS PARA LOS MODELOS DE CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR MES Y PTZ. DETERMINACIÓN DE LA DT50 AL TIEMPO PICO DE CADA COMPUESTO.



MES= electroshock máximo.
PTZ= pentilenotetrazol.

Todos los compuestos evaluados presentaron actividad antiepiléptica. La DE₅₀ que protegió de las crisis inducidas en la prueba de MES de los 7 compuestos estuvo entre 18,82–86,69 mg/kg. Para la prueba de scPTZ, la DE₅₀ se encontró entre 23,2 y 101,09 mg/kg (**Tabla 2**). Es de resaltar que a excepción del compuesto 3d, 4,6-diamino-5-(4-dimetilamino-2-benciliden)pirimidina-2(5H)-ona, la DE₅₀ es superior que el FBT, lo cual sugiere que los otros compuestos sintetizados son menos potentes que esta pirimidina usada en clínica (FBT).

Los valores de índice de protección (IP) de los compuestos 5b y 3d fueron para MES de 2,27 y 9,22; mientras que para PTZsc fueron de 2,09 - 3,84, respectivamente (**Tabla 2**). El compuesto 3d presentó una menor DE₅₀ y un mayor IP respecto al FBT, lo cual sugiere que este derivado presenta una potencia mayor y un perfil de seguridad superior a FBT. Asimismo, presentó el mejor valor de IP 3,84 en el modelo de scPTZ, superior a los fármacos usados en clínica como valproato, fenitoína y carbamazepina, pero inferior que FBT. Ninguno de los compuestos evaluados mostró actividad en el modelo de crisis psicomotora.

Respecto de la toxicidad mínima, los análogos 3a y 4a presentaron una toxicidad similar al FBT, carbamazepina y fenitoína. Dado que su IP es menor que las drogas usadas en clínica en la prueba de MES y cercano a 1, se descarta su posible potencial antiepiléptico por mayores riesgos de toxicidad. Es interesante resaltar que el compuesto 3d fue el más activo en el modelo de MES con una mayor DT₅₀, indicativo de producir menos efectos neurotóxicos. Como consecuencia, su IP fue el mayor de todos los derivados de 5-bencilideno pirimidinas estudiadas y comparadas con los otros antiepilépticos existentes usados en clínica (**Figura 3, Tabla 2**). El resultado nos indica que este derivado tiene potencial antiepiléptico en el manejo de crisis generalizadas con baja incidencia de efectos tóxicos neurológicos.

El compuesto líder 3a fue el que presentó una mejor potencial antiepiléptico en el modelo de scPTZ, con un IP superior a fenitoína, carbamazepina, similar a valproato, pero menor que FBT, lo que indica que su actividad es inferior al FBT.

Publicaciones previas han demostrado que las pirimidinas son eficaces en el manejo de las crisis generalizadas cuando se emplearon ensayos de MES como modelo farmacológico de convulsiones tónico-clónicas y el ensayo de scPTZ como modelo de

crisis de ausencia (pequeño mal). Los estudios realizados por Kaushik y col, en 2010 y Calis y col, en el año 2001; demuestran que sustituciones del grupo benzilideno poseen actividad antiepiléptica.^{18,19, 20,21} Otros realizados por Azam y col, (2010); Septioglu y col (2005); Quiroga y col (1992), confirman el potencial antiepiléptico de pirimidinas sustituidas.^{3,12,19}

Nuestro estudio confirma que los nuevos derivados 5-bencilideno pirimidinas tienen potencia antiepiléptica, cuya eficacia y seguridad depende de la relación estructura actividad antiepiléptica.

De la relación estructura química-actividad antiepiléptica, los resultados fueron los siguientes: 1. La introducción de un grupo donante de electrones tal como el metoxi al grupo benzilideno incrementó la toxicidad, 2. La introducción de grupos aceptores de electrones tales como F al anillo benzilideno del compuesto líder 5b (diona) redujo la actividad antiepiléptica en el modelo de PTZ y aumentó la toxicidad. Por ejemplo, la actividad de los análogos 5b y 3b (con grupos donantes de electrones introducidos) fue menor en relación a la actividad antiepiléptica del compuesto 3d en el modelo de MES. El compuesto 3d tuvo actividad antiepiléptica a una dosis más baja que los fármacos efectivos usados en clínica: fenitoína, carbamacepina, FBT y valproato; sin embargo, en la prueba de PTZ la DE50 para el compuesto 3d fue mayor que el FBT y menor que la fenitoína, carbamazepina y valproato.

Los compuestos análogos 4a, 5a y 3a poseen un importante efecto anticonvulsivante en el modelo de PTZ, aún mas potente que en el modelo de MES. De ellos, el compuesto más potente fue el 3a con una DE50 de 23,2 mg/kg, superando a las drogas usadas en clínica fenitoína, carbamazepina y valproato, aunque menos potente que FBT. Desafortunadamente, su IP fue menor que el FBT

Se ha reportado que el scPTZ es un agente proconvulsivante al inhibir la neurotransmisión del ácido gamma-aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio presente en el sistema nervioso central. La inhibición de la neurotransmisión GABAérgica facilita la aparición de las crisis convulsivas, mientras que la activación de la neurotransmisión GABAérgica inhibe o atenúa las crisis.^{22,25,26}

Muchos de los fármacos antiepilépticos utilizados en clínica, ejercen su acción antiepiléptica al aumentar la neurotransmisión de la actividad GABAérgica, antagonizar la apertura de canales de calcio o de sodio.^{10,22,23,24} Determinar el mecanismo de acción

del compuesto 3d será el paso siguiente de la presente investigación.

Se concluye que el compuesto 3d, 4,6-diamino-5-bencilideno 4-(dimetilamina) pirimidina-2(5H)-ona demostró tener: excelente actividad anticonvulsivante en el modelo de MES, ser más activo que algunos epilépticos convencionales y presentar una baja neurotoxicidad, lo cual se corrobora con el valor obtenido de su IP.

Referencias

1. Porter RJ, Cereghino JJ, Gladding GD, Hessie BJ, Kupferberg HJ, Scoville B and White BG. Antiepileptic Drug Development Program. *The Clev Clin Quart.* 1984;51:293-305.
2. White DC, Greenwood TD, Downey AL, Bloomquist JR, Wolfe JF. Synthesis and anticonvulsant evaluation of some new 2-substituted-3-arylpriido(2,3-d) pyrimidones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2004;12:5711-5717.
3. Rodríguez C y Guevara B. Historia del Desarrollo de Fármacos Antiepilépticos. *Informe Médico.* 2010;12:321-324.
4. Lennox, W.G. The petit mal epilepsies. Their treatment with tridione. *JAMA.* 1945;129:1069-1074.
5. Rodríguez C, Guevara B. Mecanismo de resistencia de los fármacos antiepilépticos. *Informe Médico.* 2010;12:393-399.
6. Rafo Campos M, Sancho-Rieger J, Petra P, Magramon X, Rojas Gu-tierrez. Pautas terapéuticas en el paciente con farmacoresistencia en consultas ambulatorias de neurología en España. *J Rev Neurol* 2008; 97:517-524.
7. White H, Smith-Yockman M, Srivastava A, Wilcox KS. Therapeutic Assays for the Identification and Characterization of Antiepileptic and Antiepileptogenic Drugs. En: *Models of Seizures and Epilepsy.* Pitkänen, A, Schwartzkroin PA and Moshé SL. Elsevier, 2006. pp. 539-549.
8. Everett GM and Richards RK. Comparative anticonvulsive action of 3,5,5-trimethyloxazolidino-2,4-dione (Tridione), Dilantin and phenobarbital. *J Pharmacol Exp Ther.* 1944;81:402-407.
9. Barton M, Klein B, Wolf H, White H. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Res.* 2001;47:217-227.
10. Dunham N y Miya T. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in mice and rats. *J Am Pharm Assoc Sci.* 1957;46: 208-209.
11. Kitani K, Sato Y, Kanai S, Ohta M, Nokubo M, Masuda Y. The neurotoxicity of phenobarbital and its effect in preventing pentylentetrazole-induced maximal seizure in aging mice. *Arch Gerontol Geriatr.* 1988; 61-71.
12. Septioglu E, Aytemir, MD y Calis U. Synthesis and anticonvulsant activity of some new hexahidropiridino-2,4-dione derivatives. *Arzneimittelforschung.* 2005;55:59-64.
13. Murakami A, Watanabe Y, Takechi K, Fujiwara A, Kamei C. Effects of various antiepileptic on behavioral and electroencephalographic seizures induced by maximal electroshock in mice. *J Pharmacol Sci.* 2008; 106:78-83.

14. Alam O, Mullick P, Verma S, Gilani S, Suroor AK, Siddiqui N, Ahsan, W. Synthesis, anticonvulsant and toxicity screening of newer pyrimidine semicarbazone derivatives. *Eur J Med Chem* 2010;45:2467-2472.

15. Shorvon SD. (2009) Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the first 50 years, 126. Caliş U, Köksal M (2001).

16. Calis U, Köksal M. Synthesis and evaluation of anticonvulsant activities of some new arylhexahydropyrimidine-2,4-diones. *Arzneimittelforschung*. 2001;51:523-528.

17. Hauptmann, Luminal bei Epilepsie. *Munch Med Wochenscher*. 1912;59:1907-1909.

18. Li-Jing C, Zhi-Fenh X, Hu-Ri P, Gao L, Kyu-Yun C, Zhe-Shan. Synthesis and anticonvulsant activity of 1-Substitued-7-Benzyloxy-4,5-dihydro-1,2,4 triazolo 4,3-a quinoline. *Biol Pharm Bull*. 2005;28:1216-1220.

19. Quiroga J, Insusaty B, Anobia R, Cobo J, Sánchez A, Noguera M. New aspects on the selective synthesis of 7-arylpyrido2,3-d-pyrimidines. *Tetrahedron*. 2002;58:4873-4877.

20. Kaushik, D., Ahmad Khan, S., Chawla, G. Design & synthesis of 2-(substituted aryloxy)-5-(substitued benzylidene)-3-phenyl-2,5-dihydro-1H-1,2,4triazin-6-one as potential anticonvulsant agents. 2010; 45:3960-3969.

21. Azam F, El-gnidi B, Alkskas I. Combating oxidative stress in epilepsy: Design, synthesis, quantum chemical studies and anticonvulsant evaluation of 1-(substitued benzylidene/ ethylidene)-4-naphtalen-1-yl) semicarbazides. *Eur J Med Chem* 2010;45:2817-2826.

22. Pellok J. Treatment considerations: traditional antiepileptic drugs. *Epilepsy & Behavior*. 2002;3:18-23.

23. Kwan P, Sills GJ, Brodie MJ. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacol & Therap*. 2001;90:21-34.

24. Rodríguez C, Guevara B, Lobo, G (2010). Mecanismos de accion de los fármacos antiepilepticos. *Informe Médico*. 2010;12:321-324.

25. Peter P. De Deyn, Rudi D'Hooge, Bart Marescau and Yin-Quan Pei. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. *Epilepsy Res*. 1992;12:87-110.

26. Yonekawa W, Whittingham TS, Kupferberg HJ. (1986) Effects of antiepileptic drugs on pentylentetrazole-induced epileptiform activity in the in vitro hippocampus. *Epilepsia*. 1986;27:341-346.

Agradecimiento

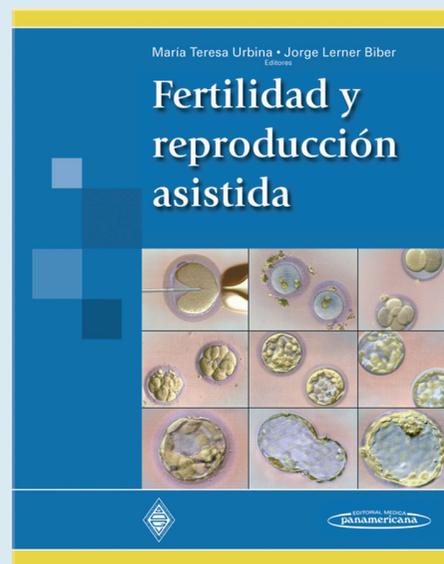
Este proyecto fue financiado por: CDCH UCV PI-06-6438-2006/1.
Fonacit: Laboratorio de Neurofarmacología de la UCV 2006000454

EDITORIAL MEDICA
panamericana

La Salud, nuestro proyecto editorial

Fertilidad y reproducción asistida

María Teresa Urbina - Jorge Lerner Biber
Editores



Avalado por la
Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Venezuela

Edificio Polar, Torre Oeste, Piso 6, Ofic. 6-C, Plaza Venezuela,
Municipio Libertador, Apartado 52.096
Teléfonos: (0212) 7931666/6906/2857/5985 Fax (0212) 7935885.
www.medicapanamericana.com

RIF: J-00120355-6