

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Desarrollo de nuevos bisfosfonatos como
agentes antiinflamatorios**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

ABIMELEK CORTES PACHECO

Director: Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín

Co-Director: Dra. María Adelina Jiménez Arellanes

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2021.

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Universidad del Papaloapan para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.



UNIVERSIDAD DEL PAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO	DEP/2020/MCQ/028
ASUNTO	Asignación de jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 17 de noviembre de 2020

C. ABIMELEK CORTES PACHECO
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DEL PAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Miguel Ángel Peña Rico	Universidad del Papaloapan	Presidente
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín	Universidad del Papaloapan	Secretario
Dr. Jorge Cornejo Garrido	Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional	Vocal
Dr. Lemuel Pérez Picaso	Universidad del Papaloapan	1er Suplente
Dra. Hermenegilda Moreno Díaz	Universidad del Papaloapan	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo. VICE-RECTORIA ACADEMICA

C.c.p. Dr. Aurelio Ramírez Hernández – Coordinador de la Maestría en Ciencias Químicas
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial,
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO	DEP/2020/MCQ/039
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 8 de diciembre de 2020

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas del **C. Abimelek Cortes Pacheco**, matrícula **18130003**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Desarrollo de nuevos bifosfonatos como agentes antiinflamatorios**", para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima. mens aperta
Bou Lo-tama. chi ji jú



Dr. Adolfo López Torres

Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Abimelek Cortes Pacheco – Estudiante
C.c.p. Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín – Director de Tesis
C.c.p. Dr. Aurelio Ramírez Hernández – Coordinador de la Maestría en Ciencias Químicas
C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTIPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38 301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

RECONOCIMIENTO

La presente Tesis se realizó en los laboratorios de Química Orgánica, Resonancia Magnética Nuclear y Análisis Instrumental de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec bajo la dirección del Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín; y en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS-Cd. México) bajo la dirección de la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes. El financiamiento del presente trabajo provino de los proyectos CONACyT CB-2017-2018 A1-S-10787, INFRA-2015-01-252013 e INFRA-2019-301144. Asimismo, se contó con la beca CONACyT con número de registro 942820 perteneciente al programa de Maestría en Ciencias Químicas con registro PNPC 00251, además del apoyo del programa Becarios en Investigación IMSS Folio 2019-15 con matrícula 99097632.

*No puedes poner un límite a nada.
Cuanto más sueñas, más lejos llegas.*

Michael Phelps

Para ti Bartolito
Iker Mathieu.

AGRADECIMIENTOS

A mi tía y madre Teresita, a mi mamá Rosita, a mis hermanos Edwin y Mateo, gracias por estar siempre a mi lado, gracias por la confianza depositada, gracias por los consejos y enseñanzas, los amo.

Infinitas gracias a mis asesores, al Dr. Oscar Abelardo por darme nuevamente su confianza. Sus enseñanzas, consejos y el apoyo durante todo el proyecto hicieron de este, un excelente trabajo. Además de un excelente profesor-investigador, también lo considero un gran amigo, gracias. A la Dra. Adelina Jiménez por siempre incentivar me a ser mejor, a prepararme y a trabajar duro. Gracias por la hospitalidad y el material brindado durante las estancias en CDMX, un verdadero gusto trabajar con usted.

A mis compañeros de generación: Marco, Samuel y Brandon, todos muy diferentes en sus estilos, pero lindas personas de las cuales aprendí mucho. Y por supuesto a Ceci (May Montor), te admiro y te quiero muchísimo, gracias por todos los cafés, las pláticas y esos bonitos recuerdos, siempre te llevaré en mi cora.

También a los compañeros de Biotecnología, con especial agradecimiento a Lore por sus lindas platicas y por supuesto a Sofi, por darme la mano y caminar juntos.

A la amigalleta MC. Carmen Juárez por ser una excelente amiga y compañera de laboratorio; a Margaret por su amistad, a mis hermanos académicos Flavio y Reyna por el apoyo reciproco a la hora de trabajar.

Especial agradecimiento al Dr. Adolfo por el apoyo en el análisis de las muestra por Espectrometría de Masas pero además, por todos los consejos brindados durante esta estadía de más de dos años.

A mis revisores de tesis, por tomarse el tiempo de leer el manuscrito y hacer valiosas aportaciones al trabajo, gracias al Dr. Miguel Ángel Peña (UNPA), Dr. Lemuel Pérez (UNPA) y al Dr. Jorge Cornejo (IPN).

A todos los que apoyaron este trabajo, Gracias Totales.

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN DE TESIS

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto de investigación dieron lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos.

Cortes-Pacheco, A., Jiménez-Arellanes, M. A., Palacios-Can, F. J., Valcarcel-Gamiño, J. A., Razo-Hernández, R. S., del Carmen Juárez-Vázquez, M., ... & Ramírez-Marroquín, O. A. (2020). Synthesis, antiinflammatory activity, and molecular docking studies of bisphosphonic esters as potential MMP-8 and MMP-9 inhibitors. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 16(1), 1277-1287.

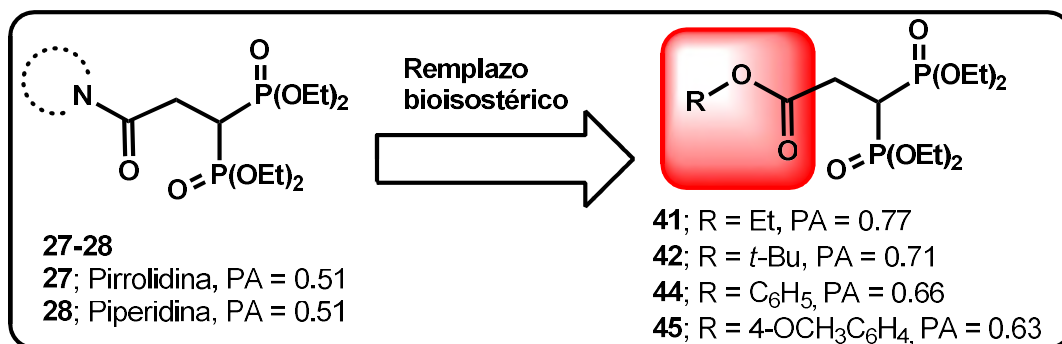
Abimelek Cortes Pacheco, Oscar Abelardo Ramírez Marroquín, Grazielle Guidolin Rossi, Marli Matiko Anraku de Campos, Roberto Christ Vianna Santos. Mecanosíntesis y actividad antibacteriana de Piperlotinas A, C y derivados. En el marco de la XV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica celebrada los días 11 y 12 de abril de 2019 en la ciudad de Cuernavaca, Mor.

Cortes-Pacheco, A., Jiménez-Arellanes, M. A., Palacios-Can, F. J., Valcarcel-Gamiño, J. A., Razo-Hernández, R. S., del Carmen Juárez-Vázquez, M., ... & Ramírez-Marroquín, O. A. (2020). Synthesis, antiinflammatory activity, and molecular docking studies of bisphosphonic esters as potential MMP-8 and MMP-9 inhibitors. First LatinXChem Twitter Conference, 7 de septiembre de 2020.

RESUMEN

Mediante el proceso inflamatorio, el sistema inmune puede causar daños colaterales cuando se sobreactiva o no es terminado apropiadamente, dando lugar a patologías nuevas o anteriores. El tratamiento de la inflamación cuando se asocia a enfermedades crónicas puede ser prolongado y los fármacos empleados generan diversos efectos secundarios como la inmunosupresión o daño hepático, lo que ocasiona un impacto negativo en la calidad de vida de las personas que la padecen y un aumento en los costos de salud pública. En la búsqueda de mejores agentes farmacológicos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en este trabajo se propone a los bisfosfonatos (Bp) como moléculas con actividad antiinflamatoria. En la literatura existen reportes de Bp como inhibidores de blancos importantes en el desarrollo de la inflamación como citoquinas, quinasas y metaloproteinasas de matriz. Recientemente, en el grupo de trabajo se desarrollaron nuevos Bp con actividad antiinflamatoria por vía oral y tópica (moléculas **27** y **28**) comparables al fármaco indometacina. Esta importante actividad antiinflamatoria condujo a centrar nuestra atención en la modificación estructural de los derivados **27** y **28** con el fin de encontrar derivados más potentes y de baja toxicidad.

Por lo anterior, en este trabajo se diseñaron, sintetizaron y evaluaron nuevos bisfosfonatos. Para el diseño, se propusieron 19 moléculas estructuralmente relacionadas a **27** y **28**. Utilizando el diseño asistido por computadoras, se seleccionaron aquellas que combinaran criterios de predicción de alta actividad antiinflamatoria (PASSonline), baja toxicidad (Acutox) y efectos secundarios (Adverpred), además de reunir características para tener buena solubilidad y permeabilidad (reglas de Lipinski, Molinspiration).



De este cribado se seleccionaron a los compuestos **41-42** y **44-45**, concluyendo en que el remplazo bioisostérico de una amida por un éster puede potenciar el efecto antiinflamatorio.

Acto seguido, los compuestos objetivos fueron sintetizados en dos etapas de reacción. La primera inició con la reacción entre diferentes alcoholes y bromuro de bromoacetilo para formar el correspondiente éster **34-37** con rendimientos de 42-82%. Posteriormente, el tratamiento de tetraetilmetilendifosfonato con NaHMDS bajo atmósfera de nitrógeno, seguido por la adición de los ésteres **34-37** permitió la obtención de los compuestos objetivos con rendimientos mayores al 44%. El análisis por espectroscopia IR, EMAR y RMN (^1H , ^{13}C y ^{31}P) confirmó la estructura de los bisfosfonatos **41-42** y **44-45**. Con los compuestos sintetizados, se procedió a la evaluación biológica. Cuando los bisfosfonatos **41-42** y **44-45** se evaluaron *in vivo* en el modelo de carragenina (administración vía oral) se encontró que **41** y **42** presentaron mayor actividad antiinflamatoria en comparación con **27** y **28**, y una actividad comparable al fármaco de referencia indometacina. Por su parte, en el modelo de TPA (administración vía tópica) se encontró que **44** y **45** presentaron actividad antiinflamatoria comparable con **27** y **28** e indometacina. Finalmente, un estudio de toxicidad aguda realizado en un periodo de 14 días mostró que a dosis única de 50 y 100 mg/kg, los compuestos **41-42** y **44-45** no generan letalidad.

En conclusión, el reemplazo bioisostérico del grupo funcional amida por un éster alifático o aromático en los compuestos **27** y **28**, mejora la actividad antiinflamatoria en el modelo de administración vía oral y mantiene el efecto al ser administrados por vía tópica.

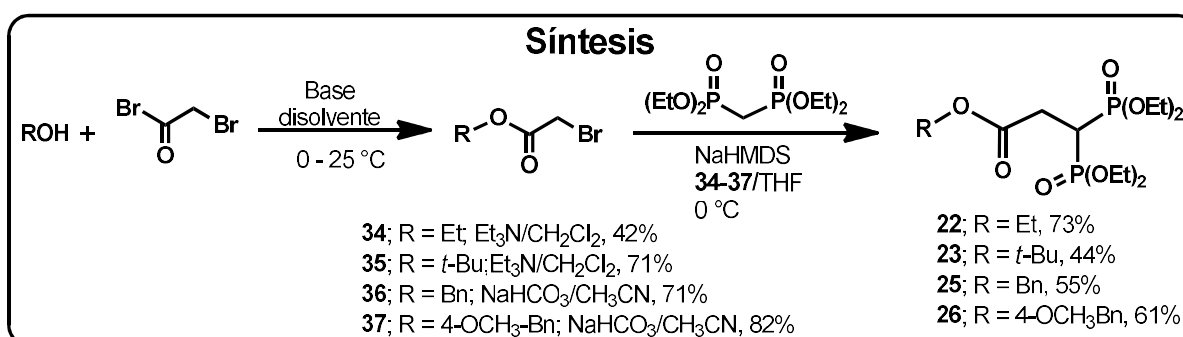


TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	20
LISTA DE ABREVIATURAS.....	21
1. INTRODUCCIÓN	23
2. ANTECEDENTES	24
2.1. Bioquímica de la inflamación	25
2.2. Enfermedades asociadas a la inflamación	27
2.3. Farmacoterapia de la inflamación.....	30
2.3.1. Acetaminofén.....	31
2.3.2. Fármacos Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs).....	32
2.3.3. Opioides.....	33
2.3.4. Glucocorticoides.....	34
2.4. Terapias biológicas.....	34
2.5. Diseño de nuevas sustancias bioactivas mediante técnicas <i>in silico</i>	35
2.5.1. Predicción de actividad farmacológica (farmacodinamia) mediante el programa PASS.....	36
2.6. Modelos biológicos para la evaluación de compuestos antiinflamatorios.....	39
2.7. Importancia de fosfonatos, bisfosfonatos y metodologías de síntesis.	44
2.7.1. Síntesis de bisfosfonatos.....	44
2.8. Fosfonatos, bisfosfonatos y sus derivados como antiinflamatorios.	48
2.8.1. Evaluaciones <i>in vitro</i>	49
2.8.2. Evaluaciones <i>in vivo</i>	53
3. JUSTIFICACIÓN	58

4. HIPÓTESIS	59
5. OBJETIVO GENERAL	60
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
7. METODOLOGÍA	61
7.1. Diseño y síntesis de los compuestos objetivo	61
7.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria aguda de los compuestos objetivo.	62
7.3. Determinación de la toxicidad aguda de los compuestos objetivo. ..	64
7.4. Análisis estadístico	65
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
8.1.1. Predicción de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 34-52.	66
8.1.2. Predicción de biodisponibilidad oral de los compuestos 34-45. ..	68
8.1.3. Predicción de toxicidad de los compuestos 34-45.	70
8.2. Síntesis de los compuestos objetivo 41-42 y 44-45.	73
8.3. Resultados de la actividad antiinflamatoria aguda de los bisfosfonatos 41-42 y 44-45.	81
8.4. Determinación de la toxicidad aguda de los bisfosfonatos 41-42 y 44-45.	92
9. CONCLUSIONES	97
10. REFERENCIAS	98
11. ANEXO	105
11.1. Parte experimental	105
11.1.1. Información general	105
11.2. MÉTODOS DE SÍNTESIS	107
11.2.1. Síntesis del alcohol 4-metoxibencílico.	107

11.2.2. Procedimiento general para la síntesis de los bromocetoésteres	
55-58.	107
Bromoacetato de etilo (55).	108
Bromoacetato de terbutilo (56).	108
Bromoacetato de bencilo (57).	108
Bromoacetato de 4-metoxibencilo (58).	109
11.2.3. Procedimiento general para la síntesis de los bisfosfonatos	
41-42 y 44-45.	110
Síntesis de 3,3-bis (dietoxifosforil) propanoato de etilo (41).	110
Síntesis de 3,3-bis (dietoxifosforil) propanoato <i>ter</i>-butilo (42).	111
Síntesis de 3,3-bis (dietoxifosforil) propanoato de bencilo (44).	112
Síntesis de 3,3-bis(dietoxifosforil) propanoato de 4-metoxibencilo (45).	
.....	113
11.3. ESPECTROS.	114

ESQUEMAS

Esquema 1. Estrategia de síntesis para la obtención de bisfosfonatos.....	45
Esquema 2. Síntesis de bisfosfonatos inhibidores de la enzima retrotranscriptasa.	46
Esquema 3. Síntesis de bisfosfonatos análogo del pamidronato.	46
Esquema 4. Síntesis del ácido alendrónico.....	47
Esquema 5. Síntesis de bisfosfonatos derivados de pirrolidina y piperidina.	47
Esquema 6. Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los productos 41-42 y 44-45	62
Esquema 7. Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los compuestos 41-42 y 44-45	73
Esquema 8. Ensayo 1. Síntesis del bromoacetato de etilo 55	74
Esquema 9. Ensayo 2. Síntesis del bromoacetato de etilo 55	74
Esquema 10. Síntesis del alcohol 4-metoxibencílico.....	77
Esquema 11. Síntesis del bisfosfonato 41	78
Esquema 12. Síntesis de los bisfosfonato 41-42 y 44-45	80

FIGURAS

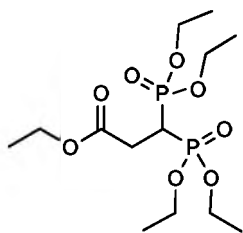
Figura 1. Bioquímica de la inflamación. a) Reconocimiento de la infección, b) transmisión de una señal al núcleo de la célula y transcripción de proteínas proinflamatorias, c) migración de células efectoras hacia el sitio de daño, d) vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, e) creación de ambiente citotóxico hacia el agente infeccioso o el tejido dañado y f) polarización y resolución de la inflamación. Modificada de Ashley y colaboradores, 2012.	27
Figura 2. Principales agentes antiinflamatorios.	31
Figura 3. Estructura de acetaminofén y su metabolito tóxico <i>N</i> -acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI).	32
Figura 4. Fármacos Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs) A) no selectivos y B) selectivos.	33
Figura 5. Tramadol, un opioide empleado en el tratamiento de la inflamación.	33
Figura 6. Prednisolona y dexametasona, glucocorticoides empleados en el tratamiento de la inflamación.	34
Figura 7. Representación del fenol por los descriptores MNA de cero, primer y segundo nivel (MNA/0, MNA/1, MNA/2).	37
Figura 8. Estructura general del grupo fosfato y fosfonato.	44
Figura 9. Estructura de algunos fosfonatos y bisfosfonatos con actividad biológica.	48
Figura 10. Fosfonatos inhibidores de la enzima CDK9.	50
Figura 11. Fosfonatos inhibidores de la producción de EROs, NO y TNF- α	51
Figura 12. Aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	52
Figura 13. Bisfosfonatos inhibidores de diferentes MMPs.	53
Figura 14. α -hidroxifosfonatos con actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	53
Figura 15. Bisfosfonatos con actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	54
Figura 16. Bisfosfonatos α,β -insaturados con actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> . .	54
Figura 17. Compuestos diseñados 23-26	55
Figura 18. Modificación molecular de los bisfosfonatos 27-28 abordada en este proyecto de tesis.	57
Figura 19. Programas bioinformáticos utilizados en este trabajo.	61
Figura 20. Moléculas 34-52 propuestas para este trabajo.	66
Figura 21. Resultados de la predicción de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 34-52	67
Figura 22. Moléculas seleccionadas en el primer cribado.	68
Figura 23. Actividad antiinflamatoria, DL ₅₀ y toxicidad de los compuestos 34-45 . 72	
Figura 24. Moléculas seleccionadas en tres etapas (actividad antiinflamatoria, DL ₅₀ y toxicidad en riñón).	73
Figura 25. TLC del crudo de reacción.	75
Figura 26. Espectro de IR del bromoacetato de etilo 55	75

Figura 27. Espectro de IR del bromoacetato de etilo 57	77
Figura 28. TLC del crudo de reacción.	78
Figura 29. Espectro HRMS TOF MS ES+ del bisfosfonato 41	79
Figura 30. Espectro RMN de ¹ H del compuesto 41	80
Figura 31. Moléculas seleccionadas para la evaluación biológica.....	81
Figura 32. Actividad antiinflamatoria de los compuestos 41-42 y 44-45 en el modelo de carragenina en ratones hembra Balb/C durante las 24 horas.	83
Figura 33. Actividad antiinflamatoria de los compuestos 41-42 y 44-45 en el modelo de carragenina determinado en ratones macho Balb/C durante las 24 horas.....	85
Figura 34. Porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria aguda oral de los compuestos 41 y 42 a diferentes concentraciones en el modelo de carragenina en ratones hembra Balb/C. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo.....	87
Figura 35. Comparación estructural entre los compuestos 44 y 45 en el modelo de TPA.	90
Figura 36. Porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria aguda tópica de los compuestos 44 y 45 en el modelo de TPA en ratones hembra Balb/C. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo. ^a vs. Indometacina. ^b vs. 44 (2 mg/oreja). ^c vs. 45 (1 mg/oreja). ^d vs. 45 (2 mg/oreja).	91
Figura 37. Ganancia de peso de ratones hembra Balb/C en la evaluación de toxicidad aguda de los compuestos 41-42 y 44-45 durante un periodo de 14 días. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo. Tratamientos: ^a vs Vehículo;	93

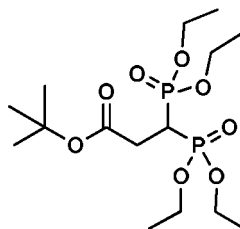
TABLAS

Tabla 1. Comparación de los costos de adquisición de distintos tratamientos biológicos del IMSS para el tratamiento de enfermedades inflamatorias ²⁷	35
Tabla 2. Regla cinco de Lipinski.	38
Tabla 3. Resultados de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 23-28	56
Tabla 4. Resultados del análisis de predicción de absorción pasiva de los compuestos 34-45 utilizando el programa Molinspiration.....	69
Tabla 5. Clasificación de toxicidad oral aguda de las sustancias OECD TG-423. 71	
Tabla 6. Resultados de la actividad antiinflamatoria, DL ₅₀ y toxicidad de los compuestos 34-45	72
Tabla 7. Condiciones de reacción para la obtención de los compuestos 55-58	76
Tabla 8. Resultados de la actividad antiinflamatoria de los compuestos de partida 27 y 28 en el modelo de carragenina en ratones hembra Balb/C a la quinta hora del tratamiento.	82
Tabla 9. Resultados de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 41-42 y 44-45 en el modelo de carragenina en ratones Balb/C a la quinta hora del tratamiento.	84
Tabla 10. Comparación de la actividad antiinflamatoria obtenida <i>in silico</i> (programa PASSonline) y la experimental en el modelo de carragenina a la quinta hora del tratamiento.	86
Tabla 11. Actividad antiinflamatoria de los compuestos 41-42 y 44-45 en el modelo de TPA en ratones Balb/C a la quinta hora del tratamiento.	88
Tabla 12. Efecto de los compuestos 41-42 y 44-45 sobre la ganancia de peso corporal (g) con una dosis única administrada vía i.g. en ratones hembra Balb/C.94	
Tabla 13. Efecto de los compuestos 41-42 y 44-45 sobre el peso de los órganos (g) con una dosis única administrada vía i.g. en ratones hembra Balb/C.	95
Tabla 14. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 41-42 y 44-45 en el modelo de carragenina en ratones hembra Balb/C.	131
Tabla 15. Resultados de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 41-42 y 44-45 en el modelo de carragenina en ratones macho Balb/C.	131
Tabla 16. Resultados de la ganancia de peso en la evaluación de toxicidad aguda de los compuestos 41-42 y 44-45 en ratones hembra Balb/C durante un periodo de 14 días.	132

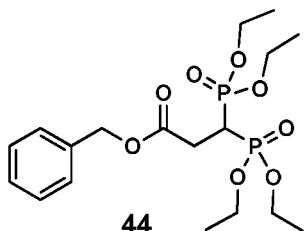
ÍNDICE DE FIGURAS



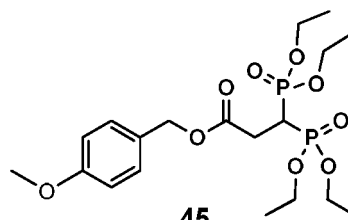
41



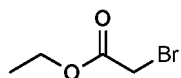
42



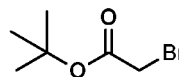
44



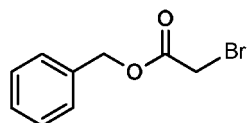
45



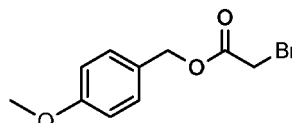
55



56



57



58

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Desplazamientos químicos
AA	Ácido araquidónico
AINEs	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Adenomatous polyposis coli
AR	Artritis reumatoide
ASB	Albumina de suero bovino
BP	Bisfosfonatos
c	Señal cuadruple
CC	Cromatografía en columna
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CFA	Adyuvante completo de Freund (por sus siglas en inglés)
CH₂Cl₂	Diclorometano
CICUAL	Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
COX	Ciclooxigenasas
d	Señal doble
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daños, (por sus siglas en inglés)
DE₅₀	Dosis efectiva media
DL₅₀	Dosis letal media
DSS	Sulfato de sodio de dextrano
DT2	Diabetes tipo 2
EA	Espondilitis anquilosante
Equiv.	Equivalentes
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ESI	Ionización por electronebulización
FAME	Fármacos modificadores de la enfermedad
HCOOH	Ácido fórmico
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (por sus siglas en inglés)
IL	Interleucina
i.m	Vía intramuscular
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
i.v	Vía Intravenosa
J	Constante de acoplamiento
Log P	Coeficiente de partición
LOX	Lipooxigenasas
m	Multiplete
MeCN	Acetonitrilo

MeOH	Metanol
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MNA	Vecindades multinivel de átomos
MPO	Mieloperoxidasa
NaBH₄	Borohidruro de sodio
NaBr	Bromuro de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NaHMDS	Hexametildisilazuro de sodio
NAPQI	<i>N</i> -acetil- <i>p</i> -benzoquinonaimina
Na₂SO₄	Sulfato de sodio
NET	Trampas extracelulares del neutrófilo (por sus siglas en inglés)
NH₄Cl	Cloruro de amonio
NO	Óxido nítrico
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico y la
TG	Guía de Pruebas
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos, (por sus siglas en inglés)
PKC	Proteína Quinasa C
ppm	Partes por millón
PPRs	Receptores de reconocimiento de patrones (por sus siglas en inglés)
QSAR	Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (por sus siglas en inglés)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN ³¹P	Resonancia Magnética Nuclear de fósforo 31
s	Señal sencilla
SNK	Student Newman Keuls
t	Señal triple
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina (por sus siglas en inglés)
TMS	Tetrametilsilano
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	13-acetato12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
uv-vis	Ultra violeta-visible

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico o también llamado sistema inmunitario es el conjunto de tejidos, células y moléculas que funcionan como resistencia ante las infecciones o daños físicos y químicos. Su principal función es la de erradicar infecciones al momento o prevenir futuras, además de restaurar el tejido dañado¹⁻³.

Una característica muy particular en la activación del sistema inmune es la inflamación, un proceso de múltiples etapas que bajo condiciones normales es benéfica para el mantenimiento de la homeostasis, pero puede ser deletérea cuando existe una baja o prolongada respuesta inmune, la cual se asocia con muchas enfermedades como el cáncer, la artritis o diabetes, entre otros¹⁻⁴.

Dentro de los tratamientos para la inflamación existe una amplia gama de fármacos para aliviar los síntomas y detener la progresión. El principal problema de los tratamientos radica en que la mayoría está asociado a diversos efectos secundarios como malestar estomacal, úlcera, inmunosupresión, nefro y hepatotoxicidad⁵.

En vista de lo anterior, existe la necesidad de desarrollar nuevos y mejores fármacos que superen estas desventajas. En el presente trabajo se propuso sintetizar y evaluar la actividad antiinflamatoria de nuevos bisfosfonatos, con miras a contribuir en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios.

2. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmunológico actúa para combatir infecciones o tejidos dañados; sin embargo, en ocasiones pueden existir algunas discrepancias en su funcionamiento.

En situaciones en las que se tiene una baja o defectuosa reacción coordinada del sistema inmunológico (repuesta inmunitaria), se puede aumentar la proclividad a infecciones que ponen en riesgo la vida de las personas; por el contrario, una respuesta prolongada o excesiva, puede predisponer a enfermedades alérgicas, autoinmunitarias y otras enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide².

El sistema inmunitario puede ser estimulado por vacunas para responder a infecciones, sin embargo, no es su única función, también actúa como barrera para el trasplante y la terapia génica, frente a tumores, injertos tisulares y a xenobióticos; además, participa en la eliminación de células muertas y la reparación tisular².

La manera en cómo el sistema inmunológico responde a estos daños puede ser dividida en dos partes, inmunidad innata e inmunidad adaptativa.

La inmunidad innata es un mecanismo de defensa desarrollado por organismos multicelulares como un proceso de supervivencia durante su evolución en respuesta a infecciones microbianas, así como la eliminación y reparación de células dañadas y necrosadas. Este mecanismo es el primer paso crítico en la defensa del hospedero contra las infecciones y el inicio de la reparación de tejido afectado. Está compuesta de barreras epiteliales, células y antibióticos naturales. Las dos principales reacciones celulares de este tipo de inmunidad son la inflamación y la defensa antivírica, además, sirven para estimular y potenciar la inmunidad adaptativa cuando esta ha sido superada por infecciones microbianas¹⁻⁴.

En cambio, la inmunidad adaptativa es un mecanismo de defensa más específico que se adapta a los agentes extraños invasores y está compuesto de células denominadas linfocitos y sus diversos productos, entre estos están los anticuerpos, que son sustancias capaces de reconocer secuencias únicas de antígenos. Su gran relevancia radica en su especificidad, diversidad y memoria. La especificidad hace mención a la capacidad de discriminar entre un gran número de antígenos diferentes. Por otra parte, la diversidad se refiere a que existen más de un millón de

linfocitos con diferentes anticuerpos, lo que le da la capacidad de reconocer un número equivalente de antígenos. Finalmente, existen linfocitos que cuentan con la capacidad de reconocer antígenos específicos y ante exposiciones repetidas de ellos, la respuesta inmunitaria es mayor y más eficaz. Sin embargo, debido a las grandes y rápidas mutaciones de los microorganismos cada vez se generan nuevos antígenos, para lo cual el sistema inmune produce un tipo de células que le hacen frente, este otro tipo de células se denominan linfocitos vírgenes y su función es identificarlos y expresar nuevos anticuerpos para los antígenos. A medida que estos linfocitos reconocen nuevos antígenos, su descendencia contiene la misma información genética y es capaz de responder ante situaciones similares, este proceso lleva por nombre memoria inmunitaria y le da la capacidad al organismo de combatir infecciones persistentes y recurrentes¹⁻⁴.

La característica más importante e indicativa de la activación del sistema inmune es la inflamación, y ésta comprende una serie de etapas que se desencadena en una parte del organismo o en los tejidos de un órgano, en donde participan los eventos antes mencionados.

2.1. Bioquímica de la inflamación

La inflamación es parte del proceso del sistema inmune para defender al cuerpo de agentes nocivos, como bacterias y virus y/o de daños químicos o físicos. El aumento de la temperatura corporal, el enrojecimiento, la hinchazón, el dolor y la pérdida de la función, son señales comunes que identifican esta condición y se denominan signos cardinales de la inflamación⁶.

De manera general, la inflamación es iniciada por agentes tóxicos e infecciosos como respuesta del sistema inmune. Hablando de la inflamación infecciosa, esta comienza con el reconocimiento de la infección por proteínas transmembranales llamados receptores de reconocimiento de patrones (PPRs, por sus siglas en inglés), encontradas en todas las células nucleadas de mamíferos, capaces de reconocer agentes biológicos (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs por sus siglas en inglés) y daños físicos o químicos (patrones moleculares asociados a daños, DAMPs por sus siglas en inglés) (Figura 1-a)⁴. Estas

interacciones generan un estímulo, por ejemplo la activación de la Proteína Cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés), el cual resulta en la transmisión de una señal al núcleo de la célula (Figura 1) reflejándose en la expresión de genes inflamatorios a través de la transcripción y traducción de proteínas proinflamatorias denominadas citocinas, tales como interleucina (IL) 1, 2, 6, 7, 17 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), entre otros³. La función de las citocinas es marcar el sitio de daño para el reclutamiento de células efectoras como neutrófilos y monocitos (Figura 1-c). El recorrido que realizan las células efectoras hacia el sitio de daño es conocido como diapédesis y es dividido en las siguientes etapas: marginación, rodamiento y adhesión. La marginación es el proceso del movimiento de las células efectoras del centro a la periferia de los vasos sanguíneos, siguiendo la exudación de fluido hacia el sitio dañado. Una vez en la periferia, el rodamiento de los leucocitos permite la adhesión hacia células endoteliales vasculares. El rodamiento y la adhesión son producto de la interacción del neutrófilo con glicoproteínas presentes en la superficie de células endoteliales llamadas selectinas (Figura 1-c). La adherencia es necesaria para que posteriormente ocurra la diapédesis.

A la par, una vez identificado el sitio de daño, las células residentes del tejido como macrófagos y mastocitos se encargan de la liberación de histaminas, leucotrienos y prostaglandinas a través de la catálisis de ácido araquidónico por enzimas como Ciclooxygenasas (COX) y Lipooxygenasas (LOX). Las sustancias generadas causan vasodilatación e incrementan la permeabilidad vascular, para así facilitar el acceso de células efectoras y fluido rico en proteínas (diapédesis y quimiotaxis) (Figura 1-d).

Por último, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y monocitos tienen la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (EROs), especies nitrogenadas y proteasas como metaloproteinasas de matriz, para crear un ambiente citotóxico hacia el agente infeccioso o el tejido dañado (Figura 1-e). Lo anterior se logra por el proceso de fagocitosis de partículas extrañas, que posteriormente son sacrificados por apoptosis, en un proceso más extenso denominado polarización y resolución de la inflamación (Figura 1-f)^{1,4,7,8}, o también, pueden liberar el contenido citotóxico al ambiente extracelular. Esto es una

característica particular de los neutrófilos, células que expulsan su contenido intracelular para formar una especie de red capaz de atrapar microorganismos patógenos. La red se compone de histonas (proteínas antimicrobianas) y otros componentes como las enzimas (proteasas), EROs y especies nitrogenadas, que en conjunto se le denominan trampas extracelulares del neutrófilo (NET, del inglés neutrophil extracellular traps)⁹.

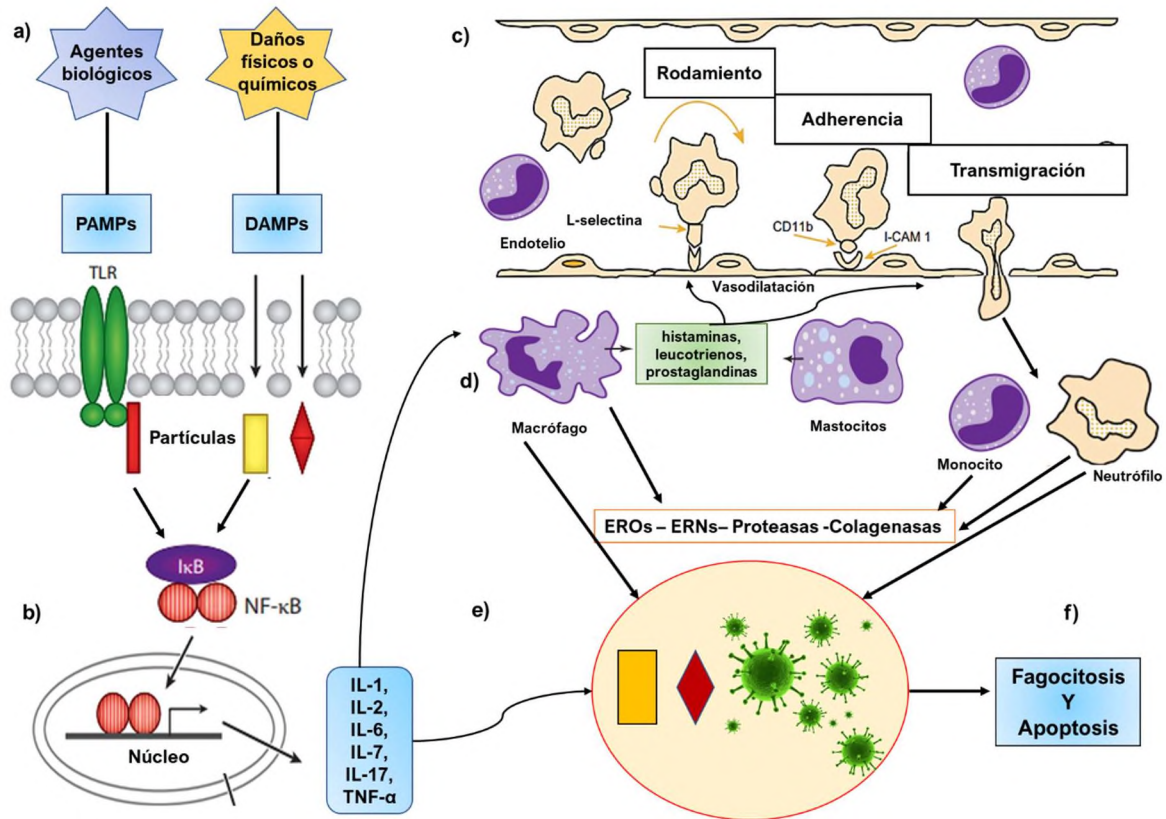


Figura 1. Bioquímica de la inflamación. a) Reconocimiento de la infección, b) transmisión de una señal al núcleo de la célula y transcripción de proteínas proinflamatorias, c) migración de células efectoras hacia el sitio de daño, d) vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, e) creación de ambiente citotóxico hacia el agente infeccioso o el tejido dañado y f) polarización y resolución de la inflamación. Modificada de Ashley y colaboradores, 2012.

2.2. Enfermedades asociadas a la inflamación

El mal funcionamiento del sistema inmunológico, conocido como inmunodeficiencia, puede deberse a anomalías génicas de uno o más componentes del sistema inmunitario (inmunodeficiencias congénitas o primarias) o a factores externos como infecciones, anomalías nutricionales o tratamientos médicos (inmunodeficiencias adquiridas o secundarias)².

La inflamación, como respuesta del sistema inmune juega un papel clave en el comienzo y desarrollo de muchas enfermedades que incluyen la obesidad, artritis, diabetes tipo 2 y cáncer entre otras¹⁰⁻¹².

El cáncer se caracteriza por un descontrol en el proceso de división celular ocasionado un mayor número de células anómalas que tienen la capacidad de infiltrarse y destruir el tejido corporal normal. Este descontrol es producto de mutaciones genéticas que pueden ser ocasionadas por diversos factores como la inflamación. Para ello, es necesario recordar que como parte natural del proceso inflamatorio hay una etapa en la que células efectoras como neutrófilos son capaces de fagocitar agentes invasores o células dañadas y entonces, intracelularmente crear un ambiente citotóxico para degradarlas, cuyas especies con este potencial son radicales libres del oxígeno (como el anión superóxido, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno) o del nitrógeno (óxido nítrico) así como moléculas con actividad microbicida como la mieloperoxidasa, enzima que utiliza el peróxido de hidrógeno como sustrato para la producción principalmente de ácido hipocloroso, compuestos altamente tóxicos que aumentan la actividad microbicida¹³. El problema en esta etapa es que también el contenido celular se puede liberar hacia el exterior, en un proceso denominado trampas extracelulares de neutrófilos o NETs, el cual funciona como una red que tiene la capacidad de atrapar microorganismos. Sin embargo, también interactúa con células del tejido con la posibilidad de generar daño a nivel de DNA, ocasionando mutaciones que lleven a la célula a alterar factores de crecimiento o condiciones para el crecimiento descontrolado característico del cáncer^{2,9}.

Por ejemplo, se conoce que una inflamación permanente y crónica del intestino como la colitis, pueden contribuir al desarrollo de cáncer colorrectal. También se ha demostrado que la inflamación puede actuar como un promotor de tumores y estudios recientes sugieren que el daño causado al DNA durante un proceso inflamatorio puede ser el vínculo entre colitis crónica y la iniciación del tumor. Por ejemplo, dentro de estos daños se puede encontrar mutaciones en el gen supresor de tumores APC (Adenomatous polyposis coli), el cual codifica a la proteína APC. La pérdida de la función del gen está asociada al desarrollo de poliposis

adenomatosa familiar, un síndrome hereditario que predispone a un alto riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal^{10,14,15}.

Otras moléculas sobreexpresadas halladas en células cancerígenas, que también forman parte del proceso inflamatorio, son las citocinas. Por mencionar algunas, las citocinas IL-1, IL-6 y TNF, conducen a la activación de NF- κ B, STAT3, YAP y Notch, los cuales, son factores de transcripción que juegan un papel importante en la promoción de la supervivencia y proliferación celular¹⁵⁻¹⁷.

Otro padecimiento relacionado a la inflamación es la obesidad, una enfermedad de etiología multifactorial que se desarrolla cuando existe un desequilibrio entre la energía obtenida a través del consumo de alimento y la energía gastada, la cual posteriormente se acumula en forma de grasa en el tejido adiposo. El tejido adiposo está formado por células llamadas adipocitos, los cuales tiene la capacidad de almacenar contenido lipídico en hasta un 95% de su masa celular, aumentando de tamaño y número. Por lo anterior, el fenómeno de hiperplasia e hipertrofia se presenta en el tejido adiposo y al ocupar un volumen mayor, el suministro de sangre a los adipocitos puede reducirse, ocasionado hipoxia, que posteriormente ocasiona necrosis en la célula y por ende, genera la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, provocando la producción de mediadores proinflamatorios. Entre ellos, las citocinas TNF- α e IL-6 generados por macrófagos y la hormona adiponectina sintetizada por los adipocitos. El resultado es una inflamación sistémica generalizada que puede originar otras enfermedades como la diabetes tipo 2 (DT2)^{12,18,19}.

Por otro lado, la DT2, se caracteriza por una deficiencia en la secreción o acción de la insulina. La insulina es una hormona que facilita el transporte de glucosa a las células para utilizarla como fuente de energía. Cuando esta hormona no logra su cometido, una concentración elevada de glucosa en sangre estará presente y puede conducir al desarrollo de DT2. Al unirse la insulina a su receptor, genera una cascada de señalización que permite el paso y metabolismo de glucosa, no obstante, se ha demostrado que TNF- α es capaz de inducir resistencia a la insulina.

El mecanismo molecular de la resistencia a la insulina inducida por TNF- α puede implicar una fosforilación excesiva de la quinasa c-Jun NH₂-terminal (JNK), concomitante con una reducción en la fosforilación del receptor de insulina (IRS-1). JNK se activa a través de la proteína MAP4K4 estimulada por TNF- α , y es objetivo ampliamente reconocido en la regulación negativa de la señalización de la insulina a los puntos finales metabólicos, por tanto, los supresores de la señalización de JNK pueden mejorar la acción de la insulina y prevenir defectos en el metabolismo de la glucosa, como la DT2¹².

Por otra parte, la artritis se define como una enfermedad articular inflamatoria, autoinmune, crónica y de curso progresivo. Su etiología aun no queda clara, no obstante, se ha asociado a factores como la predisposición genética, presencia de agentes infecciosos (bacterias y virus) y a los hábitos alimenticios. Lo que sí se conoce, es que cursa con un proceso inflamatorio crónico que afecta de manera directa al revestimiento sinovial de las articulaciones⁷.

Actualmente la AR no tiene cura, no obstante, existe una amplia gama de fármacos para aliviar los síntomas y avance de esta enfermedad, dentro de los cuales se encuentran los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), glucocorticoides, opioides y fármacos modificadores de la enfermedad (FAME).

2.3. Farmacoterapia de la inflamación

Como se pudo analizar anteriormente, la inflamación es una respuesta inmunológica muy compleja y tiene diferentes etapas en las que se puede detener o disminuir el proceso inflamatorio, razón por la cual existe un gran número de fármacos antiinflamatorios.

Después del descubrimiento del ácido acetilsalicílico, el primer fármaco antiinflamatorio inhibidor de las isoformas 1 y 2 de la enzima COX, diferentes fármacos fueron sintetizados posteriormente, dentro de los cuales se encuentran los opioides, glucocorticoides y AINEs (Figura 2).

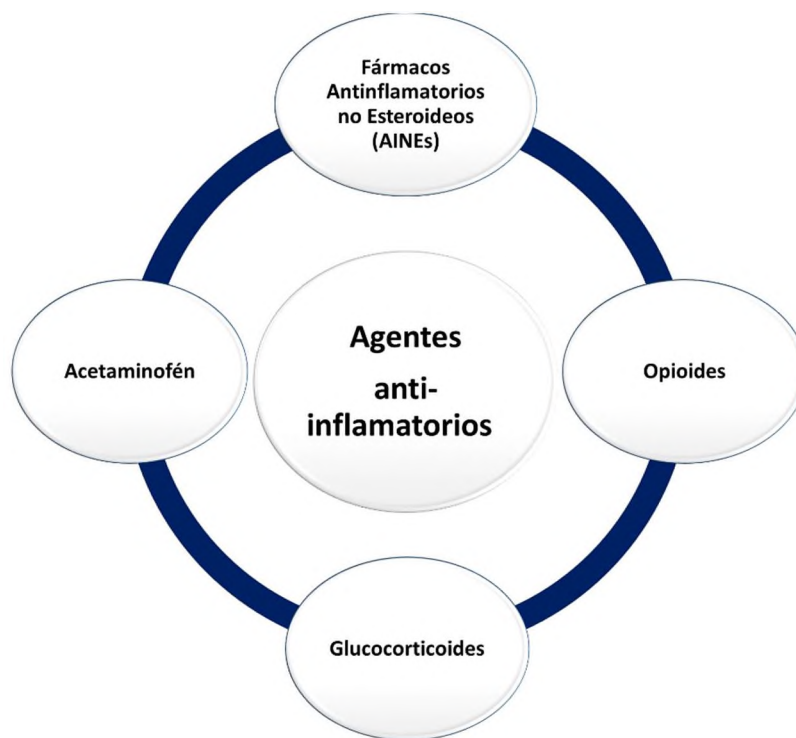


Figura 2. Principales agentes antiinflamatorios.

2.3.1. Acetaminofén.

Acetaminofén o paracetamol (Figura 3), es el fármaco más utilizado por considerarse relativamente seguro. Inhibe las enzimas óxido nítrico sintasa y COX, y también actúa como antagonista del receptor de sustancia P, un neuropéptido involucrado en la percepción del dolor. Los efectos del paracetamol en la inflamación son mínimos por su poca capacidad para inhibir a la enzima COX, actuando mejor como analgésico. Al parecer sólo inhibe la COX en un entorno con poco peróxido, lo cual explica su poca actividad antiinflamatoria, dado que los sitios de inflamación contienen elevadas concentraciones de EROs²⁰.

Aunque es relativamente seguro, estudios demuestran que puede aumentar la probabilidad o la progresión de una enfermedad renal, así como hepatotoxicidad. Esto es asociado a un metabolito, el NAPQI (Figura 3), un compuesto altamente electrófilo que reacciona fácilmente con glutatión o grupos tiol de proteínas en una adición tipo Michael. El ataque de los grupos tiol de proteínas hepáticas y la posterior formación de aductos se menciona con frecuencia en el mecanismo de

hepatotoxicidad por acetaminofén, por lo cual no se recomienda su administración por periodos prolongados ²¹.

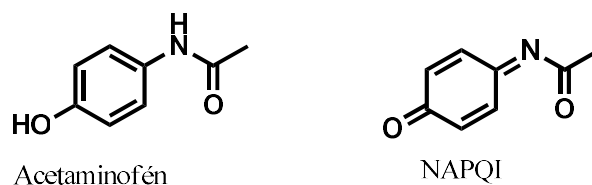


Figura 3. Estructura de acetaminofén y su metabolito tóxico *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina (NAPQI).

2.3.2. Fármacos Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs).

Son usados como fármacos de segunda línea para el alivio de dolores moderados a fuertes. Actúan como inhibidores de COX-1 y COX-2. La primera es una forma constitutiva que aparece en vasos sanguíneos, estómago y riñones, mientras que la segunda isoforma se presenta en situaciones de inflamación por citocinas y mediadores inflamatorios.

Los AINEs se clasifican en 2 tipos: selectivos (inhiben COX-2) y no selectivos (inhiben COX-1 y COX-2). Dentro de los no selectivos se encuentran el ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno, indometacina, entre otros; los cuales, no pueden administrarse por tiempo prolongado debido a que inhiben la protección de la mucosa gástrica y esto favorece la aparición de úlceras^{21,22}.

Por otro lado, los fármacos celecoxib, rofecoxib y valdecoxib (Figura 4) son inhibidores altamente selectivos de la enzima COX-2. Aunque evita la ulceración gástrica, estos fármacos están asociados con un alto riesgo de infartos al miocardio y accidentes cerebrovasculares, motivo por el cual rofecoxib y valdecoxib fueron retirados del mercado en 2004 y 2005, respectivamente ^{22,23}.

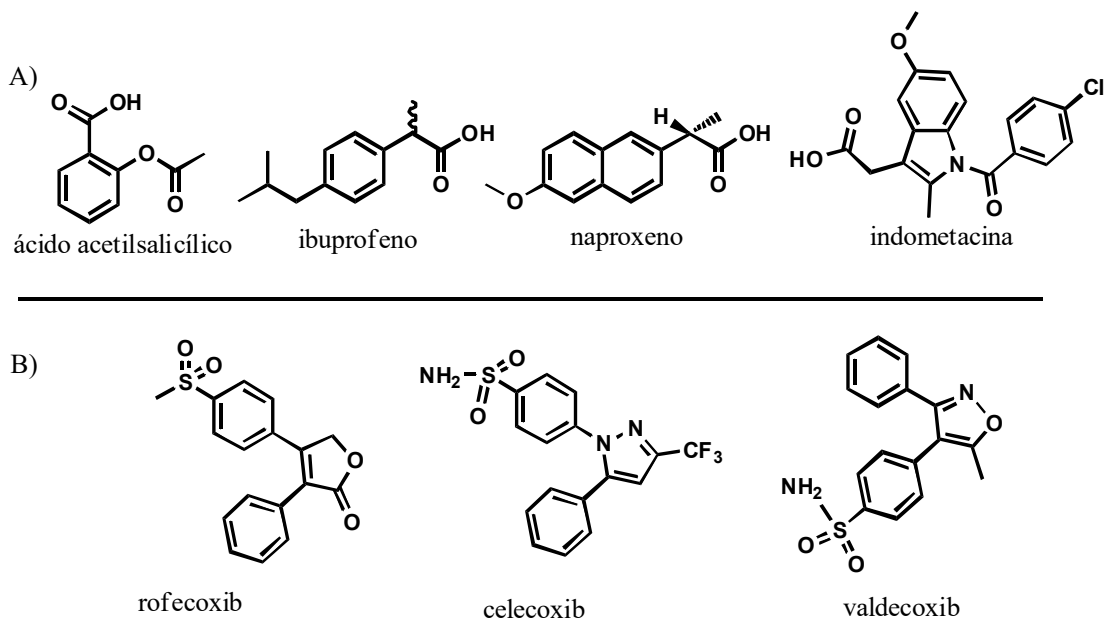


Figura 4. Fármacos Antiinflamatorios no Esteroides (AINEs) A) no selectivos y B) selectivos.

2.3.3. Opioides.

El tramadol (Figura 5) es el fármaco opioide más empleado, aprobado para el tratamiento de dolor moderado a severo y es recomendado para pacientes no tolerantes a acetaminofén y AINEs. Es un agonista opioide débil de origen sintético, que posee alrededor de un décimo de potencia de la morfina y es comparable con la codeína. Inhibe la recaptación de norepinefrina y serotonina, ayudando así a aliviar el dolor. Es utilizado con extrema precaución en la población geriátrica debido al aumento de la prevalencia de osteoartritis moderada a severa, y son más susceptibles a la sedación, la confusión y el estreñimiento, por lo que no se recomienda para uso crónico ^{21,22}.

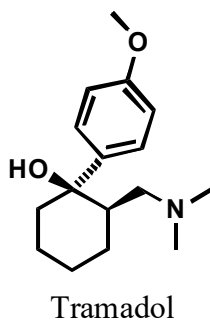


Figura 5. Tramadol, un opioide empleado en el tratamiento de la inflamación.

2.3.4. Glucocorticoides.

Actúan como agentes antiinflamatorios e inmunosupresores. La prednisolona y la dexametasona (Figura 6) son los glucocorticoides de origen sintético más empleados. Estos fármacos reducen la concentración de glóbulos blancos, citocinas y enzimas y por ende, bloquean la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos, bradiquininas e histaminas. Específicamente la prednisolona inhibe la expresión de múltiples genes inflamatorios (citocinas, enzimas, receptores y moléculas de adhesión), por lo que, la reducción de estos mediadores ayuda a explicar la disminución del dolor en pacientes. No obstante, se ha demostrado que el uso de estos fármacos (prednisolona, dexametasona, hidrocortisona, betametasona, etc.) produce efectos adversos como cataratas, hipertensión, hiperglucemia (en pacientes diabéticos) y están asociados con el síndrome de Cushing (aumento de peso, cara de luna, piel fina, debilidad muscular y huesos frágiles) ^{22,24}.

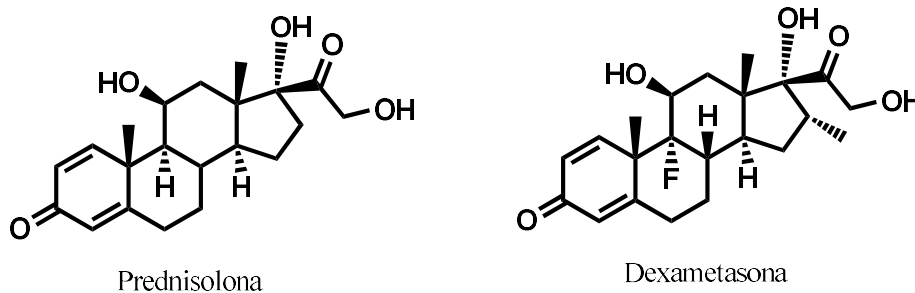


Figura 6. Prednisolona y dexametasona, glucocorticoides empleados en el tratamiento de la inflamación.

2.4. Terapias biológicas

Es importante mencionar a los anticuerpos monoclonales como terapias biológicas muy eficaces para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la AR.

Las terapias biológicas están dirigidas a regular la producción de TNF- α , IL-23 e IL-17 demostrando ser más eficaces que la farmacoterapia convencional²⁵. Dentro de este grupo se encuentran los inhibidores de TNF- α : infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab y certolizumab; inhibidores de interleucina 23 (IL-23): ustekinumab, briakinumab, tildrakizumab, guselkumab y risankizumab; los anti-IL-

17 como ixekizumab, secukizumab y brodalumab²⁶. La mayor desventaja de estos tratamientos es su elevado costo, limitando el acceso a estos fármacos (Tabla 1)²⁵.

Tabla 1. Comparación de los costos de adquisición de distintos tratamientos biológicos del IMSS para el tratamiento de enfermedades inflamatorias²⁷.

Nombre	Bianco molecular	Cantidad	Precio
Infliximab	TNF- α	100 mg	\$ 3762.07
Adalimumab	TNF- α	40 mg	\$ 6082.68
Etanercept	TNF- α	50 mg	\$ 4113.65
Tocilizumab	IL-6	200 mg	\$ 3257.55
Rituximab	TNF- α	100 mg	\$ 2617.73
Olumiant	JAK (Janus quinasa)	50 mg	\$ 16857.00
Tofacitinib	JAK (Janus quinasa)	140 mg	\$ 10191.22
Metotrexato	Inmunosupresor	125 mg	\$ 56.00
Sulfasalazina	Inmunomodulador	500 mg	\$ 96.19
Leflunomida	Inmunosupresor	300 mg	\$ 391.55

Los altos costos son asociados al proceso de ingeniería genética y a los bioprocesos subsecuentes. Además, los productos provenientes de otros mamíferos para uso en humanos deben estar en una pureza del 100% porque, pequeñas concentraciones de otras sustancias pueden causar graves efectos en el paciente²⁸. El elevado costo de estas terapias biológicas restringe el acceso y consecuentemente los tratamientos a largo plazo no puedan ser mantenidos, aunado a que están muy limitados en el sistema de salud pública en México.

2.5. Diseño de nuevas sustancias bioactivas mediante técnicas *in silico*.

De acuerdo a lo recién descrito, la necesidad de contar con mejores fármacos antiinflamatorios con propiedades farmacológicas optimizadas está presente. Las herramientas informáticas están evolucionado día con día, permitiendo predecir la actividad biológica potencial de las sustancias, además de explorar su seguridad antes de ser ensayadas. De esta manera se ha logrado reducir el número de experimentos que se emplean para ensayos biológicos, también se ha disminuido

la cantidad de compuestos a sintetizar, solventando de esta manera un problema asociado a cuestiones éticas y de elevados costos de experimentación²⁹.

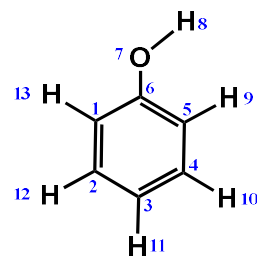
2.5.1. Predicción de actividad farmacológica (farmacodinamia) mediante el programa PASS.

La Relación Cuantitativa Estructura-Actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) es un método en el que se correlaciona cuantitativamente la estructura molecular de un compuesto químico con una actividad biológica. Por ejemplo, PASSonline es un programa QSAR ampliamente utilizado en la planificación de ensayos *in vitro* o *in vivo*, investigación farmacéutica y la investigación en salud debido a la capacidad de predecir la probabilidad de una sustancia a presentar actividad farmacológica. Se basa en la correlación de la estructura bidimensional de la molécula y utiliza técnicas estadísticas de reconocimiento de patrones, para finalmente relacionar homología con actividad biológica por medio de un cribado en una base de datos³⁰. La estructura química está representada por el conjunto de descriptores de vecindades multinivel de átomos, (MNA, por sus siglas en inglés). Los descriptores de MNA se basan en la representación de la estructura química sin especificar los tipos de enlace, incluye a los hidrógenos y demás átomos según las valencias y las cargas parciales³⁰⁻³².

Los descriptores de MNA se generan iterativamente de la siguiente forma: el descriptor de nivel cero es presentado por el tipo de átomo. Se agrega una marca especial "-" al descriptor de nivel cero si el átomo no está incluido en el ciclo. El descriptor de cada nivel sucesivo es una concatenación del descriptor de nivel cero del átomo y está puesto entre paréntesis³².

Por ejemplo, para el caso del fenol, representado por los descriptores de MNA de cero, primer y segundo nivel; para el primer átomo, C, el descriptor de MNA de nivel cero es "C" (este átomo está en ciclo), sus tres vecinos tienen descriptores de MNA de nivel cero "C", "C" y "-H" (-H porque este átomo no está en ciclo); entonces, el descriptor de MNA de primer nivel es "C(CC-H)", mientras que para el segundo nivel los descriptores de átomos vecinos representados en su primer nivel, "C(C(CC-H)C(CC-O)-H(C))" (Figura 7)³².

Átomo	MNA/0	MNA/1	MNA/2
1	C	C(CC-H)	C(C(CC-H)C(CC-O)-H(C))
2	C	C(CC-H)	C(C(CC-H)C(CC-H)-H(C))
3	C	C(CC-H)	C(C(CC-H)C(CC-H)-H(C))
4	C	C(CC-H)	C(C(CC-H)C(CC-H)-H(C))
5	C	C(CC-H)	C(C(CC-H)C(CC-O)-H(C))
6	C	C(CC-O)	C(C(CC-H)C(CC-H)-O(C-H))
7	O	-O(C-H)	-O(C(CC-O)-H(-O))
8	H	-H(-O)	-H(-O(C-H))
9	H	-H(C)	-H(C(CC-H))
10	H	-H(C)	-H(C(CC-H))
11	H	-H(C)	-H(C(CC-H))
12	H	-H(C)	-H(C(CC-H))
13	H	-H(C)	-H(C(CC-H))



Fenol

Figura 7. Representación del fenol por los descriptores MNA de cero, primer y segundo nivel (MNA/0, MNA/1, MNA/2).

Estos descriptores se generan para cada estructura del conjunto de datos. Cada descriptor particular tiene un número entero único. El cálculo de la similitud entre dos moléculas, A y B, viene dada por:

$$sim(A, B) = \frac{\sum_{i=1}^M \min[A(i), B(i)]}{\sum_{i=1}^M A(i) + \sum_{i=1}^M B(i) - \sum_{i=1}^M \min[A(i), B(i)]}$$

donde $A(i)$ y $B(i)$ son cuentas del descriptor i en las moléculas A y B, respectivamente; M es el número total de descriptores. Las sustancias se consideran equivalentes sí tienen el mismo conjunto de descriptores de MNA. Dado que los descriptores de MNA no representan las peculiaridades estereoquímicas de una molécula, las sustancias cuyas estructuras difieren en la estereoquímica se consideran equivalentes³².

Por otra parte, el algoritmo para construir modelos de la relación estructura-actividad basada en los compuestos del conjunto de entrenamiento y la predicción de actividad para nuevos compuestos se basa en las estimaciones bayesianas³².

Con respecto a la confiabilidad del programa, PASSonline predice más de 4000 tipos de actividad biológica con una precisión promedio > 95% y se ha utilizado con éxito para predecir la actividad biológica de nuevos compuestos³³.

2.5.2. Predicción farmacocinética de nuevos compuestos bioactivos

Por otro lado, aunado a la probabilidad de la actividad, también es importante tomar en cuenta la solubilidad y permeabilidad de los compuestos, ya que estos dos factores determinan en gran medida la capacidad de un compuesto para atravesar la membrana celular y facilitar el proceso de absorción. En 1996, Christopher A. Lipinski y colaboradores analizaron las características principales que comparten gran parte de los fármacos comerciales administrados por vía oral. Como resultado hallaron similitudes fisicoquímicas y estructurales que hacen que los compuestos sean permeables a la membrana y fácilmente absorbidos por el cuerpo³⁴. En primer lugar, las sustancias tenían un peso molecular inferior a 500 Da. Segundo, la lipofilidad del compuesto, expresada en logP (el logaritmo del coeficiente de partición entre el agua y el 1-octanol), era menor que 5. Tercero, el número de grupos funcionales en la molécula que pueden donar átomos de hidrógeno para formar enlaces de hidrógeno (generalmente la suma de los grupos hidroxilo y amino) era menor que 5. Finalmente, encontraron que el número de grupos que pueden aceptar átomos de hidrógeno para formar enlaces de hidrógeno (estimado por la suma de átomos de oxígeno y nitrógeno) era inferior a 10 (Tabla 2).

Tabla 2. Regla cinco de Lipinski.

Propiedad	Criterio
Peso molecular	< 500 Da
Lipofilidad (el logaritmo del coeficiente de partición entre agua y 1-octanol)	logP < 5
El número de grupos funcionales en la molécula que puede donar átomos de hidrógeno para formar enlaces de hidrógeno	< 5
El número de grupos que pueden aceptar átomos de hidrógeno para formar enlaces de hidrógeno	< 10

A estas características se les conoce como “regla cinco de Lipinski” y debido a su simplicidad, estos criterios han sido muy utilizados en la química farmacéutica para predecir la absorción de compuestos a través de difusión pasiva y como sinónimo de adecuada biodisponibilidad oral³⁵.

2.6. Modelos biológicos para la evaluación de compuestos antiinflamatorios.

Una vez identificado los mejores candidatos para el desarrollo, se deben realizar experimentos para recopilar información sobre cómo se absorbe, distribuye, metaboliza y excreta, sus potenciales beneficios y mecanismos de acción. Para ello se realizan dos tipos de investigación preclínica: *in vitro* e *in vivo*.

2.6.1. Modelos *in vitro*.

2.6.1.1. Cultivo de células de tejido linfoide

El tejido linfoide o linfático comprende linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, principalmente. Tales células pueden ser cultivadas *in vitro* en medio RPMI y posteriormente son estimuladas con colágeno tipo II, TPA o lipopolisacáridos de bacterias patógenas. EL estímulo genera la producción de citoquinas como TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-6 y IL-10 que pueden ser cuantificadas por la técnica de ELISA; además, diversas proteínas como las MMPs pueden ser analizadas por Western blot, de esta manera, diversos agentes pueden ser evaluados para medir su efecto en la inhibición o expresión de las moléculas antes mencionadas³⁶⁻³⁸.

2.6.1.2. Técnica de desnaturalización de albúmina

La albúmina es la proteína más abundante en la sangre, producida por el hígado, ayuda al cuerpo a mantener el equilibrio de líquidos además de llevar nutrientes vitales y hormonas.

Para 1968, Mizushima y Kabayashi observaron que la interacción de algunos fármacos antiinflamatorios clínicamente establecidos con algunas proteínas del suero inhibía fuertemente la coagulación por calor. A partir de ello se estableció el modelo de la técnica de desnaturalización de la albúmina¹⁶.

Una de las características de la inflamación es el aumento de la temperatura (calor), entonces, si existen sustancias capaces de estabilizar proteínas séricas biológicamente activas y lábiles, por efecto del calor, estas mismas tendrán capacidad para el tratamiento de la inflamación. Las condiciones experimentales de este estudio consisten en disolver la albúmina en un buffer de fosfatos, agregar los tratamientos, calentar y posteriormente medir el grado de desnaturalización de la

proteína por métodos espectrofotométrico UV-Vis. El grado de prevención de la desnaturalización es proporcional a la capacidad antiinflamatoria comparada con un fármaco de referencia y un grupo control^{39,40}.

2.6.2. Modelos *in vivo*.

2.6.2.1. Modelo de 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA).

El modelo de inflamación auricular inducido por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), un diéster de forbol, es una prueba muy utilizada para detectar la eficacia y potencia antiinflamatoria tópica de diversas sustancias.

Dentro del mecanismo de acción se ha demostrado que el receptor de TPA es la Proteína Cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés). La activación de PKC inicia una cascada de reacciones bioquímicas promoviendo una respuesta celular en la secreción, crecimiento y diferenciación. Estos acontecimientos son mediados por señales de respuesta inflamatoria a través de la vía NF- κ B, donde, NF- κ B interactúa con múltiples citocinas (por ejemplo IL1, IL-6, TNF). Además, dentro de las características particulares de este ensayo se encuentran la sobreproducción de citocinas inflamatorias, enzimas COX y LOX, aumenta el metabolismo de ácido araquidónico (AA) a leucotrienos y prostaglandinas, y la expresión de diferentes MMPs^{41,42}.

A nivel visual, pasado de 1 a 4 horas posterior a la inoculación, se presenta irritación de la piel y la inflamación local, permitiendo una mayor permeabilidad vascular, edema e hinchazón dentro de la dermis. Posteriormente, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) migran a la dermis en aproximadamente 24 horas y pueden cuantificarse mediante el ensayo de mieloperoxidasa (MPO)⁴³.

2.6.2.2. Modelo de carragenina.

Este modelo es frecuentemente utilizado para probar nuevos fármacos antiinflamatorios, así como para estudiar los mecanismos involucrados en la inflamación.

Las respuestas inflamatorias inducidas por carragenina, un carbohidrato natural (polisacárido) obtenido de algas rojas comestibles, implican la activación de los receptores de células T (TLR) 4, activando vías canónicas que implican RelA (p65)

y p50, y no canónicas, RelB y p52, proteínas que se unen a NF- κ B1 o NF- κ B2 para formar el complejo NF- κ B y desencadenar funciones inmunes innatas y adaptativas y servir como mediador de las respuestas inflamatorias⁴⁴.

La metodología se realiza en murinos y consiste en la administración de carragenina en la parte suplantaria de la pata trasera, posteriormente se desarrolla el edema, para el cual se ha descrito que varios mediadores operan en secuencia para producir la respuesta inflamatoria^{45,46}. La fase inicial del edema, que no está inhibida por los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como la indometacina o la aspirina, se ha atribuido a la liberación de histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) y bradiquinina. La segunda fase aceleradora de la hinchazón no solo se ha correlacionado con la producción elevada de prostaglandinas, sino que más recientemente se ha atribuido a la inducción de COX-2, pudiendo ser bloqueada por los AINES. La infiltración y activación local de neutrófilos también contribuyen a esta respuesta inflamatoria al producir, entre otros mediadores, radicales libres derivados del oxígeno como el anión superóxido, radicales hidroxilo, óxido nítrico (NO) y algunas proteasas^{46,47}.

2.6.2.3. Edema inducido por Dextrano

El sulfato de sodio de dextrano (DSS) es un polisacárido sulfatado, soluble en agua, cargado negativamente, con un peso molecular muy variable, que varía de 5 a 1400 kDa. El mecanismo por el cual el DSS induce inflamación aún no está claro, pero es probable que sea el resultado del daño al revestimiento de células epiteliales.

Cuando es utilizado para inducir edema en la pata del ratón, el mecanismo probable por el cual sucede el proceso inflamatorio es por daños químicos generados en las membranas de las células. El modelo de DSS es muy popular en la investigación de procesos inflamatorios debido a su rapidez, simplicidad, reproducibilidad y capacidad de control. Se pueden lograr modelos agudos, crónicos inflamación modificando la concentración de DSS y la frecuencia de administración^{48,49}.

2.6.2.4. Artritis inducida por Colágeno.

El modelo artritis inducida por colágeno se ha utilizado ampliamente para identificar posibles mecanismos de autoinmunidad en artritis, el papel de los diferentes tipos de células que participan, la progresión de la enfermedad, así como el efecto anti-inflamatorio de nuevas terapias.

Este modelo se realiza en cepas de murinos mediante la inmunización con colágeno tipo II emulsionada en adyuvante completo de Freund (CFA, por sus siglas en inglés). La patogenia resultante, se asemeja bastante a las características patológicas de la AR, incluida la hiperplasia sinovial, la infiltración de células mononucleares, la degradación del cartílago y la expresión de genes específicos de CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o de clase II. Por contraparte, la diferencia más notable entre este modelo y la AR es la expresión del factor reumatoide, el cual no está presente en el modelo de CIA⁵⁰.

2.6.2.5. Edema inducido por Nistatina

La nistatina es fármaco antifúngico del grupo de los poliénicos, del cual se ha demostrado que además de su actividad original, puede inducir una respuesta proinflamatoria, motivo por el cual se está utilizando para generar modelos de inflamación en animales.

La base molecular de las propiedades proinflamatorias de la nistatina no está definida, sin embargo debido a su similitud estructural con la Anfotericina B, se puede plantear que el proceso inflamatorio ocurra por un mecanismo similar. La Anfotericina desencadena el proceso inflamatorio al interactuar con la membrana de las células eucariontes, se adhiere a ella y ocasiona su ruptura. Estos daños son percibidos por el receptor TLR1 y TLR2 induciendo la secreción de citocinas IL-1, IL-8 y TNF- α . Por lo tanto, un mecanismo dependiente de TLR podría servir como la base molecular de las propiedades proinflamatorias de la nistatina^{51,52}.

2.6.2.6. Granuloma de hipersensibilidad de tipo retrasado.

Los granulomas son áreas de inflamación formadas por un cúmulo de células inmunes con el objetivo de erradicar sustancias extrañas. Esta característica del

sistema inmunológico, sirvió para desarrollar modelos cuya función es medir los aspectos en enfermedades inflamatorias que se caracterizan por la formación de tejido inflamatorio resultante de la proliferación celular (monocitos, macrófagos, endotelio, fibroblastos, linfocitos), característica de patologías como la AR.

La metilación de sustancias como la albumina de suero bovino (ASB) puede contribuir a la inflamación local del tejido, generando granulomas. Esta metilación afecta significativamente su plegamiento, generando una estructura conocida como amiloide, que es completamente diferente a la estructura original y que puede acumularse en cualquier órgano o tejido por largos periodos generando un efecto citotóxico en las células circundantes.

El mecanismo por el cual se induce la inflamación es debido a la inducción directa de la producción de citocinas de la familia IL-1 a través de la activación del inflammasoma NLRP3.

La ventaja de este modelo es la capacidad de estudiar desde la acumulación y proliferación de leucocitos hasta la función linfocitaria y la liberación de mediadores (linfocinas), características de patologías como la artritis reumatoide.

2.6.2.7. Poliartritis inducida por adyuvante

En este modelo el desarrollo del proceso inflamatorio se debe a un estímulo por antígenos. La patología comienza una hora después de la inyección intradérmica del adyuvante completo de Freund (*Mycobacterium tuberculosis* en aceite mineral) en la pata del roedor⁵³.

Después de la administración del antígeno, el primer evento es la deposición de fibrina a lo largo de la membrana sinovial y dentro de la cápsula articular, como una acción para atrapar la infección bacteriana. Sin embargo, a medida que la fibrina se va degradando, los productos generados, quimiocinas/citocinas y las interacciones plaquetarias complementarias generadas cerca de la membrana sinovial reclutan macrófagos, neutrófilos y linfocitos en el espacio articular y los tejidos circundantes. La llegada continua de antígeno hacia las células T CD4+ y los monocitos aumenta el proceso inflamatorio, culminando en una serie de mecanismos que erosionan progresivamente el tejido sinovial, el cartílago y finalmente el hueso⁵³.

2.7. Importancia de fosfonatos, bisfosfonatos y metodologías de síntesis.

En la búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios, en los últimos años se ha investigado a los fosfonatos, los cuales son compuestos orgánicos, bioisómero del grupo fosfato y carboxilo. Resultan de la sustitución del átomo de oxígeno que une la unidad de fosfato en un esqueleto orgánico ($R-O-P(O)-(O)_2^{2-}$), por un átomo de carbono ($R-C-P(O)-(O)_2^{2-}$)⁵⁴. Dentro de este grupo de moléculas versátiles se encuentran los bisfosfonatos, caracterizados por un elemento estructural P-C-P (Figura 8).

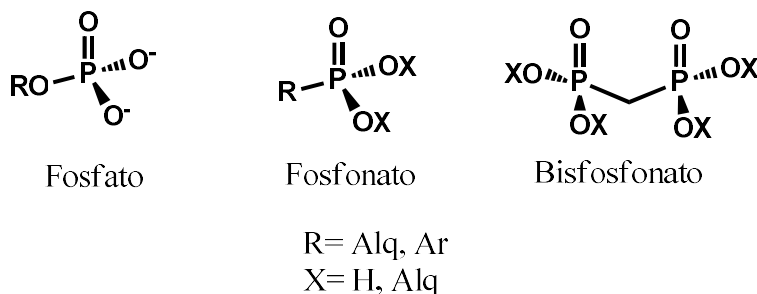
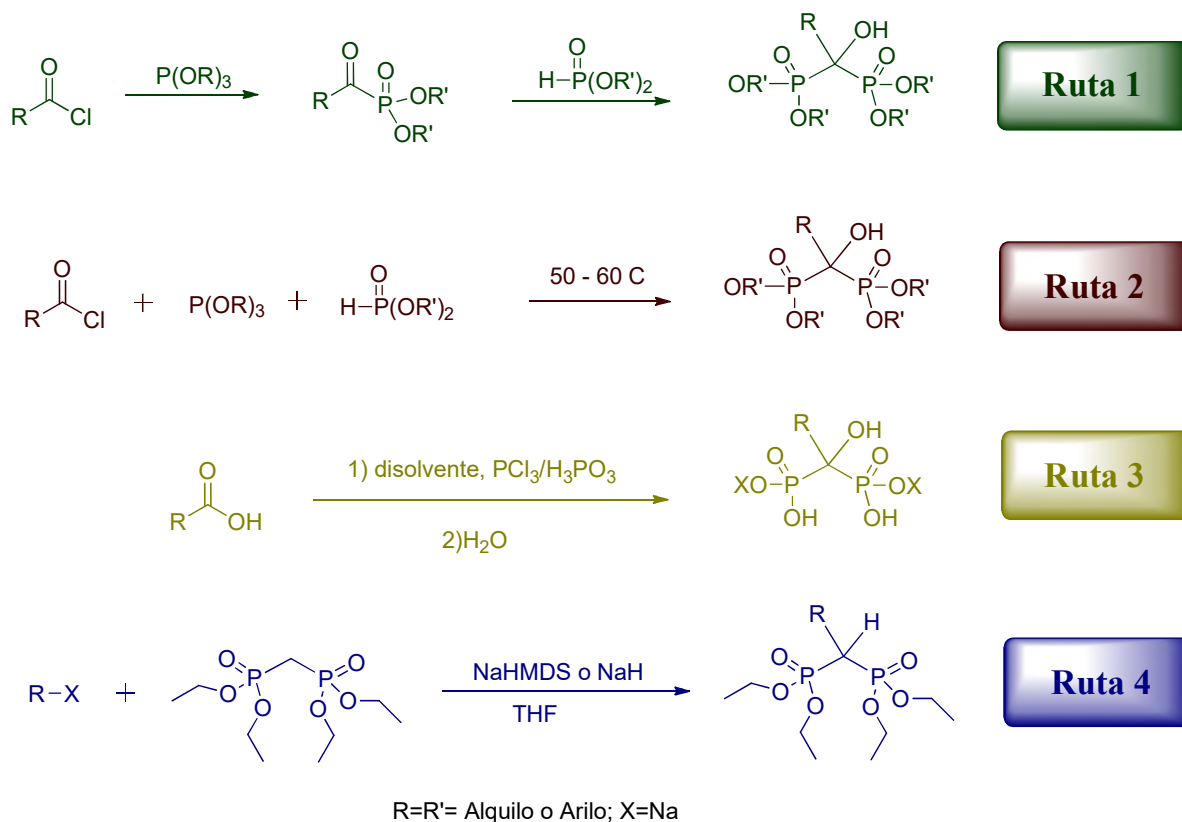


Figura 8. Estructura general del grupo fosfato y fosfonato.

2.7.1. Síntesis de bisfosfonatos.

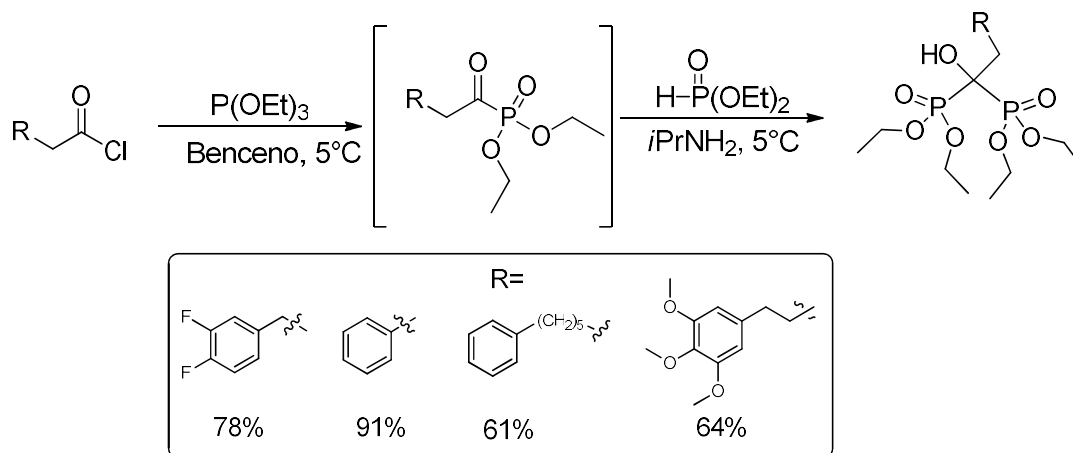
Los BP pueden prepararse mediante varios métodos: (1) reacción de Michaelis-Arbuzov entre un haluro de acilo y fosfito de trialquilo, formando un acilfosfonato de dialquilo, seguido de la adición de fosfito de dialquilo; (2) añadiendo un haluro de acilo a una mezcla de fosfito de trialquilo y fosfito de dialquilo; (3) a través de la reacción entre un ácido carboxílico, ácido fosforoso y tricloruro de fósforo, seguido de un paso de hidrólisis y; (4) alquilación de tetraetil metilenbisfosfonato (Esquema 1)^{55,56}.



Esquema 1. Estrategia de síntesis para la obtención de bisfosfonatos

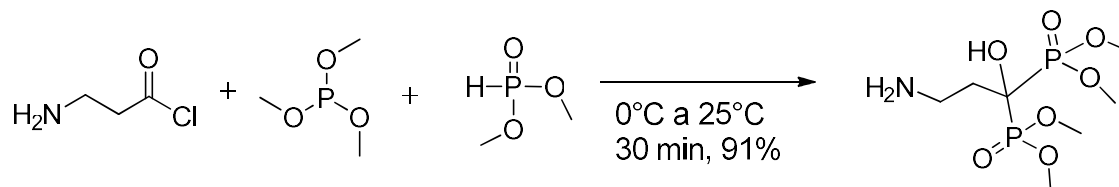
A continuación se presentan diversas metodologías para sintetizar los bisfosfonatos a partir de las estrategias antes mencionadas.

Siguiendo la ruta 1), Yanvarev y colaboradores⁵⁷, reportan la síntesis de 4 nuevos bisfosfonatos como inhibidores de la enzima retrotranscriptasa (RT) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). A partir una reacción one-pot entre el respectivo cloruro de ácido y fosfito de trietilo seguida de la adición de fosfito de dietilo, se generó el correspondiente bisfosfonato (Esquema 2). Los BP sintetizados se purificaron mediante cromatografía en columna (CC) obteniéndose buenos rendimientos (61-91%).



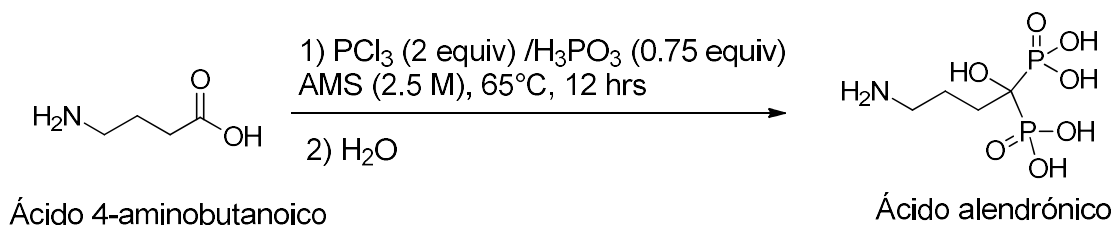
Esquema 2. Síntesis de bisfosfonatos inhibidores de la enzima retrotranscriptasa.

Respecto a la segunda estrategia, Bhushan y colaboradores⁵⁸ sintetizaron un análogo del pamidronato a partir de una reacción one-pot entre un haluro de acilo (derivado de la β -alanina), fosfito de trietilo y fosfito de dimetilo con una temperatura de reacción de 0°C hasta alcanzar la temperatura ambiente durante 30 min. El pamidronato protegido con éster metílico se obtuvo sin el uso de ninguna base o calentamiento, con un rendimiento total del 91% (Esquema 3).



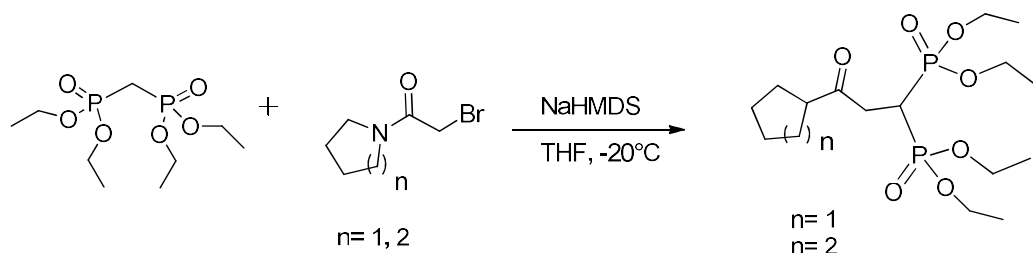
Esquema 3. Síntesis de bisfosfonatos análogo del pamidronato.

La ruta número 3, representa la estrategia más utilizada en la industria farmacéutica para la síntesis de bisfosfonatos. Por ejemplo, Kieczkowski y colaboradores, optimizaron la síntesis del ácido alendrónico evaluando diferentes disolventes, temperatura y equivalentes de los reactantes. Al utilizar ácido metanosulfónico, ácido 4-aminobutanoico, PCl_3 y H_3PO_3 y una temperatura de reacción de 65°C durante 12 horas, se pudo obtener el ácido bisfosfónico libre (a pH 1.8) o en forma de sal monosódica (a pH 4.3), ambos, analíticamente puros como aislados. La reacción es extrapolada a una variedad de ácidos carboxílicos (Esquema 4).



Esquema 4. Síntesis del ácido alendrónico.

Por otra parte, a partir de metilendibisfosfonato de tetraetilo una gran diversidad de bisfosfonatos pueden ser preparados, por ejemplo, siguiendo la metodología de Ramírez-Marroquín y colaboradores, a una solución de metilendibisfosfonato de tetraetilo en THF se añade gota a gota NaHMDS (1.5 equiv.) a -5°C bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, una solución del haluro de alquilo (2.5 equiv.) es agregada y se deja reaccionar durante 18 h a 0°C (Esquema 5). Finalmente, la mezcla de reacción se concentra y el crudo de reacción se purifica por CC obteniendo los correspondientes bisfosfonatos derivados de pirrolidina ($n=1$) y piperidina ($n=2$) con rendimientos de 89 y 82%, respectivamente⁴⁵.



Esquema 5. Síntesis de bisfosfonatos derivados de pirrolidina y piperidina.

Tomando en cuenta toda la información proporcionada anteriormente, en el presente proyecto se propone modificar la estructura química de los bisfosfonatos derivados de pirrolidina y piperidina en busca de mejores agentes antiinflamatorios. Dentro del grupo de trabajo la estrategia descrita en el esquema 5 ya ha sido estandarizada utilizando metilendibisfosfonato de tetraetilo como reactivo, por tal motivo se propone extrapolar estas condiciones de reacción a los nuevos derivados propuestos.

2.8. Fosfonatos, bisfosfonatos y sus derivados como antiinflamatorios.

El motivo estructural que define a los fosfonatos en muchos productos naturales es el enlace fósforo-carbono. Este enlace los hace estables a enzimas esterasas, especializadas en romper el enlace P-O en ésteres de fosfato y anhídridos, así como al calentamiento en soluciones ácidas o alcalinas⁵⁹.

Dada su gran capacidad de mimetizar ésteres de fosfato, ácidos carboxílicos e intermediarios tetraédricos formados durante la hidrólisis de péptidos, los fosfonatos abarcan un amplio rango de actividades biológicas como antimicrobianos, inhibidores enzimáticos, agentes anticancerígenos y principalmente en el tratamiento de la osteoporosis. Algunos fosfonatos producidos naturalmente como dehydrophos y argolaphos, tienen actividad herbicida, insecticida, antibacteriana, antiparasitaria, antiviral y antihipertensiva⁶⁰, y bisfosfonatos sintéticos como clodronato, etidronato, pamidronato, entre otros, son fármacos ampliamente utilizados para el tratamiento de la osteoporosis a través de la inhibición de la función de los osteoclastos. Los osteoclastos son células que remodelan huesos además de regular el proceso inflamatorio.

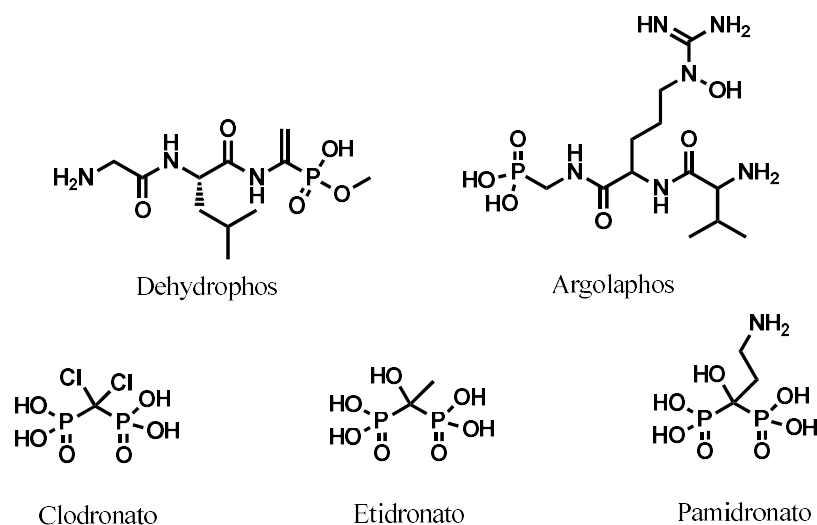


Figura 9. Estructura de algunos fosfonatos y bisfosfonatos con actividad biológica.

No obstante, los bisfosfonatos también poseen propiedades antiinflamatorias. Dentro del grupo de los bisfosfonatos sintéticos, el clodronato (Figura 9) ha sido el primer fármaco utilizado para el tratamiento de la osteoporosis. No obstante, se ha

utilizado para el tratamiento de enfermedades osteoarticulares por su capacidad antiinflamatoria y analgésica. En estudios clínicos se ha demostrado que el clodronato a dosis única de 100 mg cada semana o cada 15 días vía intramuscular (i.m.) funciona para el tratamiento de osteoporosis, mientras que en el tratamiento del síndrome de dolor regional complejo tipo 1 (CRPS-I, síndrome clínico de curso variable y causa desconocida que se caracteriza por dolor, hinchazón y disfunción vasomotora de una extremidad), una enfermedad inflamatoria, 300 mg por vía i.m. cada semana son utilizados⁶¹.

Otro fármaco utilizado para el tratamiento de pacientes con CRPS-I agudo es el neridronato (Figura 9). Cuatro dosis de 100 mg/día i.v. durante una semana se asocian con beneficios persistentes y clínicamente relevantes. Estos resultados proporcionan evidencia concluyente de que el uso de bisfosfonatos, en dosis adecuadas, es el tratamiento de elección para CRPS-I⁶².

En el caso de la espondilitis anquilosante (EA), una enfermedad reumática inflamatoria y sistémica del esqueleto axial, el pamidronato a dosis de 60 mg cada mes durante 6 meses, muestra una mejoría clínica y radiológica en pacientes con EA⁶³.

Por tal motivo estos compuestos han ido ganando relevancia en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. A continuación se describen diversos estudios que muestran la capacidad antiinflamatoria de nuevos fosfonatos y bisfosfonatos en fases preclínicas.

2.8.1. Evaluaciones *in vitro*

El reemplazo bioisotérico implica el intercambio de grupos funcionales de una molécula con otros grupos funcionales que tienen propiedades biológicas similares. El objetivo es mejorar la potencia y las propiedades farmacológicas⁶⁴.

En este sentido, Nemeth y colaboradores, diseñaron y sintetizaron inhibidores de CDK9 través de un reemplazo bioisotérico del grupo funcional sulfonamida por fosfonato con el objetivo de crear inhibidores más potentes y selectivos. CDK9 es una cinasa que actúa en varias citocinas involucradas en la regulación de la inflamación, considerándose entonces un objetivo prometedor para el tratamiento

de la artritis reumatoide y las enfermedades inflamatorias crónicas como la esclerosis múltiple o la psoriasis. En una serie de más de 100 compuestos se encontró un conjunto de fosfonatos (**1-5**) que presentaron actividad inhibitoria hacia la enzima CDK9/CycT1, siendo **1**, quien presentó mayor actividad (Figura 10). La CI_{50} en el orden nanomolar y la selectividad hacia CDK9/CycT1 demuestran la utilidad del grupo fosfonato en el diseño de nuevos inhibidores de cinasas⁶⁵.

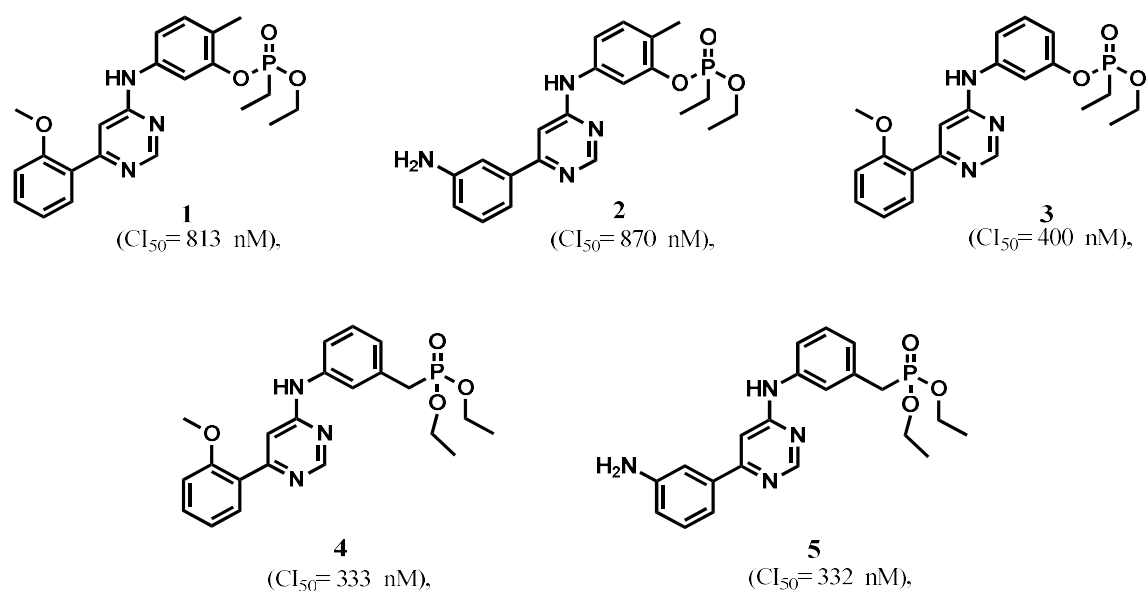


Figura 10. Fosfonatos inhibidores de la enzima CDK9.

En 2005, Al Quntar y colaboradores, observaron que los vinilfosfonatos tienen la capacidad de inhibir la actividad de MMP-2⁶⁶. Posteriormente, en 2007 continuaron explorando su actividad como antiinflamatorios, en esta ocasión, evaluando la capacidad para modular la producción de intermediarios reactivos de oxígeno, óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral (TNF- α) en un modelo de macrófagos murinos. Dentro de los hallazgos, tres compuestos (**6-8**) tuvieron la capacidad de suprimir la generación de intermediarios reactivos de oxígeno, NO y TNF- α (Figura 11). Al comparar los niveles de producción de EROs, NO y TNF- α de los tratamientos, el compuesto **8** tuvo una mayor actividad en la supresión de la expresión de EROS y NO que los compuestos **6** y **7**. Caso contrario, **6** y **7** (20 μ g/mL ambos) tuvieron mayor actividad que **8** en la supresión de la expresión TNF- α ⁶⁷.

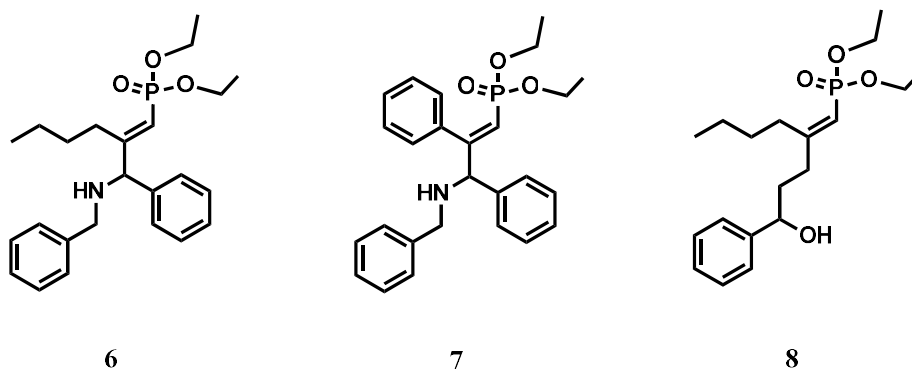


Figura 11. Fosfonatos inhibidores de la producción de EROs, NO y TNF- α .

Combinando los resultados en la inhibición de la producción de mediadores clave proinflamatorios como EROs, NO y TNF- α , junto con su capacidad para inhibir MMP-2, los aminovinilfosfonatos aquí presentados ofrecen una estrategia prometedora en el desarrollo de fármacos antiinflamatorios.

Damiche y Chafaa, reportaron la actividad antiinflamatoria de una nueva serie de α -aminofosfonatos evaluados en un modelo *in vitro* mediante el uso de la técnica de inhibición de la desnaturalización de la albúmina. Dentro de los resultados obtenidos, la mayor actividad fue mostrada por el compuesto **9**, mientras **10**, **11** y **12**, son comparables al fármaco de referencia, diclofenaco (Figura 12). Si bien, estos fueron las moléculas con mayor actividad, no obstante, del conjunto de moléculas evaluadas la relación estructura actividad reveló que la presencia de un anillo aromático (moléculas **9**, **11** y **12**, azul), mejora significativamente la eficacia de los productos sintetizados a diferencia de contener solamente una cadena alquílica (molécula **10**, rojo)⁴⁰.

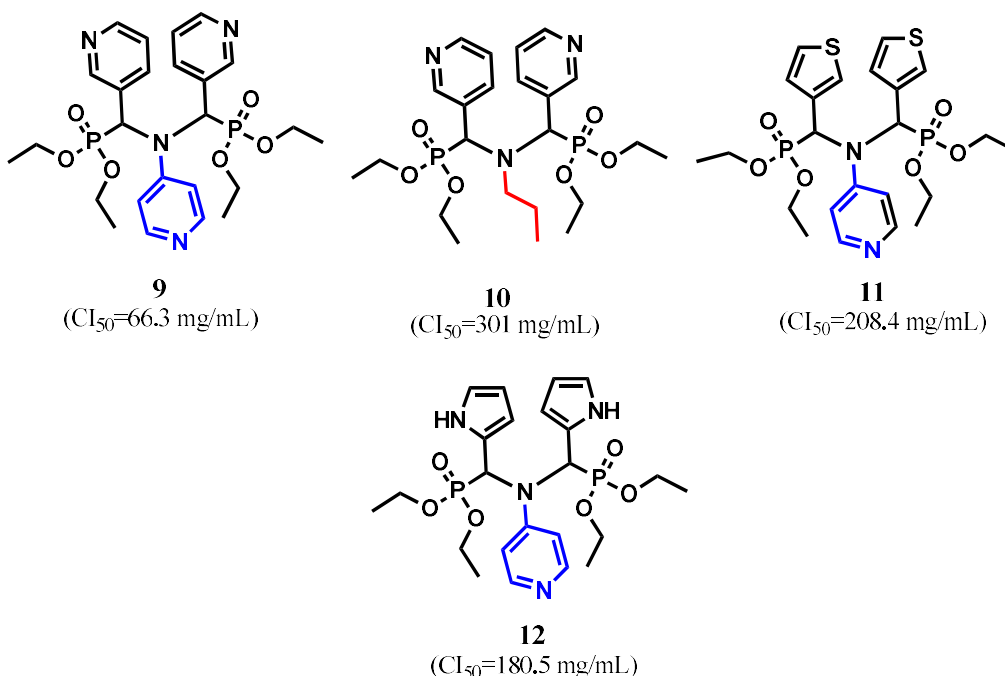


Figura 12. Aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria *in vitro*.

En otro trabajo, Tauro y colaboradores, decidieron usar como molécula prototipo al tiludronato que es un ácido bisfosfónico utilizado en la clínica para el tratamiento de la enfermedad ósea de Paget. Realizaron modificaciones en su estructura a través de un remplazamiento bioisostérico de un átomo de azufre por una amina y la introducción de diferentes sustituyentes en el anillo aromático. Los sustituyentes fueron seleccionados utilizando parámetros lipofílicos (π de Hansch), electrónicos (σ de Hammett) y estéricos (E_s de Taft) hacia la búsqueda de mejores inhibidores de metaloproteinasas de matriz (MMP). Las enzimas seleccionadas para este trabajo fueron MMP-2, -8, -9 y -14, por sus implicaciones en diferentes enfermedades como cáncer y AR. Dentro del conjunto de compuestos evaluados, el compuesto **13** tuvo la mayor actividad inhibitoria *in vitro* hacia las isoformas 6 y 7 ($CI_{50} = 2.4 \mu\text{M}$ y $3.9 \mu\text{M}$, respectivamente), mientras que los compuestos **14** y **15** fueron más potentes contra MMP-2 ($CI_{50} = 2.1 \mu\text{M}$) y MMP-9 ($CI_{50} = 6.0 \mu\text{M}$), respectivamente. Estos compuestos presentan un mejor perfil de inhibición en comparación con el tiludronato, lo que confirma su capacidad para ser más efectivos hacia la inhibición específica de MMP⁶⁸.

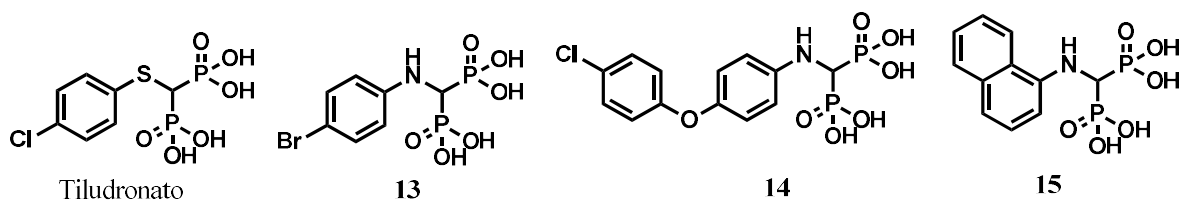


Figura 13. Bisfosfonatos inhibidores de diferentes MMPs.

Los resultados de este trabajo permiten considerar a estos ácidos bisfosfónicos (Figura 13) como nuevos agentes prometedores para el tratamiento de enfermedades relacionadas con MMPs como el cáncer y la AR.

2.8.2. Evaluaciones *in vivo*

Abdou y colaboradores, sintetizaron nuevos α -hidroxifosfonatos evaluando su capacidad antiinflamatoria en el modelo *in vivo* de edema inducido por carragenina utilizando ratas Fisher. Los derivados heterocíclicos más potentes a la cuarta hora del experimento fueron **16** (90.8%) y **17** (88.3%). Además, para demostrar la importancia del grupo fosfonato en la actividad biológica, se comparó al intermediario de reacción **18** (14.8%) observándose poca actividad antiinflamatoria. Por tal razón, los α -hidroxifosfonatos sintetizados (Figura 14) tienen un interés sintético y potencial farmacéutico.

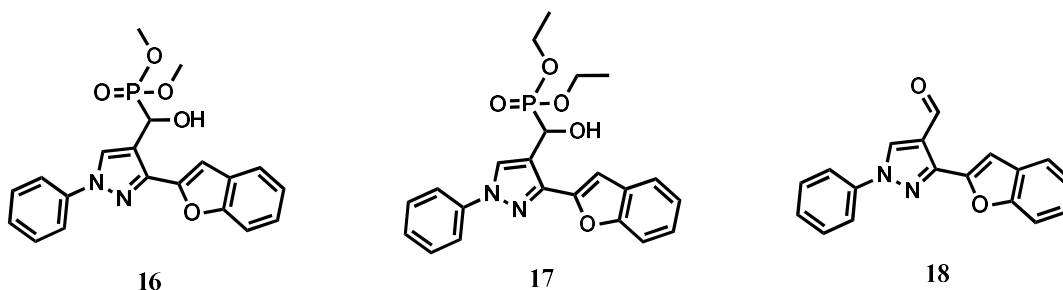


Figura 14. α -hidroxifosfonatos con actividad antiinflamatoria *in vivo*.

En otro trabajo, Kamel y colaboradores, utilizaron el diseño asistido por computadora (PASSonline) para diseñar *in silico* diferentes moléculas con potencial antitumoral, antiinflamatorio y antiosteoporosis. Posteriormente, fueron sintetizadas y evaluadas. El ensayo consistió en dos modelos de inflamación crónica, poliartritis

inducida por adyuvante de Freund (PIA) y granuloma de hipersensibilidad de tipo retardado, ambos desarrollados en murinos⁶⁹.

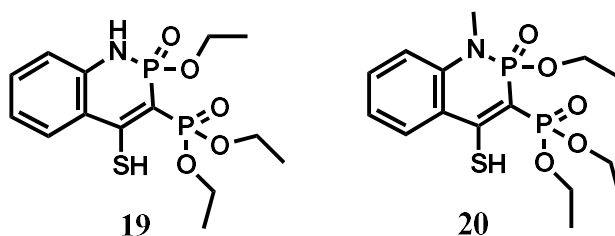


Figura 15. Bisfosfonatos con actividad antiinflamatoria *in vivo*.

Dentro de los resultados más sobresalientes, se encontró que las moléculas **19** y **20** (Figura 15) que tienen un grupo tiol libre son los bisfosfonatos (BP) más potentes para la inhibición de la artritis crónica, y su acción probablemente se deba a la capacidad para unirse a un átomo de metal en el sitio activo de las metaloproteinasas de matriz (MMP)⁶⁹.

Basados en los resultados de predicción de actividad utilizando el programa PASS online, Abdou y colaboradores⁷⁰, determinaron la actividad antiinflamatoria *in vivo* de un conjunto de bisfosfonatos α,β -insaturados. La mayoría de los nuevos compuestos exhibieron considerable actividad antiinflamatoria a dosis de 50 mg/kg en ratas Wistar, sobresaliendo las moléculas **21** y **22** con actividad comparable al fármaco de referencia indometacina (Figura 16).

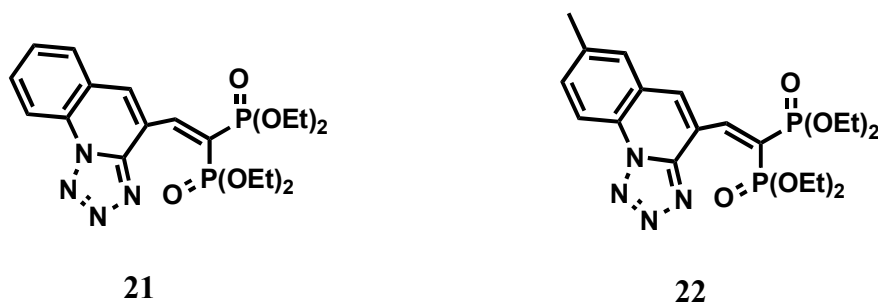
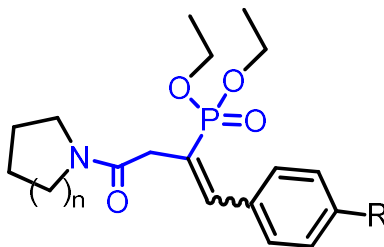


Figura 16. Bisfosfonatos α,β -insaturados con actividad antiinflamatoria *in vivo*.

Contribuyendo a su interesante actividad, un estudio de toxicidad aguda no mostró letalidad dentro de las primeras 24 horas, lo que resalta el potencial de los bisfosfonatos.

Por otro lado, Ramírez-Marroquín y colaboradores⁴⁵ diseñaron, sintetizaron y evaluaron 6 derivados de fosfonatos como nuevos agentes antiinflamatorios. El diseño se realizó utilizando el programa PASSonline. Los resultados mostraron probabilidad de actividad como agentes antiartríticos >0.9 (en una escala de 0 a 1) para los compuestos **23-26** (Figura 17)^{30,34}.



23; R = 4-OCH₃ (*E*), n=1

24; R = 4-OCH₃ (*Z*), n=1

25; R = 4-NO₂ (*E*), n=1

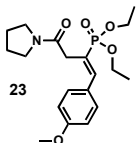
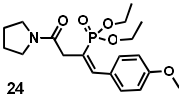
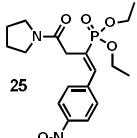
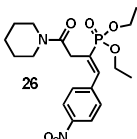
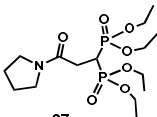
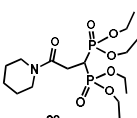
26; R = 4-NO₂ (*E*), n=2

Figura 17. Compuestos diseñados **23-26**.

Los vinilfosfonatos **23-26** fueron evaluados en dos modelos de inflamación aguda: modelo de carragenina y modelo de TPA (13-acetato-12-*O*-tetradecanoilforbol), siendo el primero de administración oral y el segundo de administración tópica.

En el modelo de carragenina, los vinilfosfonatos **23-26** y bisfosfonatos **27-28** se administraron a una dosis de 50 mg/kg en ratones Balb/C machos. Se utilizó indometacina como fármaco de referencia. Solo los bisfosfonatos **27-28** mostraron actividad antiinflamatoria con 7.01 y 22.15% de inhibición del edema, respectivamente, comparable con el 21.89% de inhibición del fármaco de referencia indometacina. En contraste, los vinilfosfonatos **24**, **25** y **26** mostraron efecto proinflamatorio (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la actividad antiinflamatoria de los compuestos **23-28**.

Compuestos	Modelos de inflamación	
	TPA (Porcentaje de inhibición)	Carragenina (Porcentaje de inhibición)
Indometacina	64.89%	21.86%
 23	67.53%	14.35%
 24	71.62%	-35.78%
 25	70.54%	-9.78
 26	72.10%	-36.18%
 27	43.48%	7.01%
 28	55.99%	22.15%

En el modelo de TPA, los vinilfosfonatos **23-26** y bisfosfonatos **27-28** se administraron a una dosis de 2 mg/oreja. En este ensayo se observó una inhibición moderada del edema para los bisfosfonatos **27-28** (43.48-55.59%), pero se logró una inhibición significativa para los vinilfosfonatos **23-26** (67.53-72.10%), comparable o superior a la indometacina (64.89%).

En conclusión, los vinilfosfonatos **23-26** surgieron como potenciales agentes antiinflamatorios tópicos, mientras que los bisfosfonatos **27-28** presentaron actividad antiinflamatoria por ambas vías, oral y tópica.

Estos resultados nos alentaron para seguir explorando el potencial farmacológico de los bisfosfonatos **27-28** como moléculas modelo para la obtención de agentes antiinflamatorios más potentes.

El presente trabajo de investigación fue continuación de este previo, centrando nuestra atención en la modificación molecular de los bisfosfonatos **27-28** mediante el reemplazo bioisostérico del grupo funcional amida por un éster, en busca de potenciar su actividad antiinflamatoria (Figura 18).

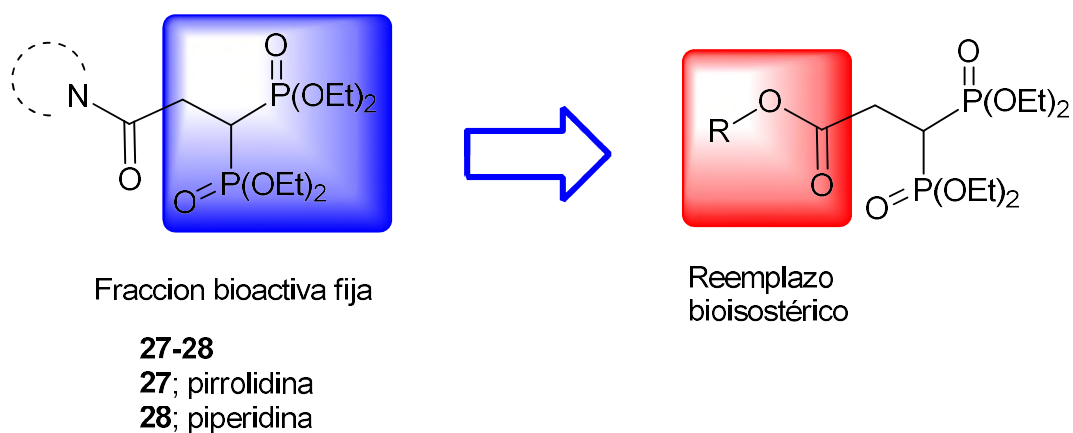
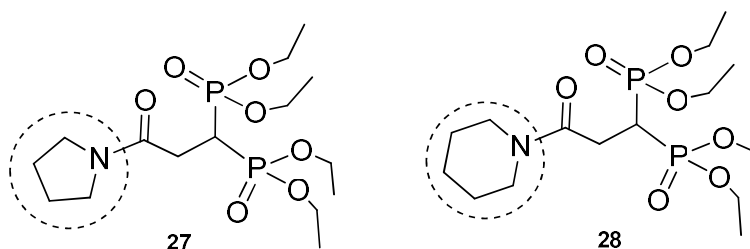


Figura 18. Modificación molecular de los bisfosfonatos **27-28** abordada en este proyecto de tesis.

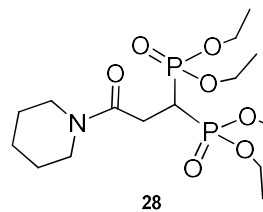
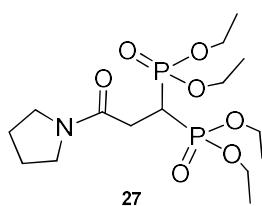
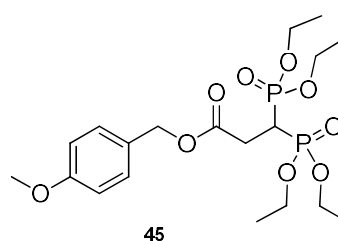
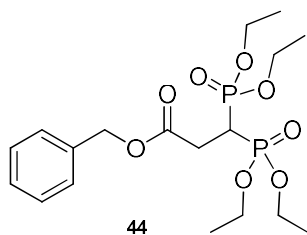
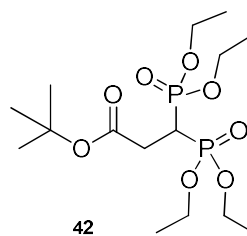
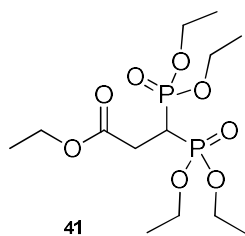
3. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de la inflamación cuando se asocia a enfermedades crónicas puede ser prolongado y los fármacos empleados generan diversos efectos adversos como la inmunosupresión o daño hepático. En la búsqueda continua de mejores agentes antiinflamatorios, un estudio previo demostró que los bisfosfonatos **27** y **28** presentan actividad antiinflamatoria vía tópica y oral. Por ello, en este trabajo se propuso obtener compuestos antiinflamatorios más potentes y seguros a partir de las modificaciones estructurales de los bisfosfonatos **27** y **28**.



4. HIPÓTESIS

1. Los nuevos bisfosfonatos **41-42** y **44-45** serán inhibidores de inflamación en los modelos *in vivo* de carragenina y TPA comparables o más potentes que el fármaco de referencia (indometacina) y que los compuestos de partida **27** y **28**.
2. Los bisfosfonatos **41-42** y **44-45** no presentarán letalidad a dosis de 50 y 100 mg/kg en un modelo murino de ratones Balb/C.

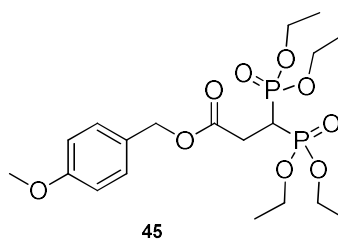
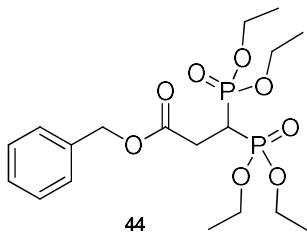
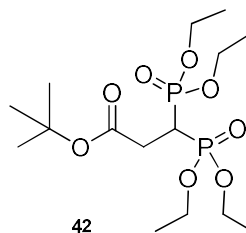
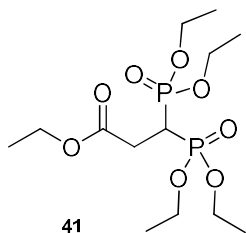


5. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y evaluar la actividad antiinflamatoria de los bisfosfonatos **41-42** y **44-45** y determinar la toxicidad aguda de los derivados más activos en busca de agentes terapéuticos.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar, purificar y caracterizar los bisfosfonatos **41-42** y **44-45**.
2. Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los compuestos **41-42** y **44-45**, en dos modelos de inflamación aguda en ratones Balb/C: carragenina y TPA.
3. Determinar la toxicidad aguda de los compuestos que muestren mayor actividad antiinflamatoria.



7. METODOLOGÍA

7.1. Diseño y síntesis de los compuestos objetivo

Con ayuda de herramientas bioinformáticas, se propuso un cribado de diecinueve moléculas propuestas (**34-52**), derivadas de la estructura de los bisfosfonatos **27** y **28** del estudio previo⁴⁵. El objetivo fue seleccionar aquellas que combinaran los mejores puntajes de actividad antiinflamatoria, comparable y superior a los compuestos **27** y **28** de partida. Los programas bioinformáticos utilizados fueron de acceso libre y consisten en la utilización de diferentes algoritmos para la predicción de actividades como: actividad antiinflamatoria (PASSonline)⁷¹, absorción (reglas de Lipinski, Molinspiration)⁷², toxicidad (GUSAR online)⁷³, efectos adversos (Adverpred)⁷⁴ y posibles biotransformaciones producto del metabolismo (MetaTox)⁷⁵ (Figura 19).

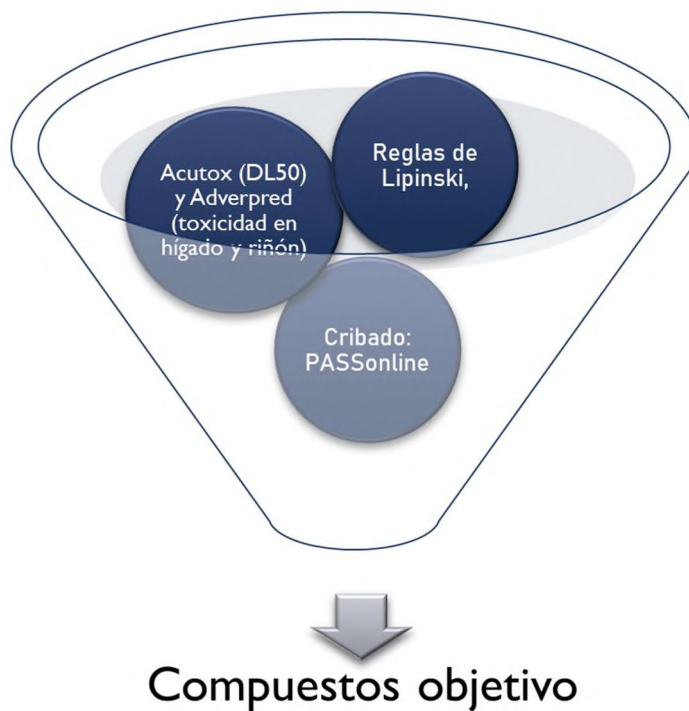
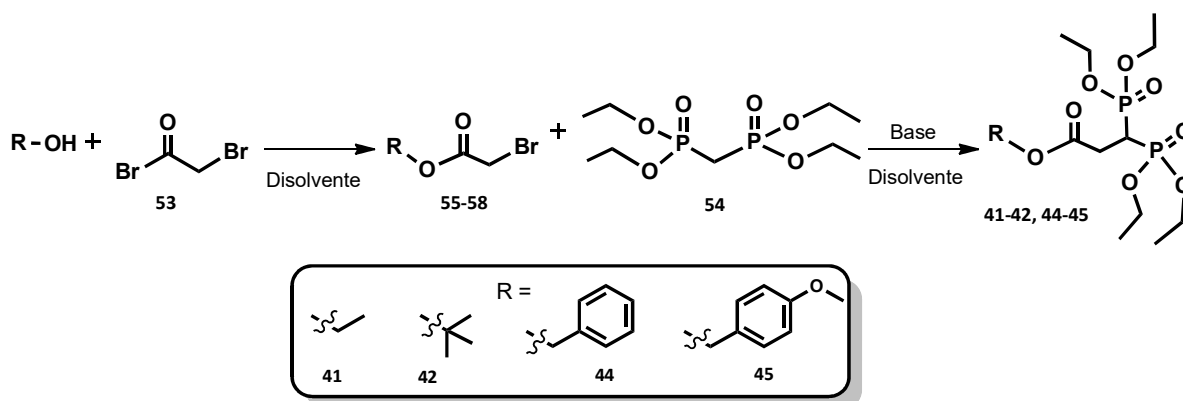


Figura 19. Programas bioinformáticos utilizados en este trabajo.

Por otro lado, siguiendo el método de síntesis previamente reportado por Ramírez-Marroquín y colaboradores⁴⁵, los compuestos objetivo **41-42** y **44-45** se propusieron obtener en dos etapas, primero mediante la esterificación de bromuro de bromoacetilo con un alcohol, en presencia de una base, obteniendo los ésteres **55-**

58. Posteriormente, una reacción de C-alkilación del metilendifosfonato de tetraetilo **54** con los haluros de alquilo **55-58**, utilizando NaHMDS como base, para finalmente obtener los bisfosfonatos **41-42** y **44-45** (Esquema 6).



Esquema 6. Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los productos **41-42** y **44-45**.

7.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria aguda de los compuestos objetivo.

Esta actividad se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS-Cd. México). Se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa Balb/C de 25 ± 2 g de peso provenientes del bioterio del CMN siglo XXI, IMSS, los cuales se mantuvieron con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura controlada de 25 ± 2 °C, con un porcentaje de humedad de 55-80%, con agua y alimento RodentChow *ad libitum*. El manejo de los animales de experimentación se apegó a los estatutos del Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 revisada en agosto del 2016⁷⁶. Cada compuesto fue administrado por separado a sus dosis correspondientes.

- Inducción del proceso inflamatorio agudo con TPA.

En este experimento se indujo el edema auricular con la aplicación de TPA siguiendo la metodología descrita por Pérez-González y colaboradores⁷⁷; como control positivo se empleó indometacina aplicada por vía tópica disuelta en acetona. Para este ensayo se formaron ocho grupos de 5 ratones machos cada uno. A todos

los grupos se les administró en la oreja derecha 25 µL de acetona (vehículo) y en la oreja izquierda 25 µL de TPA (0.05 µg/µl) y después de 30 min se le administró los tratamientos como se describe a continuación: grupo I (control TPA): aplicando en la oreja izquierda únicamente el vehículo (acetona), grupo II (fármaco de referencia): se le aplicó indometacina a dosis de 2 mg/oreja disuelto en 50 µL de acetona y los grupos III-VIII recibieron 50 µL de los compuestos **41-42** y **44-45** en dosis de 2 mg/oreja disuelto en acetona. Seis horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente se obtuvo el tejido auricular de ambas orejas realizando cortes de 6 mm de diámetro. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la diferencia del peso entre ambas orejas con respecto al grupo control. La inflamación se comprobó como el incremento en el peso de la oreja en donde se aplicará el TPA de acuerdo a las fórmulas reportadas por Pérez-González y colaboradores⁷⁷, calculando el porcentaje de inhibición de inflamación con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(W_s - W_o) \text{ Control} - (W's - W_o) \text{ Tratamiento}] / (W_s - W_o) \text{ Control} \times 100.$$

W_o = Peso de la oreja derecha tratada únicamente con el vehículo.

W's = Peso de la oreja izquierda tratada únicamente con TPA disuelto en el vehículo (control positivo).

W_s = Peso de la oreja izquierda tratada con TPA y los tratamientos disueltos en el vehículo.

Del compuesto o compuestos que resultaron igual o más activo que el fármaco de referencia se procedió a determinar la dosis efectiva media (DE₅₀) empleando 3 dosis (0.5, 1 y 2 mg/oreja) en grupos de 5 animales.

- Inducción del proceso inflamatorio agudo con Carragenina.

Para este estudio se utilizó la metodología descrita por Pérez-González y colaboradores⁷⁷, para ello se formaron 8 grupos de 5 ratones machos seleccionados al azar que se administraron de la siguiente forma, Grupo I: carragenina, Grupo II: indometacina (20 mg/kg) vía oral (v.o) solubilizado en SSI, Grupos III-VIII:

compuestos **41-42** y **44-45** a dosis de 50 mg/kg por v.o. Todos los tratamientos se administraron una hora antes de la carragenina (agente flogístico, 2%, disuelta en SSI). El vehículo elegido para solubilizar las muestras problema fue un sistema compuesto por Tween 80:Agua (1:9) y se administró en un volumen no mayor a 10 mL/kg de peso por v.o. A cada grupo se le administró 20 µL de carragenina al 2% disuelta en SSI vía subcutánea (s.c.) en el cojinete plantar.

El desarrollo del edema se registró midiendo el diámetro del mismo con un micrómetro digital cada hora. El tiempo cero se consideró como la medición del cojinete antes de la aplicación de la carragenina y los tiempos posteriores correspondieron a las 1, 3, 5 y 7 h después de la administración del agente flogístico. El porcentaje de inhibición del edema se calculó para cada grupo comparándolo contra el control de carragenina sin tratamiento, para esto se siguieron las fórmulas descritas por Pérez-González y colaboradores⁷⁷, calculando el porcentaje de inhibición de inflamación con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{[(Et-Eo) \text{ Carragenina} - (Et-Eo) \text{ Tratamientos} / (Et-Eo) \text{ Carragenina}] \times 100}{1}$$

Et = Formación del edema a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 h).

Eo = Formación del edema al tiempo basal.

Del compuesto o compuestos que resultaron igual o más activo que el fármaco de referencia se procedió a determinar la DE₅₀ empleando 3 dosis (12.5, 25 y 50 mg/kg) en grupos de 5 animales.

7.3. Determinación de la toxicidad aguda de los compuestos objetivo.

Esta prueba se realizó para los compuestos que resultaron más activos en el modelo de carragenina y TPA. Se siguió el procedimiento TG 423 descrito por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico y la Guía de Pruebas (OCDE TG 423)⁷⁸. Se emplearon grupos de 5 animales por sexo y los tratamientos se administraron por vía intragástrica (i.g.) después de un período de ayuno de 12 h. El control recibió sólo el vehículo (Tween 80-H₂O, 1:9) y los grupos tratados

recibieron una administración única de los compuestos **41-42** y **44-45** a dosis de 50 y 100 mg/kg de peso corporal (PC) disueltos en el vehículo (Tween 80-H₂O, 1:9), en un volumen no superior a 10 mL/kg PC. Los animales se mantuvieron bajo observación durante 14 días y se registró la ganancia de peso corporal en los días 3, 7, 9 y 14. Posteriormente los animales se sometieron a eutanasia y se le extrajo el hígado, el bazo y ambos riñones y se realizó una observación macroscópica para encontrar lesiones patológicas macroscópicas y cambios relativos de peso.

7.4. Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico Sigma Plot ver 12.0. (2011-2012) para el análisis de los resultados y la elaboración gráfica. Los datos se presentaron como error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés). Los valores de peso corporal (BW) en las pruebas de toxicidad aguda y el desarrollo de edema de la pata en el modelo de carragenina se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) y con una prueba post hoc Student Newman Keuls (SNK). Resultados de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1.1. Predicción de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 34-52.

Inicialmente se propusieron un conjunto de diecinueve moléculas **34-52** (Figura 20) estructuralmente relacionadas a los compuestos **27** y **28**, de las cuales se consideró a aquellas que tuvieran una probabilidad de actividad como antiinflamatorio mayor que 0.52 (superior que los compuestos **27** y **28**, 0.505 y 0.514 respectivamente). La predicción se obtuvo utilizando el programa PASSonline.

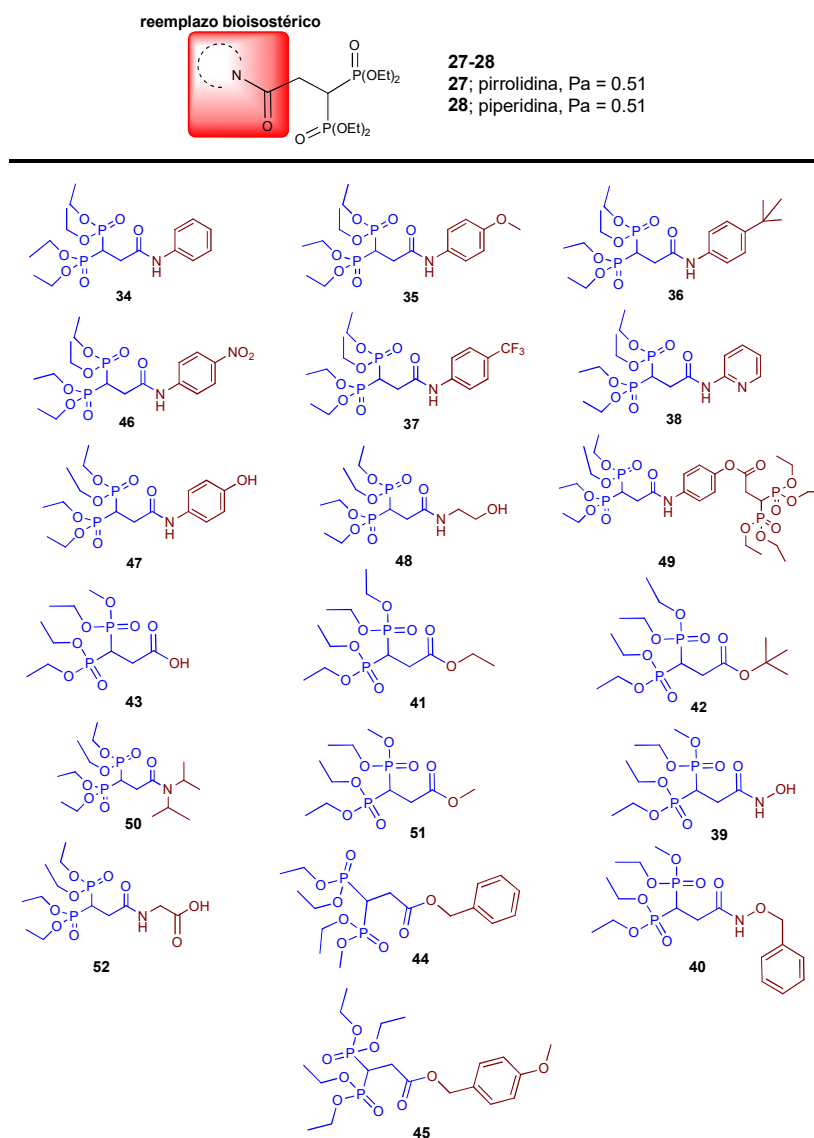


Figura 20. Moléculas **34-52** propuestas para este trabajo.

Una representación gráfica de los resultados obtenidos se presenta en la Figura 21. Es importante resaltar que la mayoría tiene predicción de actividad antiinflamatoria superior al 0.5 y solo cuatro se predijeron con baja probabilidad de generar edema como efecto adverso.

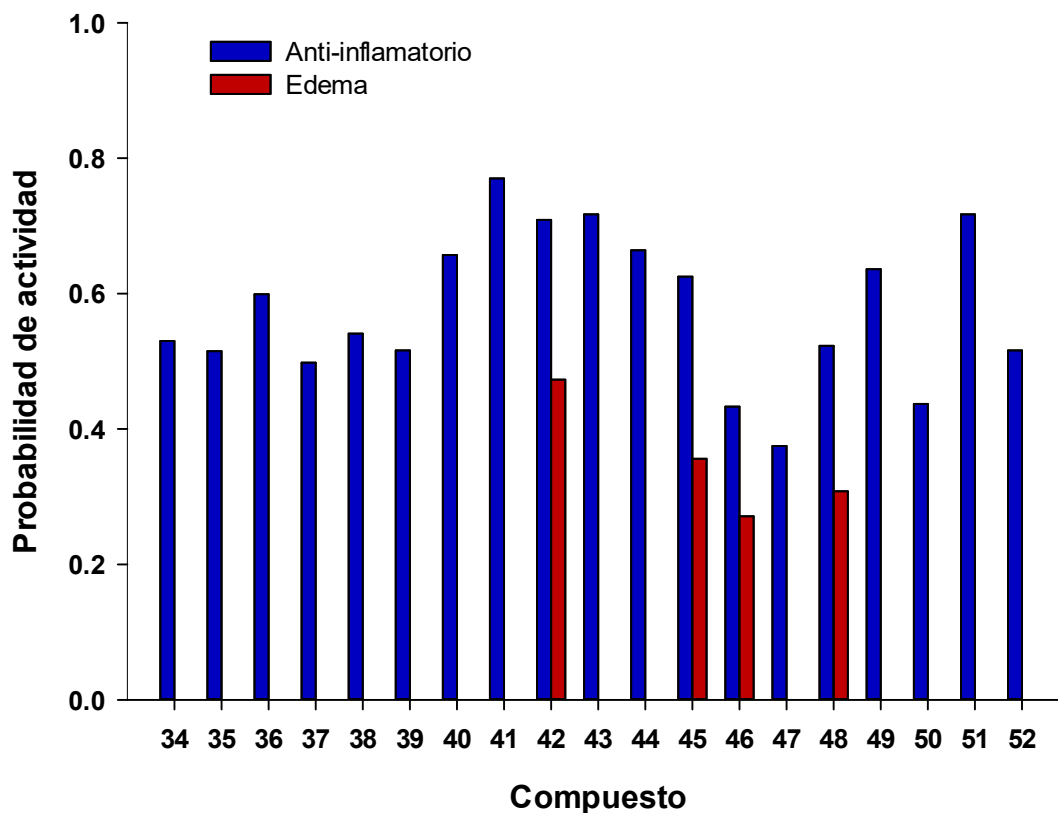


Figura 21. Resultados de la predicción de la actividad antiinflamatoria de los compuestos 34-52.

Del cribado se seleccionaron doce compuestos que cumplieron con el criterio propuesto (probabilidad de actividad como antiinflamatorio superior a 0.52) y se presentan a continuación (compuestos 34-52, Figura 22):

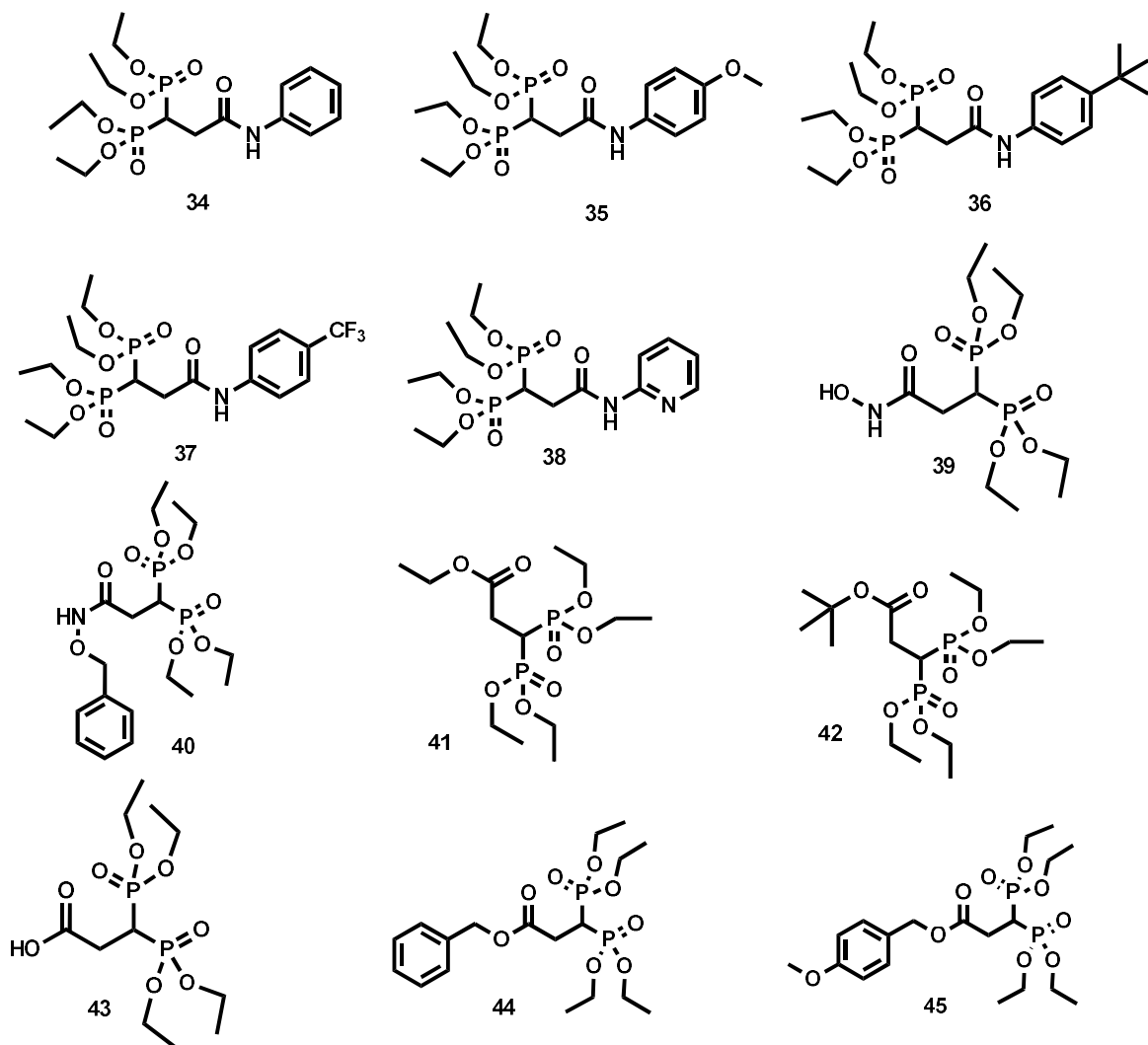
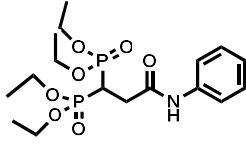
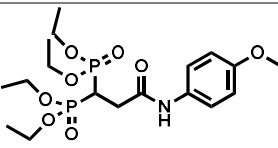
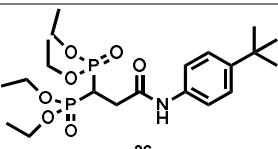
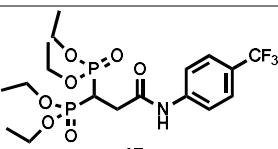
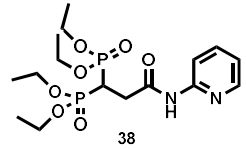
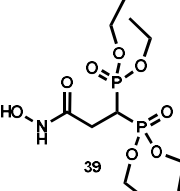
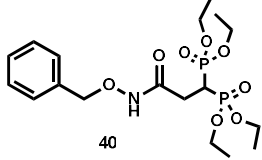
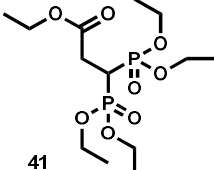


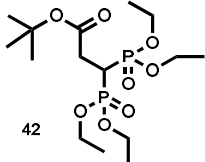
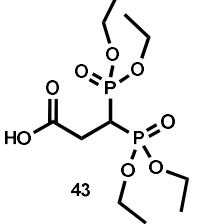
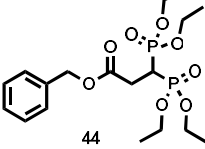
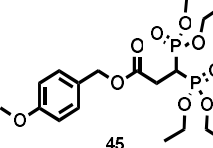
Figura 22. Moléculas seleccionadas en el primer cribado.

8.1.2. Predicción de biodisponibilidad oral de los compuestos 34-45.

El segundo cribado consistió en determinar la probabilidad de absorción pasiva por la vía oral. Esto se realizó a través de las reglas de Lipinski utilizando el programa Molinspiration. Los datos obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 4. Resultados del análisis de predicción de absorción pasiva de los compuestos **34-45** utilizando el programa Molinspiration.

COMPUESTO	Peso molecular (<500 Da)	Log P (<5)	Donar hidrógenos (<5)	Aceptar hidrógenos (<10)	TPSA	Violaciones
	421.37	1.45	1	8	100.1	0
	451.39	1.51	1	9	109.4	0
	477.48	3.16	1	8	100.1	0
	489.36	2.35	1	8	100.1	0
	422.36	0.55	1	9	113.0	0
	361.27	-0.56	2	9	120.4	0
	451.39	1.31	1	9	109.4	0
	389.32	0.09	1	9	109.4	0

	417.38	1.39	1	9	109.4	0
	346.25	-0.1	1	8	108.3	0
	436.38	1.80	0	8	97.3	0
	466.40	1.85	0	9	106.6	0

Todos los compuestos analizados cumplieron con los criterios propuestos por Lipinski y se esperó que tuvieran buena absorción. Por lo anterior, este análisis no fue criterio de selección.

8.1.3. Predicción de toxicidad de los compuestos 34-45.

Es importante mencionar las categorías de toxicidad oral aguda, porque es uno de las desventajas de los fármacos actuales y además fue criterio de selección para este trabajo.

A continuación, se presenta la clasificación de toxicidad oral aguda de las sustancias según la Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009⁷⁶ y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, OECD Test Guideline 423 (OECD TG 423)⁷⁸.

Tabla 5. Clasificación de toxicidad oral aguda de las sustancias OECD TG-423.

Toxicidad Oral Aguda					
Categoría 1 (mg/kg)	Categoría 2 (mg/kg)	Categoría 3 (mg/kg)	Categoría 4 (mg/kg)	Categoría 5 (mg/kg)	No clasificado
> 0-5 (Mortal)	> 5-50 (Mortal)	> 50-300 (Tóxico)	> 300-2000 (Nocivo)	> 2000-5000 (Podría ser nocivo)	> 5000 (Podría ser nocivo)

En busca de predecir toxicidad, el tercer cribado de selección fue comparar la predicción de actividad antiinflamatoria, DL₅₀ y toxicidad en hígado, bazo o riñón, órganos que participan en el metabolismo de fármacos (hígado y riñón) y la producción de células del sistema inmune (bazo). Para ello se utilizaron los programas PASSonline, Acutox y Adverpred, respectivamente.

Los criterios en esta etapa se basaron en la comparación de los puntajes obtenidos de cada molécula, esperando una combinación de alta probabilidad de actividad antiinflamatoria, un valor de DL₅₀ >300 mg/kg y por último, baja probabilidad de afectar riñón, hígado y/o bazo.

Los resultados sobre la toxicidad en órganos únicamente predijeron daño a riñón, por lo que solo se comparó actividad antiinflamatoria, DL₅₀ y toxicidad en riñón. Los datos son presentados a continuación en la Figura 23 y Tabla 6.

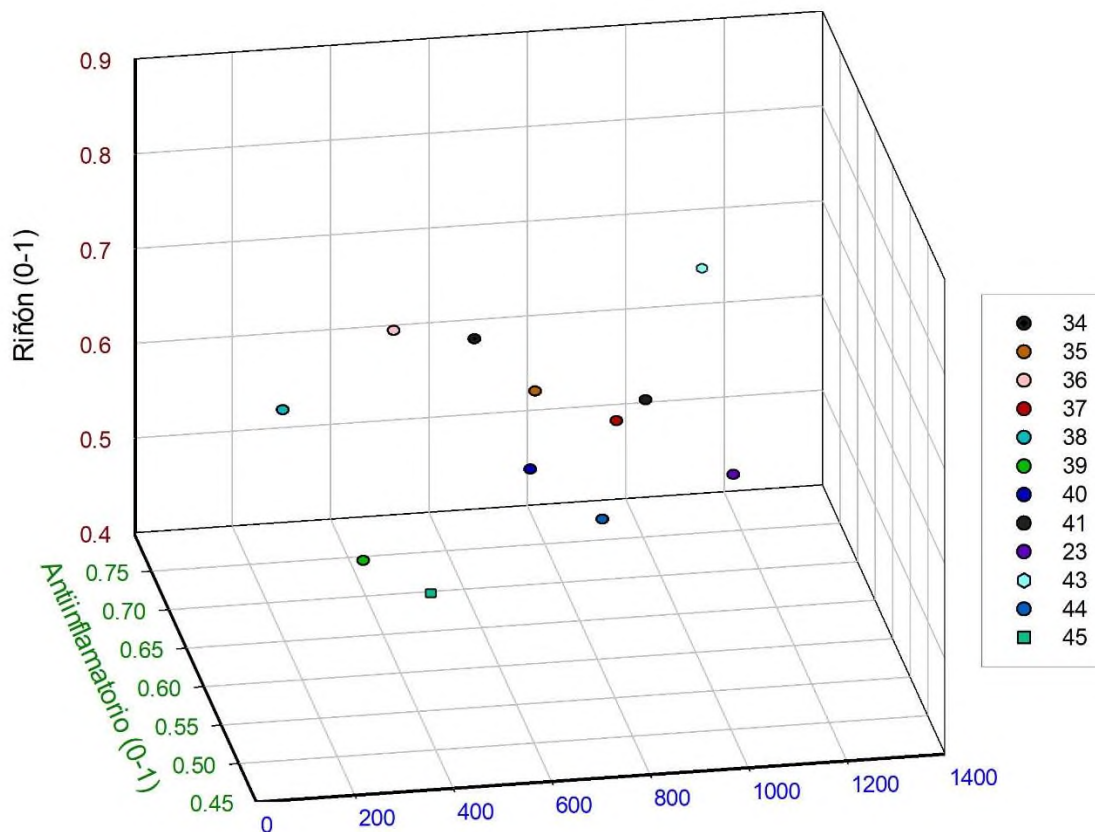


Figura 23. Actividad antiinflamatoria, DL₅₀ y toxicidad de los compuestos 34-45.

Tabla 6. Resultados de la actividad antiinflamatoria, DL₅₀ y toxicidad de los compuestos 34-45.

Compuesto	DL ₅₀ (mg/kg)	Antiinflamatorio (%)	Toxicidad en Riñón (%)
34	499.9	53.0	80.6
35	612.7	51.5	75.9
36	385.1	5.99	76.3
37	766	49.8	73.6
38	118.1	54.1	73.6
39	263.8	51.6	59.2
40	704.1	65.7	55.8
41	1019	77.0	52.8
42	1154	70.9	49.4
43	1096	71.7	70.7
44	855.6	66.4	49.4
45	479.3	62.5	46.1

Como se muestra en la tabla anterior, los compuestos que combinaron los mejores valores fueron los compuestos **41-42** y **44-45** (Figura 24).

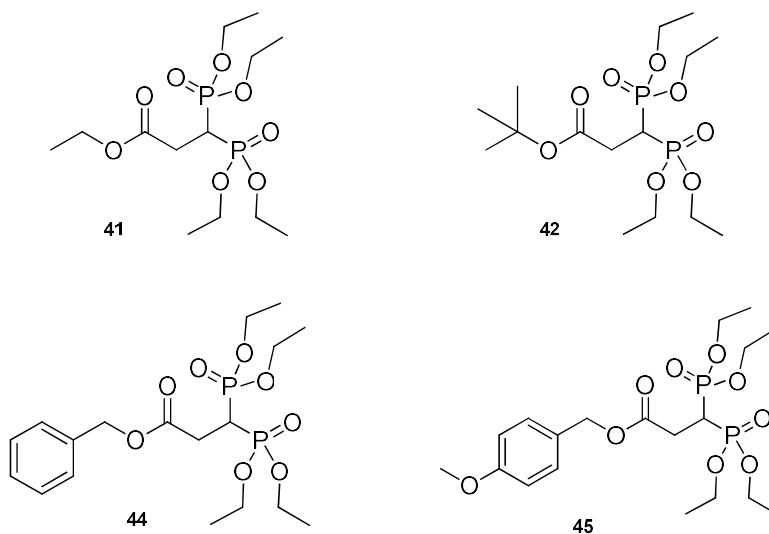
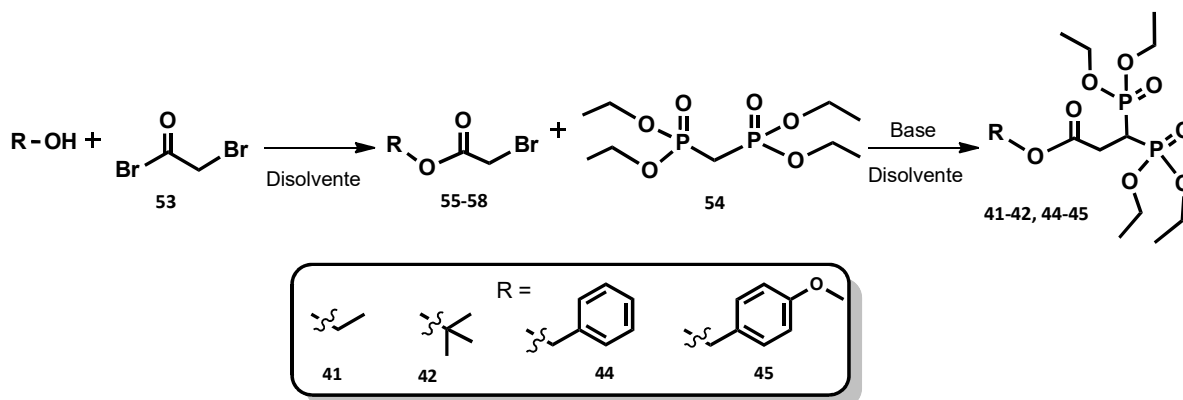


Figura 24. Moléculas seleccionadas en tres etapas (actividad antiinflamatoria, DL₅₀ y toxicidad en riñón).

8.2. Síntesis de los compuestos objetivo 41-42 y 44-45.

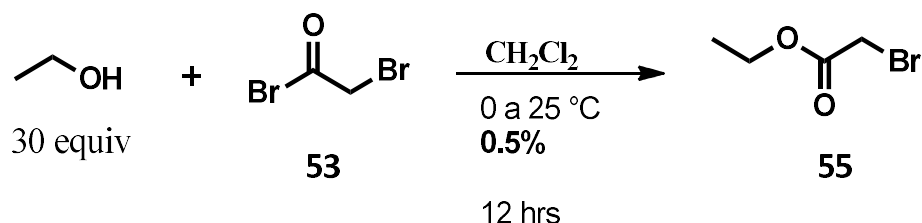
Para la obtención de los compuestos objetivo se propuso una ruta de síntesis de dos etapas, primero una esterificación entre un alcohol y bromuro de bromoacetilo para formar el correspondiente éster. Posteriormente mediante una C-alkilación se hizo reaccionar el bisfosfonato **54** con los ésteres **55-58** para así obtener los bisfosfonatos **41-42** y **44-45** como se muestra en el Esquema 7.



Esquema 7. Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los compuestos **41-42** y **44-45**.

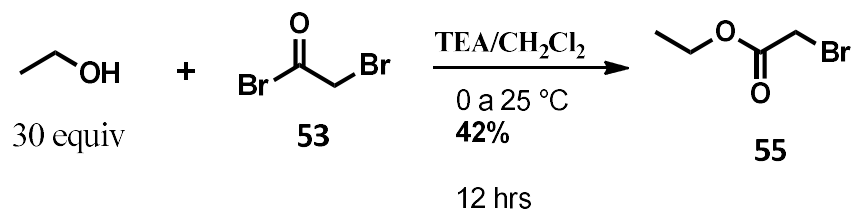
Síntesis de los ésteres 55-58.

Para la síntesis del bromoacetato de etilo **55**, en un primer ensayo se utilizó un exceso de etanol disuelto en CH_2Cl_2 y posteriormente se adicionó a goteo lento bromuro de bromoacetilo **40**. La temperatura de adición fue 0°C y se dejó reaccionar hasta alcanzar la temperatura ambiente (Esquema 8). Se observó una mezcla de tonalidad amarilla, baja formación del producto y bromuro de hidrógeno disuelto en el disolvente, causando dificultad para manipular la reacción, por lo tanto, se buscaron otras condiciones de reacción.



Esquema 8. Ensayo 1. Síntesis del bromoacetato de etilo **55**

Con la siguiente reacción se buscó neutralizar el bromuro de hidrógeno formado, para ello se utilizó 1.2 equivalentes de trietilamina, etanol en exceso y bromuro de bromoacetilo **53** como reactivo limitante. El disolvente utilizado fue diclorometano, 0°C hasta alcanzar temperatura ambiente (Esquema 9).



Esquema 9. Ensayo 2. Síntesis del bromoacetato de etilo **55**

El seguimiento de la reacción se realizó por TLC comparando el desplazamiento de la trietilamina, bromuro de bromoacetilo y el crudo de reacción. En la Figura 25 se muestra la placa de TLC, en la cual se utilizó como fase móvil un sistema $\text{AcOEt}:\text{MeOH}$ (90:10) y como revelador radiación UV a 254 nm, yodo y vainillina, respectivamente. Se pudo observar una mancha con un $R_f=0.4$ que se asocia al compuesto **55**.

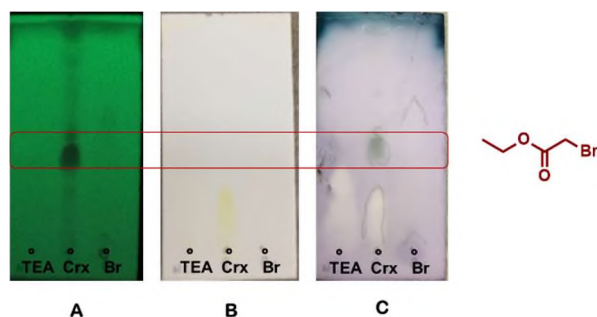


Figura 25. TLC del crudo de reacción.

Mediante espectroscopia IR fue posible confirmar la formación del compuesto **55** con un rendimiento del 42%. Este compuesto previamente ha sido sintetizado y su espectro de IR fue comparado con el derivado obtenido y se muestra en la Figura 26. Se resalta la señal en 1733 cm^{-1} correspondiente a la tensión del grupo carbonilo, además de las señales en 1273 y 1024 cm^{-1} que corresponden a la tensión del enlace C-O.

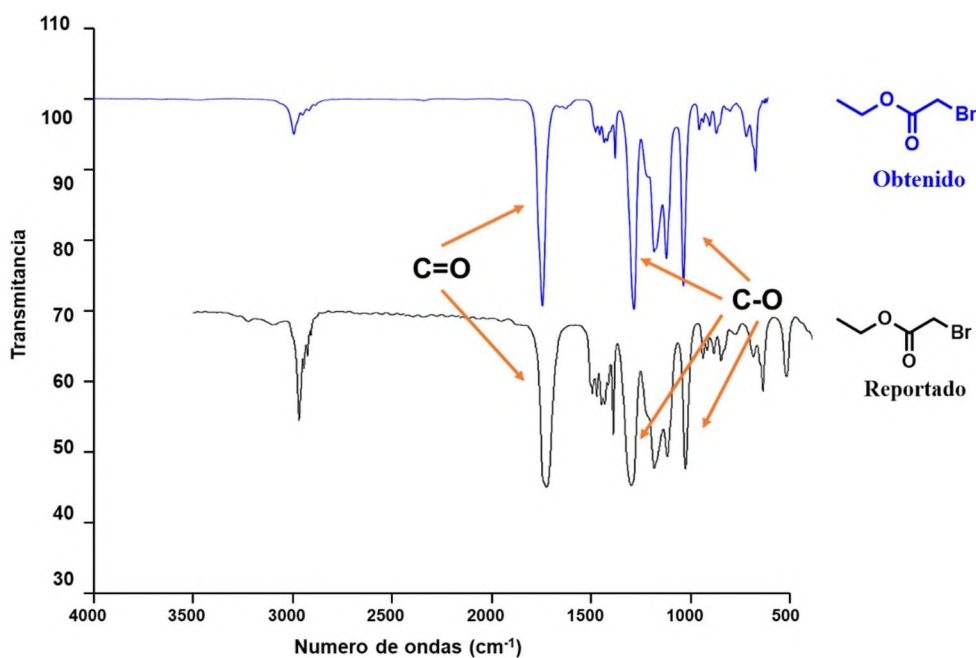


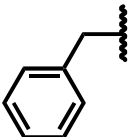
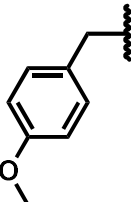


Figura 26. Espectro de IR del bromoacetato de etilo **55**.

Las condiciones del ensayo anterior fueron extrapoladas a la síntesis del bromoacetato de terbutilo y de bencilo (**56** y **57**, respectivamente). Como se puede observar en la Tabla 7, se obtuvo un rendimiento del 71% para **56**, mientras que un seguimiento de la reacción mediante TLC reveló una baja formación del compuesto

57. Además, como parte del proceso de separación del producto **57** de la mezcla de reacción, es necesario realizar extracciones líquido-líquido y posteriormente eliminar el alcohol remanente a presión reducida. Sin embargo, el alcohol bencílico tiene un alto punto de ebullición (205 °C) dificultando el procesamiento de la muestra, por lo cual, se decidió optar por otras condiciones de reacción.

Tabla 7. Condiciones de reacción para la obtención de los compuestos **55-58**.

R	Equiv. de alcohol	Equiv. de 4	Disolvente	Base	Rendimiento
	Exceso	1	CH ₂ Cl ₂	TEA	42%
	Exceso	1	CH ₂ Cl ₂	TEA	71%
	1	1.4	MeCN	NaHCO ₃	71%
	1	1.4	MeCN	NaHCO ₃	91%

Una revisión bibliográfica permitió identificar nuevas condiciones de reacción que favorecieron la formación de **57**. Siguiendo el método descrito por Ideue y colaboradores, se utilizó alcohol bencílico como reactivo limitante, 1.4 equivalentes de bromuro de bromoacetilo y bicarbonato de sodio como base (Tabla 7). El disolvente empleado fue acetonitrilo y temperatura de adición de 0°C hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Después de 12 horas de reacción, mediante TLC se observó una reacción bastante selectiva y posteriormente el producto fue identificado por IR al contrastarlo con el

espectro ya reportado (Tabla 7, Figura 27)⁷⁹, nuevamente, se observó la señal en 1700 cm^{-1} correspondiente a la tensión del grupo carbonilo, además de las señales en 1273 y 1000 cm^{-1} que corresponden a la tensión del enlace C-O. La técnica utilizada fue FTIR-ATR (Attenuated total reflection, por sus siglas en inglés), mientras que los espectros reportados corresponden a la técnica liquid film.

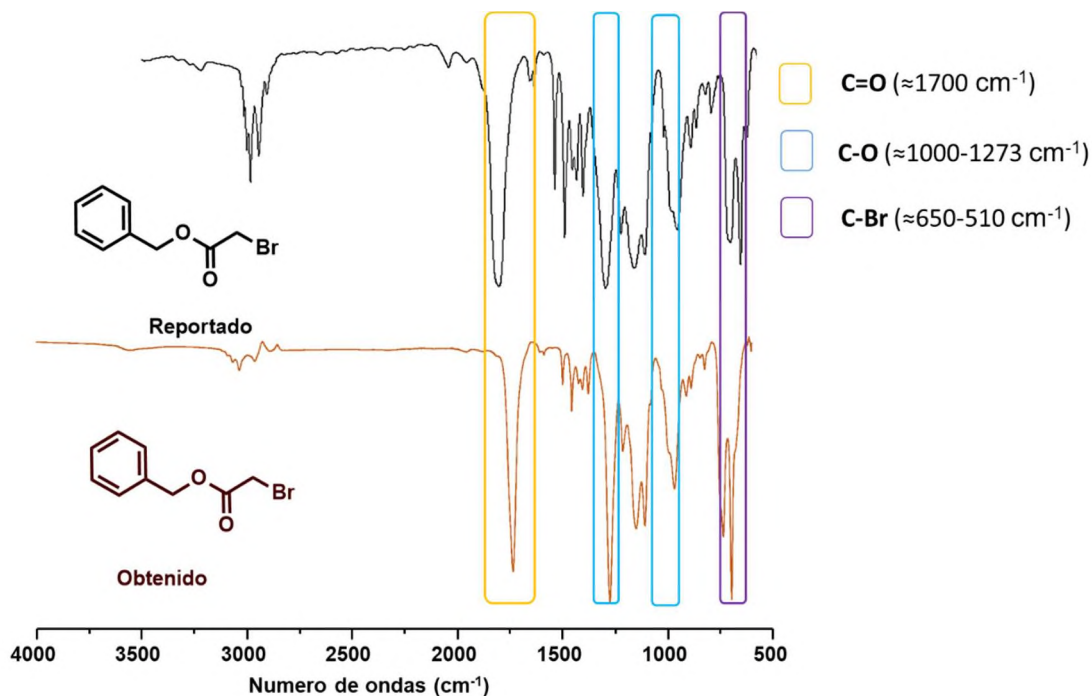
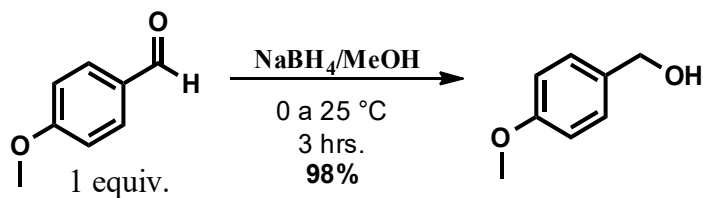


Figura 27. Espectro de IR del bromoacetato de etilo **57**.

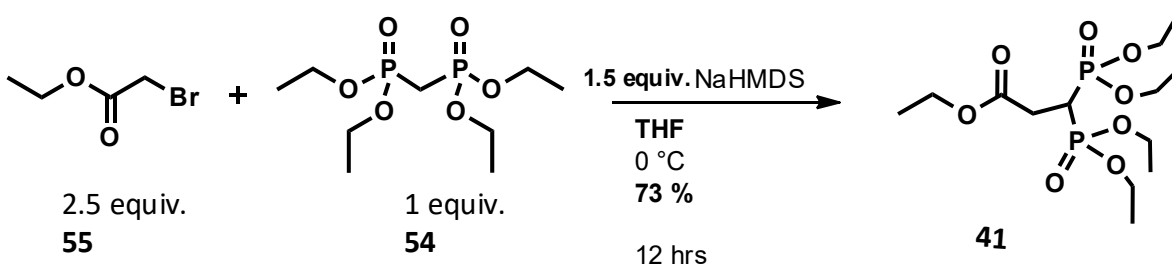
Para la formación del derivado del 4-metoxibencilo **58**, se siguió la misma metodología utilizada en la síntesis del derivado de bencilo **57**, obteniéndose un rendimiento del 91% (Tabla 7). Es importante mencionar que el alcohol 4-metoxibencílico se preparó mediante la reducción de 4-metoxibenzaldehído con borohidruro de sodio (NaBH_4), metanol como disolvente y temperatura de reacción de 0°C hasta alcanzar la temperatura ambiente (Esquema 10).



Esquema 10. Síntesis del alcohol 4-metoxibencílico.

Síntesis de los bisfosfonatos 41-42 y 44-45.

Continuando con la última etapa de síntesis, se tomó como base la metodología descrita por Ramírez-Marroquín y colaboradores⁴⁵. Para la síntesis de **41** se hizo reaccionar 2.5 equivalentes del bromoacetato de etilo **55** y un equivalente del bisfosfonato **54** utilizando como base 1.5 equivalentes de hexametildisilazuro de sodio (NaHMDS) en THF anhidro, en atmósfera de nitrógeno durante 12 horas observándose la formación de un sólido blanco (NaBr) y una tonalidad amarilla en la mezcla de reacción (Esquema 11).



Esquema 11. Síntesis del bisfosfonato **41**.

El resultado observado en TLC revelada con *p*-anisaldehído fue la formación de un compuesto mayoritario (Figura 28).



Figura 28. TLC del crudo de reacción.

Mediante la purificación por CC se logró la separación del compuesto **41** con un rendimiento del 73% y su caracterización se realizó mediante un análisis por Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS, por sus siglas en inglés) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C y ³¹P. La masa calculada [M+H]⁺ fue de 375.1340 Da y la masa obtenida fue de 375.1259 Da; además, se observaron

aductos con sodio ($[M+Na]^+=397.1156$ Da) y dímero con aducto con sodio ($[2M+Na]^+=771.2415$ Da) (Figura 29).

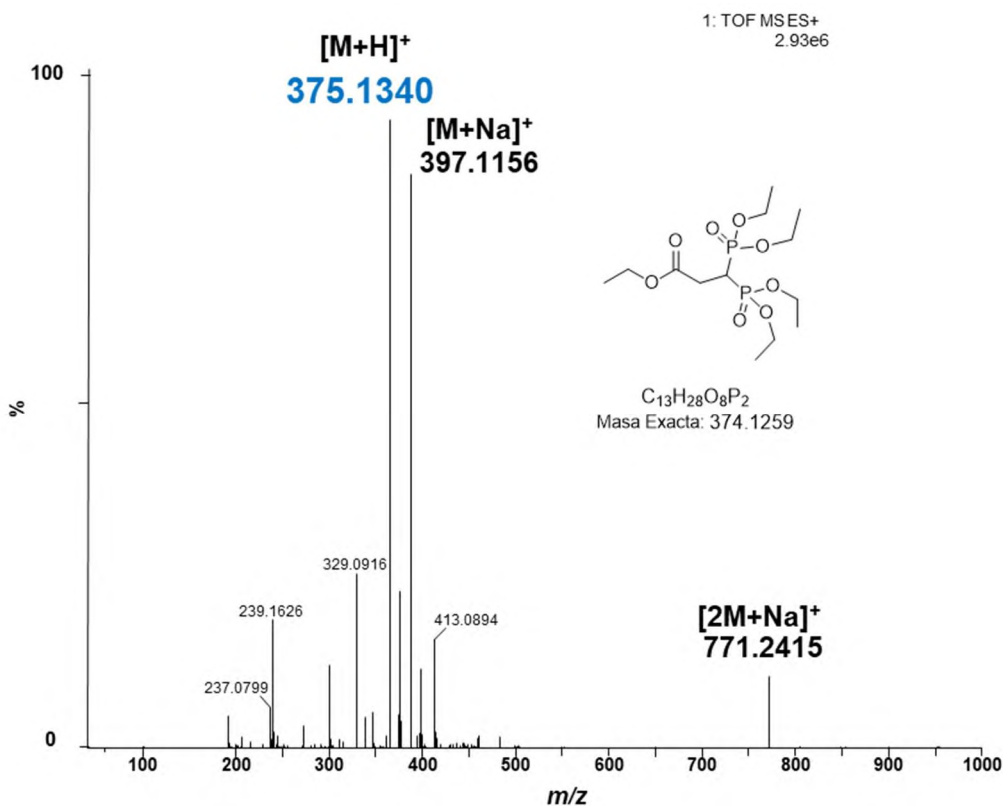


Figura 29. Espectro HRMS TOF MS ES⁺ del bisfosfonato **41**.

Por su parte, en el análisis por espectrometría de RMN de ¹H se observó una señal triple de triples en 3.11 ppm, que se asignó al hidrógeno del carbono β al carbonilo, dado el acoplamiento que tiene con los dos átomos de fósforo geminales (²J_{H-P}=23.8 Hz) y con los dos hidrógenos vecinales (³J_{H-P}=6.2 Hz). La señal triple de dobles en 2.80 ppm corresponde a los protones del carbono α, teniendo acoplamiento con dos fósforos (³J_{H-P}=15.9 Hz) y un hidrógeno del carbono β (³J_{H-H}=6.3 Hz) (Figura 30).

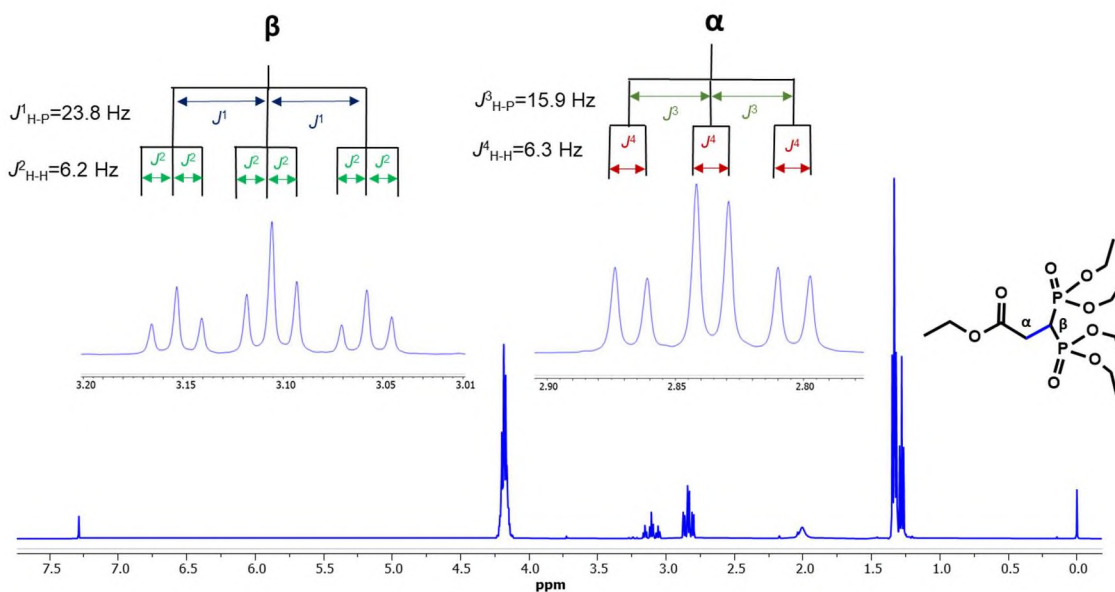
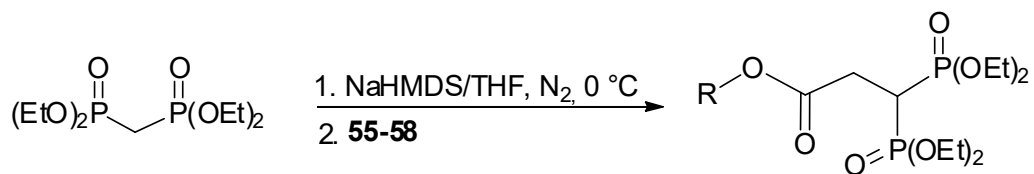


Figura 30. Espectro RMN de ^1H del compuesto **41**.

El resultado favorable, dio la pauta para utilizar las mismas condiciones de reacción en la formación de los compuestos **42**, **44** y **45** derivados de alcohol etílico, bencílico y 4-metoxibencílico, respectivamente. Como se puede apreciar en el siguiente esquema, los rendimientos para los bisfosfonatos **42**, **44** y **45** fueron de 44, 65 y 41%, respectivamente. Todos los compuestos fueron caracterizados por HRMS y RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P .



- 41**; R = Et, 73%
- 42**; R = *t*-Bu, 44%
- 44**; R = Bn, 65%
- 45**; R = 4-OCH₃Bn, 41%

Esquema 12. Síntesis de los bisfosfonato **41-42** y **44-45**.

8.3. Resultados de la actividad antiinflamatoria aguda de los bisfosfonatos 41-42 y 44-45.

Como parte del objetivo específico número 2, se procedió a evaluar los bisfosfonatos sintetizados **41-42** y **44-45** mediante dos modelos *in vivo* de inflamación aguda en ratones Balb/C: carragenina y TPA.

Se ha demostrado que la respuesta inmune en ratones difiere por variables como edad, sexo y peso⁸⁰⁻⁸²; por lo cual, el modelo de carragenina y TPA fue en principio evaluado en ambos sexos, posteriormente el cálculo de la DE₅₀ y estudios de toxicidad se realizaron utilizando ratones hembra. Los resultados son presentados a continuación.

8.3.1.1. Modelo de carragenina.

Los bisfosfonatos **41-42** y **44-45** (Figura 31) fueron completamente solubilizados en Tween 80:agua en una proporción 1:9 y evaluados a 25 mg/kg como dosis exploratoria, utilizando indometacina como control positivo (20 mg/kg, Sigma-Aldrich).

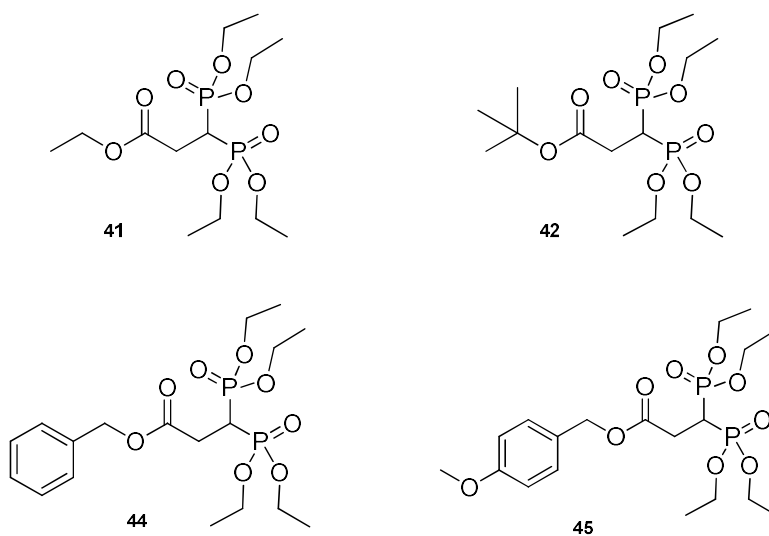


Figura 31. Moléculas seleccionadas para la evaluación biológica.

Además, buscando una comparación más exacta con las amidas de partida **27** y **28** reportadas por Ramírez-Marroquín y colaboradores⁴⁵, los compuestos **27** y **28**

fueron evaluadas nuevamente a dosis de 25 mg/kg obteniéndose un porcentaje de inhibición de 20.9 y 18.5 %, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de la actividad antiinflamatoria de los compuestos de partida **27** y **28** en el modelo de carragenina en ratones hembra Balb/C a la quinta hora del tratamiento.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Formación de edema subplantar (mm)	% de Inhibición
Control	--	0.722±0.03	--
Indometacina	20	0.438±0.03 ^a	39.2525
27	25	0.8860±0.02 ^{a,b}	20.9352
28	25	0.9122±0.03 ^{a,b}	18.5972

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo. ^avs. Control carragenina; ^bvs. Indometacina (Sigma-Aldrich).

Por otro lado, el experimento donde se evaluaron los bisfosfonatos **41-42** y **44-45**, se observó la formación del edema subplantar del ratón durante un periodo de 24 horas (Figura 32). Dentro de este lapso se realizaron mediciones a la hora 1, 3, 5, 7 y 24. Las siguientes gráficas muestran el comportamiento de los diferentes tratamientos, resaltando la hora 5 en donde se puede observar el mayor efecto inflamatorio de la carragenina y el efecto antiinflamatorio máximo de la indometacina generado a partir de la inhibición de la enzima COX-2. Este efecto ya ha sido estudiado y se conoce que la sobreexpresión de COX-2 se lleva a cabo dentro de la hora 4 y 5 donde de manera general, los AINEs ejercen su mayor efecto^{45,77,83}.

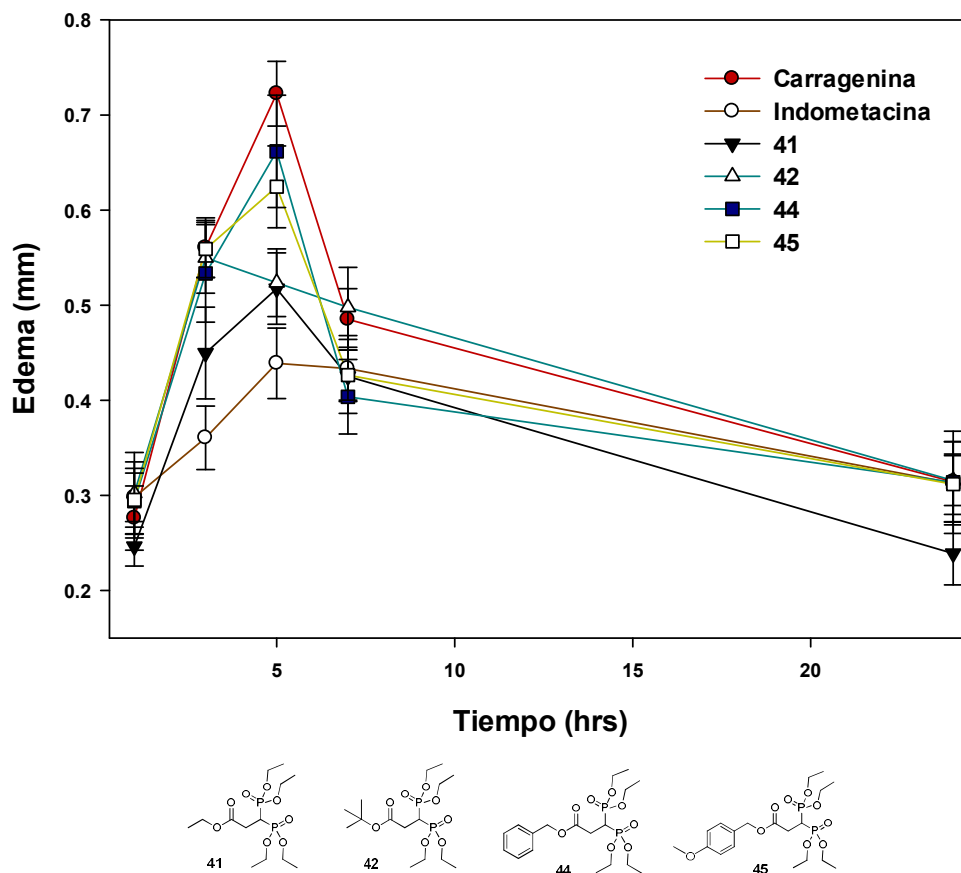










Figura 32. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **41-42** y **44-45** en el modelo de carragenina en ratones hembra Balb/C durante las 24 horas.

Respecto al efecto observado en los ratones hembra, el análisis indica que en la primera hora no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. El efecto antiinflamatorio de la indometacina se observó a partir de la hora 3 y muestra diferencia significativa con el grupo control y los tratamientos **42**, **44** y **45** (Anexos, Tabla 14). A la hora 5 se tiene el mayor efecto antiinflamatorio de la indometacina (39%) así como de los compuestos **41** (28%) y **42** (27%) y a pesar de que presentan medias distantes, no son diferentes estadísticamente (Tabla 9). Respecto a la hora 7 y 24, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Únicamente el compuesto **41** mostró actividad antiinflamatoria (24%) hasta las 24 hrs (Figura 32).

Tabla 9. Resultados de la actividad antiinflamatoria de los compuestos **41-42 y 44-45** en el modelo de carragenina en ratones Balb/C a la quinta hora del tratamiento.

Sexo del ratón	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Formación de edema subplantar (mm)	% de Inhibición
Hembras	Control	--	0.722±0.03 ^c	--
	Indometacina (Sigma-Aldrich)	20	0.438±0.03 ^{a,c}	39.2525
	41 	25	0.517±0.03 ^{a,c}	28.3765
	42 	25	0.523±0.03 ^{a,c}	27.5262
	44 	25	0.661±0.06 ^{b,c}	8.4042
	45 	25	0.624±0.04 ^{b,c}	13.5654
Machos	Control	--	0.830±0.017 ^a	--
	Indometacina (Sta. Cruz Bio.)	20	0.530±0.04 ^{a,c}	36.1272
	41 	25	0.626±0.03 ^{a,b,c,d}	24.5665
	42 	25	0.657±0.02 ^{b,c,d}	20.8574
	44 	25	0.716±0.03 ^{b,c,d}	13.8006
	45 	25	0.755±0.06 ^{b,d}	9.0559

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo.

^avs. Control carragenina_hembras; ^bvs. Indometacina_hembras; ^cvs. Control carragenina_machos; ^dvs. Indometacina_machos;

Para el caso de los ratones macho, los resultados mostraron una tendencia similar a la observada en el experimento realizado en las hembras, la diferencia más notable consistió en una disminución general del efecto antiinflamatorio que oscila alrededor del 4% del porcentaje en cada uno de los tratamientos. Un ejemplo de ello es la disminución en el efecto antiinflamatorio de indometacina de 39 a 36%. Otro efecto observable fue el efecto proinflamatorio del compuesto **45** durante toda la cinética realizada a excepción de la hora 5 donde tuvo un porcentaje de inhibición de la inflamación del 9% (Figura 33 y Anexos Tabla 15). De igual manera los compuestos más activos fueron **41** y **42**.

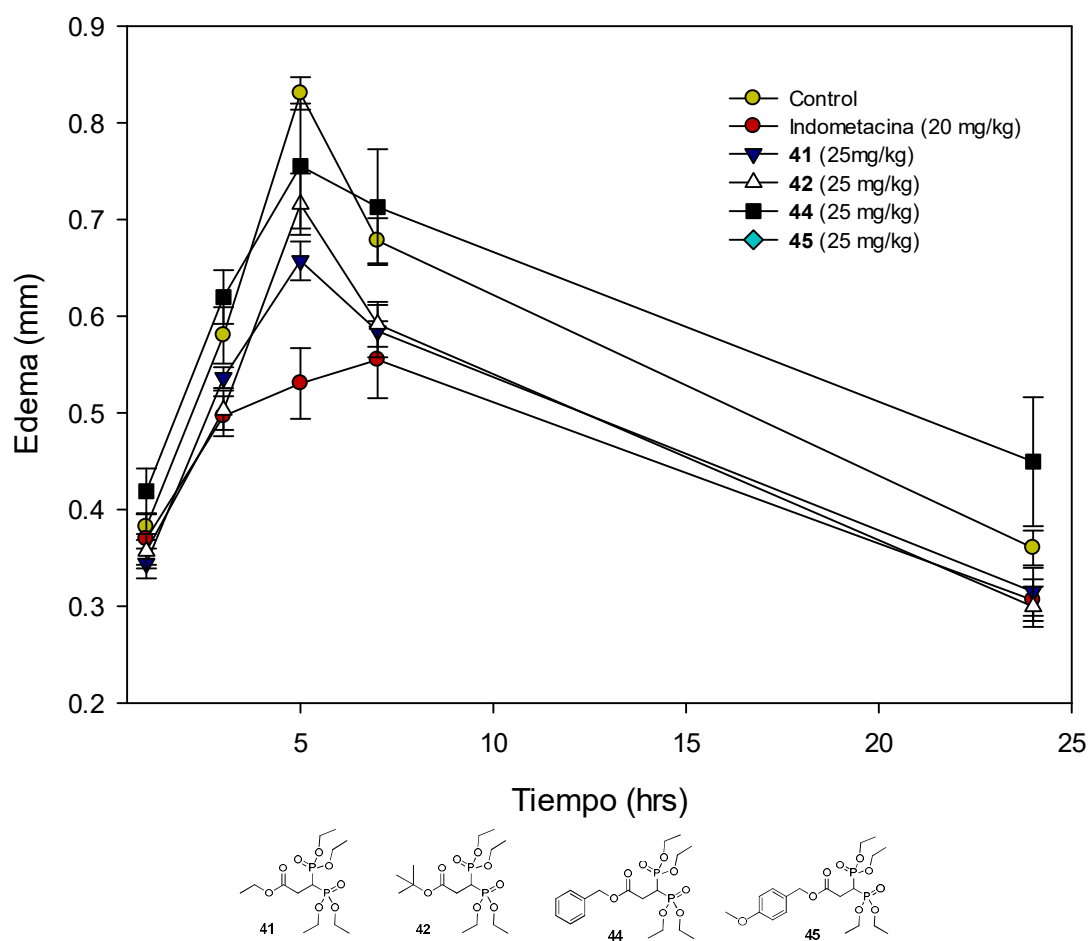


Figura 33. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **41-42** y **44-45** en el modelo de carragenina determinado en ratones macho Balb/C durante las 24 horas.

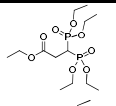
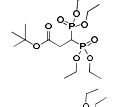
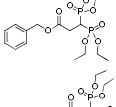
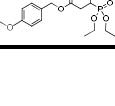
Finalmente, el análisis estadístico de ANOVA de una vía, se encontró que a la quinta hora del experimento, no hay diferencias significativas entre el efecto de los

tratamientos y el sexo del ratón cuando se analizaron animales de un peso semejante (Ver Tabla 9).

Cabe hacer mención que la solubilidad fue completa y homogénea para todos los compuestos al utilizar como vehículo Tween 80:agua en una proporción 1:9, por lo que el efecto es directamente asociado a la estructura de los compuestos evaluados.

Este efecto concuerda parcialmente con las predicciones obtenidas mediante el programa PASS, donde el compuesto que se predice con mayor actividad antiinflamatoria es el compuesto **41** seguido del compuesto **42**. Lo anterior se puede apreciar en la Tabla 10.

Tabla 10. Comparación de la actividad antiinflamatoria obtenida *in silico* (programa PASSonline) y la experimental en el modelo de carragenina a la quinta hora del tratamiento.

Compuesto	Predicción de actividad antiinflamatoria (PASSonline)	% de Inhibición
41 	0.770	28
42 	0.709	27
44 	0.664	8
45 	0.625	13

Con esto se demuestra una relación directa entre los resultados de predicción y el ensayo por el método carragenina, que al modificar el grupo funcional amida por un éster de cadena corta se favorece el efecto antiinflamatorio.

Finalmente, la determinación de la DE₅₀ fue realizado para los compuestos más activos (**41** y **42**). Tres dosis fueron empleadas, 12.5, 25 y 50 mg/kg de peso del ratón. El compuesto derivado de *ter*-butilo **42** presentó un comportamiento dosis-dependiente (Figura 34) alcanzando su mayor efecto (37 % de inhibición) a los 50 mg/kg. El análisis de regresión lineal dio como resultado la siguiente ecuación:

$Y=0.7034x+3.7931$, $R^2 = 0.8608$; y por extrapolación se determinó que la $DE_{50} = 65.7$ mg/kg.

Para el compuesto derivado de etilo **41** también se observó una relación dosis-dependiente (Figura 34) con su mayor efecto de inhibición del 34% a dosis de 50 mg/kg y una tendencia que se ajusta a la siguiente ecuación: $Y=0.3213x+18.208$, $R^2 = 0.9864$. Mediante una extrapolación se determinó que la $DE_{50} = 98.95$ mg/kg.

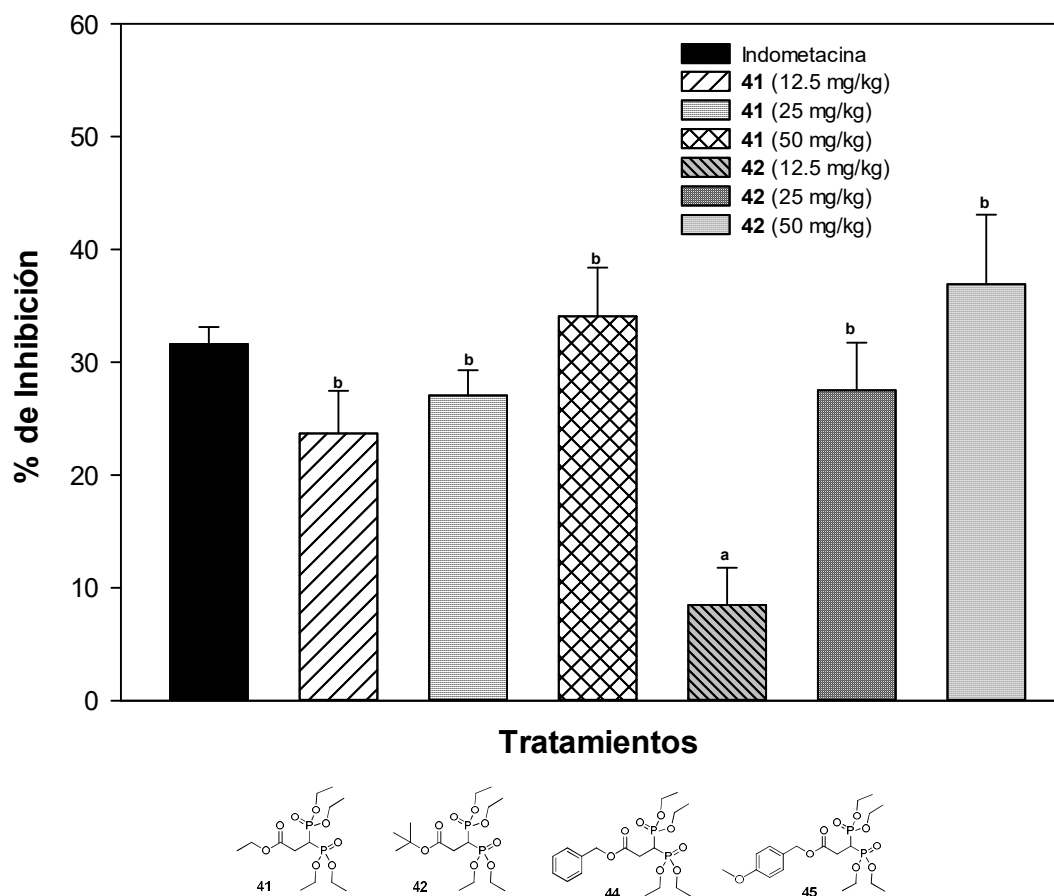


Figura 34. Porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria aguda oral de los compuestos **41** y **42** a diferentes concentraciones en el modelo de carragenina en ratones hembra Balb/C. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo. ^avs. Indometacina. ^bvs. 42 (12.5 mg/kg).

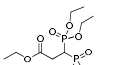
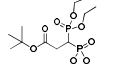
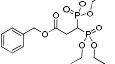
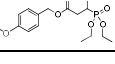
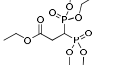
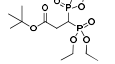
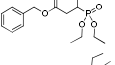
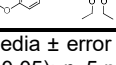
Con los resultados de DE_{50} obtenidos, podemos observar que el fármaco más potente es el derivado de *ter*-butilo **42**, para el cual se calculó que el porcentaje de inhibición del 50% de la inflamación se logra a dosis de 65.7 mg/kg. Por el contrario,

el compuesto derivado de etilo **41** necesita una dosis de 98.95 mg/kg para que se logre este mismo porcentaje de inhibición (50%).

8.3.1.2. Modelo de TPA.

Los resultados de este experimento se describen a continuación en la Tabla 11 y corresponden a los datos obtenidos a la sexta hora después de la aplicación de TPA para ambos sexos.

Tabla 11. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **41-42 y 44-45** en el modelo de TPA en ratones Balb/C a la quinta hora del tratamiento.

Sexo del ratón	Tratamiento	Dosis	Edema auricular	% inhibición
Hembras	Control		6.63 mg ± 0.14 ^c	--
	Indometacina (Sigma-Aldrich)	2 mg/oreja	5.20 mg ± 0.38 ^{a,c,d}	21.55
	41 	2 mg/oreja	4.84 mg ± 0.47 ^{a,c}	26.94
	42 	2 mg/oreja	5.24 mg ± 0.33 ^{a,c,d}	20.90
	44 	2 mg/oreja	4.22 mg ± 0.32 ^{a,c}	36.20
	45 	2 mg/oreja	3.86 mg ± 0.38 ^{a,b,c}	41.81
Machos	Control	0.05 µg/µl	8.80 mg ± 0.46 ^a	--
	Indometacina (Sta. Cruz Biotechnology)	2 mg/oreja	3.92 mg ± 0.37 ^{a,b,c}	55.45
	41 	2 mg/oreja	6.56 mg ± 0.19 ^{b,c,d}	25.45
	42 	2 mg/oreja	6.70 mg ± 0.39 ^{b,c,d}	23.86
	44 	2 mg/oreja	5.22 mg ± 0.37 ^{c,d}	40.68
	45 	2 mg/oreja	3.88 mg ± 0.21 ^{a,b,c}	55.90

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo.

^avs. Control TPA_hembras; ^bvs. Indometacina_hembras; ^cvs. Control TPA_machos; ^dvs. Indometacina_machos;

El vehículo utilizado fue acetona, para el cual los compuestos **41-42** y **44-45** se solubilizaron completamente y por tal motivo no fue una variable a considerar como responsable del efecto.

Dentro del conjunto de compuestos evaluados en ratones hembra, los derivados de bencilo y 4-metoxibencilo **44** y **45**, respectivamente, tuvieron el mejor efecto antiinflamatorio tópico con un porcentaje de inhibición de 36 y 41%, respectivamente, en comparación con el grupo control (Tabla 11). Cabe hacer mención que en el experimento de carragenina, por administración intragástrica, los compuestos antes mencionados presentaron baja actividad antiinflamatoria.

En los ratones machos, los compuestos **44** y **45** también tuvieron el mayor efecto antiinflamatorio con un porcentaje de inhibición de 40.68 y 55.90%, respectivamente, en comparación con el grupo control. El comportamiento de los tratamientos concuerda con la tendencia observada en el experimento en ratones hembra, con la diferencia de que los compuestos aumentaron su efecto (Tabla 11). El compuesto derivado de 4-metoxibencilo **45** mostró efecto comparable a indometacina.

También, se realizó el análisis estadístico para ver las diferencias de los tratamientos por efecto del sexo del animal. Como se observa, los dos efectos notables son la variación en el porcentaje de inhibición de la indometacina y que el compuesto **45** también tuvo mayor potencia en machos que en hembras, no obstante, la tendencia general en el comportamiento no cambió (Tabla 11).

En el caso de la indometacina, este efecto es asociado a la diferencia de la procedencia del fármaco. Para el experimento en ratones hembra se utilizó indometacina de Sigma-Aldrich, mientras que para el caso de los machos se empleó indometacina de Santa Cruz-Biotechnology de reciente adquisición.

En conclusión, los compuestos derivado de etilo y *ter*-butilo **41** y **42** tienen mayor potencia en el modelo de carragenina administrados por vía oral, mientras que los compuestos derivados de bencilo y 4-metoxibencilo **44** y **45**, respectivamente, fueron más activos en el modelo de TPA administrados por vía tópica.

Este comportamiento contrario al experimento de carragenina se puede explicar por el efecto de la vía de administración y la liposolubilidad de los compuestos evaluados.

Los compuestos bencilo y 4-metoxibencilo **44** y **45**, respectivamente, presentan mayor liposolubilidad conferida por el anillo aromático en su estructura (Figura 35) y por ende, tienen mayor capacidad de permear las membranas lipídicas de las células epiteliales de la oreja del ratón. Lo anterior se puede explicar por el coeficiente de reparto calculado para los compuestos evaluados (Ver Tabla 9) donde el LogP para los bisfosfonatos **41** y **42** fue 0.58 y 1.39, mientras que para **44** y **45** fue de 1.80 y 1.85, respectivamente.

Al absorberse con mayor facilidad, se genera una mayor concentración del compuesto en el sitio de daño, además, a diferencia del modelo de carragenina, se evita el metabolismo de primer paso, lo que puede estar generando un mejor efecto antiinflamatorio de los bisfosfonatos **44** y **45**.

También, se demostró que ligeros cambios en la estructura de los bisfosfonatos evaluados pudo potenciar la actividad antiinflamatoria. Tal es el caso de los derivados de bencilo y 4-metoxibencilo **44** y **45**, respectivamente, donde el sustituyente metoxilo en la posición *para* del anillo aromático (bisfosfonato **45**) aumenta la actividad antiinflamatoria (Figura 35).

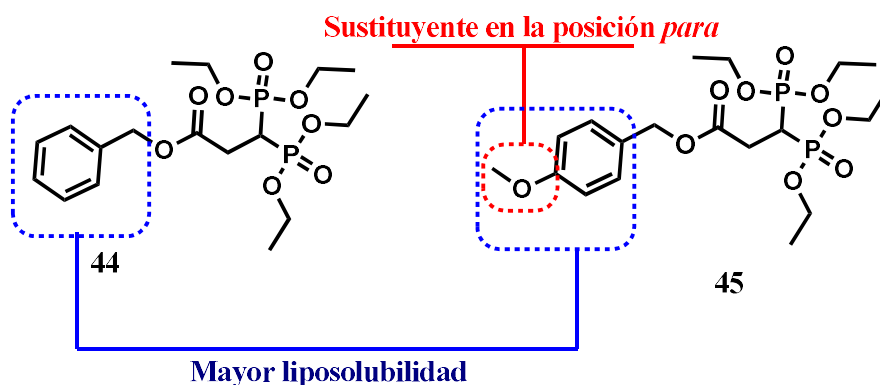


Figura 35. Comparación estructural entre los compuestos **44** y **45** en el modelo de TPA.

Posteriormente, se determinó la DE₅₀. Se utilizaron tres dosis diferentes (0.5, 1 y 2 mg/oreja) de los compuestos **44** y **45**.

Como se puede observar (Figura 36), el efecto observado fue dosis-dependiente para ambos compuestos evaluados.

En este nuevo experimento un cambio notorio fue observado. La actividad antiinflamatoria del compuesto **44** (2 mg/oreja) fue mayor en comparación con el experimento anterior, aumentado de 36 a 70%.

Los resultados variables en este tipo de experimentos se asocian a las distintas respuestas en el metabolismo y sistema inmune de los animales. Sin embargo, la tendencia del compuesto **44** permitió identificar una $DE_{50} = 1.4$ mg/oreja ($Y = 34.601x + 1.7671$, $R^2 = 99$).

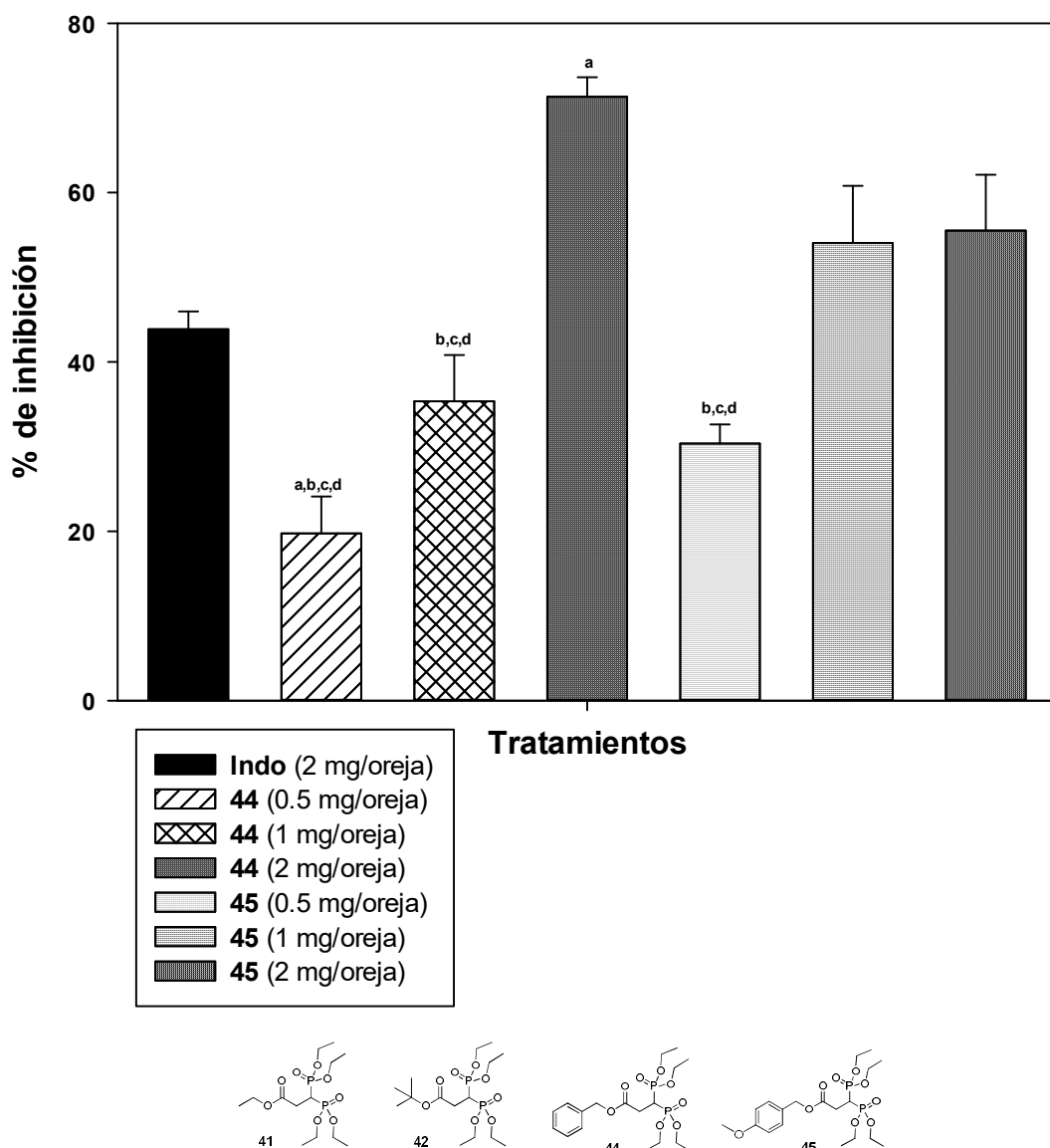


Figura 36. Porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria aguda tópica de los compuestos **44** y **45** en el modelo de TPA en ratones hembra Balb/C. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo. ^avs. Indometacina. ^bvs. **44** (2 mg/oreja). ^cvs. **45** (1 mg/oreja). ^dvs. **45** (2 mg/oreja).

Para el caso del compuesto **45**, también hubo un comportamiento dosis-dependiente, sin embargo, a 2 mg/oreja el porcentaje de inhibición antiinflamatorio no varió significativamente (Figura 36). Probablemente a 1 mg/oreja se alcanza el mayor efecto y para concentraciones más elevadas los receptores del compuesto se encuentren saturados y por ende, el efecto se mantiene y ya no aumenta. Por el comportamiento observado, una ecuación cuadrática se ajusta muy bien a las concentraciones analizadas. Por interpolación se determinó que la DE₅₀ para **45** fue de 0.9 mg/oreja ($Y=-30.631x^2+93.348x-8.6627$, $R^2=1$).

Entonces, para alcanzar un porcentaje de inhibición del 50% del proceso inflamatorio, el compuesto **45** fue más potente debido a que se necesita una dosis de 0.9 mg/oreja, mientras que del compuesto **44** se necesitan 1.4 mg/ oreja. Respecto a la eficacia, el compuesto **44** presentó el mayor efecto antiinflamatorio (77%) a la dosis de 2 mg/oreja.

8.4. Determinación de la toxicidad aguda de los bisfosfonatos 41-42 y 44-45.

Este estudio se realizó en ratones hembra, utilizando concentraciones de 50 y 100 mg/kg para cada compuesto. Los tratamientos **41-42** y **44-45** fueron administrados por vía intragástrica utilizando como vehículo una solución de tween80:agua (1:9). A estas dosis, no se observó letalidad dentro de las primeras 24 horas y hasta el día 14. Respecto a la ganancia de peso, a dosis de 50 y 100 mg/kg, los compuestos **44** y **45**, así como el grupo control, tuvieron una ligera pérdida de peso dentro de los primeros 5 días, sin embargo, posterior a esto, se detectó un incremento constante en la ganancia de peso (Figura 37 y Tabla 12).

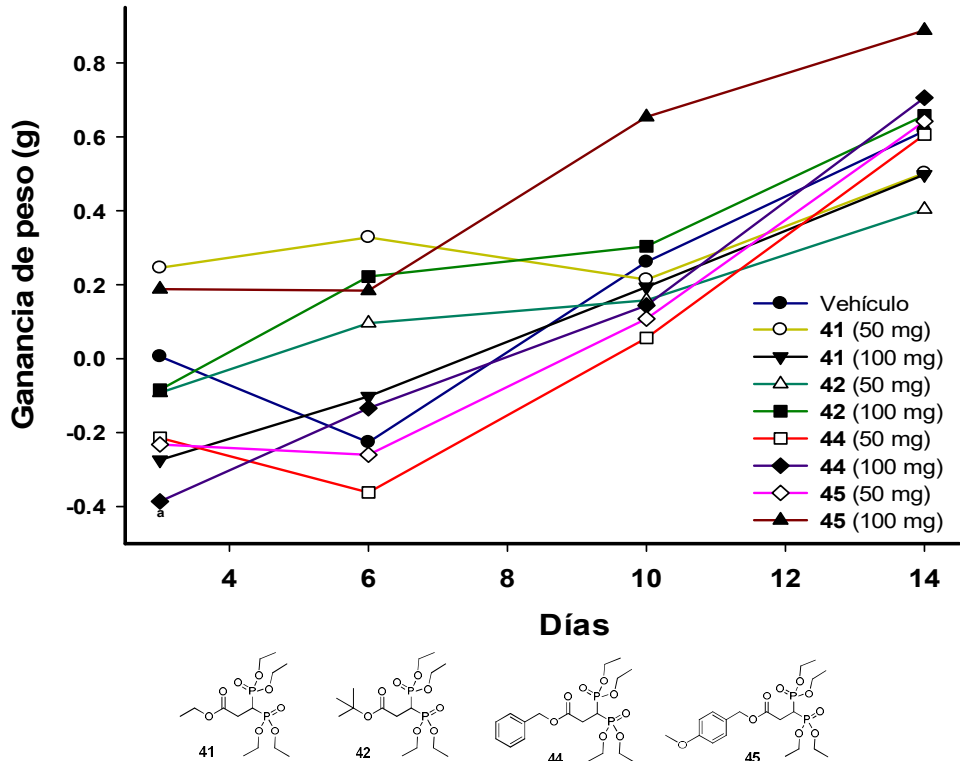


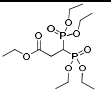
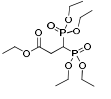
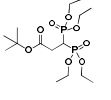
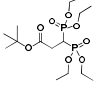
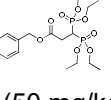
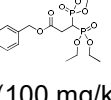
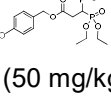
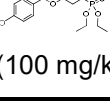
Figura 37. Ganancia de peso de ratones hembra Balb/C en la evaluación de toxicidad aguda de los compuestos **41-42** y **44-45** durante un periodo de 14 días. Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo. Tratamientos: ^avs Vehículo;

La pérdida significativa de peso corporal puede ser uno de los indicadores más sensibles de que la condición de un animal se está deteriorando. Este signo clínico de toxicidad puede ser indicativo de que un animal está experimentando dolor y/o angustia, enfermedades debilitantes (cáncer, enfermedad renal crónica, etc.), o incapacidad para comer (crecimiento excesivo de los incisivos, por ejemplo). Se consideran anomalías cuando el peso corporal del animal ha disminuido en más del 20% en comparación con los animales de control, o el peso corporal del mismo ratón ha disminuido en más del 25% durante un período de 7 días o más^{78,84,85}.

Otro dato importante que sirve como punto de comparación, es conocer la DL_{50} del fármaco de referencia utilizado en este trabajo. La DL_{50} reportada para indometacina (basada en la respuesta de mortalidad a los 14 días) es de 50 mg/kg⁸⁶. Por lo anterior, se asume que a estas dosis no se observan anomalías en la ganancia de peso y los tratamientos (bisfosfonatos **41** y **42**) son seguros a dosis

iguales o menores a 100 mg/kg, superior a la DL₅₀ de indometacina, además de que a estas dosis se tuvieron importante actividad antiinflamatoria.

Tabla 12. Efecto de los compuestos **41-42** y **44-45** sobre la ganancia de peso corporal (g) con una dosis única administrada vía i.g. en ratones hembra Balb/C.









Tratamientos	Días				Muertes
	3	7	9	14	
Vehículo	0.006 ± 0.15	0.034 ± 0.17	0.262 ± 0.35	0.616 ± 0.27	0/5
 41 (50 mg/kg)	0.246 ± 0.11	0.248 ± 0.08	0.214 ± 0.06	0.502 ± 0.15	0/5
 41 (100 mg/kg)	-0.274 ± 0.10	0.044 ± 0.03	0.194 ± 0.21	0.498 ± 0.22 ^b	0/5
 42 (50 mg/kg)	-0.092 ± 0.11	0.09 ± 0.08	0.158 ± 0.09	0.404 ± 0.17 ^b	0/5
 42 (100 mg/kg)	-0.084 ± 0.08	0.252 ± 0.17	0.304 ± 0.17	0.658 ± 0.18 ^b	0/5
 44 (50 mg/kg)	-0.214 ± 0.12	0.044 ± 0.11	0.056 ± 0.04	0.606 ± 0.10 ^{b,c,d}	0/5
 44 (100 mg/kg)	-0.386 ± 0.05 ^a	0.028 ± 0.11	0.144 ± 0.15	0.706 ± 0.18 ^{b,c,d}	0/5
 45 (50 mg/kg)	-0.232 ± 0.08	0.02 ± 0.05	0.108 ± 0.09	0.642 ± 0.13 ^{b,c,d}	0/5
 45 (100 mg/kg)	0.188 ± 0.62	0.376 ± 0.67	0.654 ± 0.55	0.888 ± 0.62	0/5

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); n=5 para cada grupo. Tratamientos: ^avs Vehículo; ^bvs día 3; ^cvs día 7; ^dvs día 9.

Una extracción y comparación en el peso de órganos como hígado, bazo y riñón también fue realizada. Como se mencionó anteriormente, estos órganos juegan un papel importante en el metabolismo de fármaco, por lo cual, anomalías en su peso se asocian a indicios de toxicidad⁸⁵.

En la Tabla 13, se puede observar que el peso de los órganos no tuvo cambios significativos entre los tratamientos.

Tabla 13. Efecto de los compuestos **41-42** y **44-45** sobre el peso de los órganos (g) con una dosis única administrada vía i.g. en ratones hembra Balb/C.

Tratamientos	Peso de los órganos (g)		
	Hígado	Bazo	Riñón
Vehículo	1.219±0.040	0.1732±0.002	0.2930±0.005
 41 (50 mg/kg)	1.2452±0.080	0.2336±0.010 ^a	0.2983±0.010
 41 (100 mg/kg)	1.1021±0.080	0.1804±0.010	0.2750±0.010
 42 (50 mg/kg)	1.0976±0.050	0.2089±0.007	0.3131±0.010
 42 (100 mg/kg)	1.2388±0.040	0.1991±0.007	0.3141±0.010
 44 (50 mg/kg)	1.0504±0.040 ^a	0.2026±0.010	0.2809±0.390
 44 (100 mg/kg)	1.1283±0.040	0.1724±0.010	0.2938±0.390
 45 (50 mg/kg)	1.1256±0.030	0.2516±0.010 ^a	0.3230±0.007 ^a
 45 (100 mg/kg)	1.1822±0.060	0.2081±0.008	0.3271±0.010 ^a

Los datos son presentados como la media ± error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo. Tratamientos: ^avs Vehículo.

En el hígado, las diferencias significativas *versus* el grupo control se observaron para el compuesto **44** a dosis de 50 mg/kg, mientras que para el bazo las discrepancias se observaron con el compuesto **41** (50 mg/kg) y **45** (50 mg/kg). En el caso del riñón, este órgano no presentó diferencias significativas *versus* el grupo control.

Al igual que el peso corporal, se considera un signo de toxicidad cuando existe una diferencia del 20% en el peso de cada órgano con respecto al grupo control, esto debido a que se ha demostrado que existe una correlación entre los órganos y peso corporal^{84,85}. No obstante, a pesar de que existen algunas diferencias entre los compuestos **44** (50 mg/kg), **41** (50 mg/kg) y **45** (50 mg/kg) *versus* el grupo control, no existieron pérdidas de peso superior al 20%, demostrando la seguridad de estos compuestos en un estudio de toxicidad aguda de 14 días. Probablemente, las pequeñas variaciones en algunos pesos de los órganos evaluados pueden estar asociados a un desarrollo y crecimiento específico para cada individuo evaluado.

9. CONCLUSIONES

Se sintetizaron los cuatro compuestos seleccionados, **41-42** y **44-45**, con rendimientos del 44 al 73%. El análisis por espectrometría IR, HRMS y RMN confirmaron la estructura de los bisfosfonatos propuestos **41-42** y **44-45**.

De acuerdo con una revisión bibliográfica exhaustiva, los compuestos **41-42** y **44-45** se evaluaron como antiinflamatorios por primera vez, además de que los bisfosfonatos **44-45** fueron inéditos.

Respecto a la evaluación biológica, para el modelo de carragenina los bisfosfonatos más activos fueron el derivado de etilo y *ter*-butilo **41** y **42**, respectivamente. El compuesto más potente fue el derivado de *ter*-butilo **42** con una $DE_{50}=65.7$ mg/kg, mientras que el derivado de etilo **41** tuvo una $DE_{50}=98.95$ mg/kg.

En el modelo de TPA, el derivado de bencilo y 4-metoxibencilo **44** y **45**, respectivamente, fueron los bisfosfonatos más activos. El compuesto **45** fue más potente con una $DE_{50}=0.9$ mg/oreja, mientras que el compuesto **44** tuvo una $DE_{50}=1.4$ mg/ oreja. Respecto a la eficacia, el compuesto 44 presentó el mayor efecto antiinflamatorio (77%) a la dosis de 2 mg/oreja.

Finalmente, el estudio de toxicidad aguda realizado en un periodo de 14 días mostró que a dosis de 50 y 100 mg/kg, los compuestos **41-42** y **44-45** no generan letalidad, resaltando además que superan la DL_{50} de indometacina y a estas dosis mantuvieron importante actividad antiinflamatoria.

10. REFERENCIAS

- (1) Ahmed, A. U. An Overview of Inflammation: Mechanism and Consequences. *Front. Biol. China* **2011**, 6 (4), 274–281.
- (2) Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. *Inmunología Básica: Funciones y Trastornos Del Sistema Inmunitario*, Elsevier.; 2014.
- (3) Newton, K.; Dixit, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, 4 (3), 1–18.
- (4) Ashley, N. T.; Weil, Z. M.; Nelson, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2012**, 43 (1), 385–406.
- (5) Tanwar, A.; Chawla, R.; Ansari, M. M.; Neha; Thakur, P.; Chakotiya, A. S.; Goel, R.; Ojha, H.; Asif, M.; Basu, M.; et al. In Vivo Anti-Arthritic Efficacy of *Camellia Sinensis* (L.) in Collagen Induced Arthritis Model. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, 87 (1), 92–101.
- (6) Nocton, J.; Co, D. Arthritis. In *Nelson Pediatric Symptom-Based Diagnosis*; 2018; pp 594–613.
- (7) Robinson, D. E.; Dennison, E. M.; Cooper, C.; van Staa, T. P.; Dixon, W. G. A Review of the Methods Used to Define Glucocorticoid Exposure and Risk Attribution When Investigating the Risk of Fracture in a Rheumatoid Arthritis Population. *Bone* **2016**, 90 (1), 107–115.
- (8) Sherwood, E. R.; Toliver-Kinsky, T. Mechanisms of the Inflammatory Response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2004**, 18 (3), 385–405.
- (9) Papayannopoulos, V. Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, 18 (2), 134–147.
- (10) Francescone, R.; Hou, V.; Grivennikov, S. I. Microbiome , Inflammation , and Cancer. **2014**, 20 (3), 181–189.
- (11) Kundu, J. K.; Surh, Y. J. Inflammation: Gearing the Journey to Cancer. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **2008**, 659 (1–2), 15–30.
- (12) Ellulu, M. S.; Patimah, I.; Khaza, H.; Rahmat, A.; Abed, Y.; Sci, A. M. Obesity and Inflammation : The Linking Mechanism and the Complications. *Arch. Med. Sci.* **2016**, 851–863.
- (13) Del-Ángel, M.; Nieto, A.; Ramírez-Apan, T.; Delgado, G. Anti-Inflammatory Effect of Natural and Semi-Synthetic Phthalides. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, 752, 40–48.
- (14) Shaked, H.; Hofseth, L. J.; Chumanevich, A.; Chumanevich, A. A.; Wang, J.; Wang, Y. Chronic Epithelial NF- κ B Activation Accelerates APC Loss and Intestinal Tumor Initiation through INOS up-Regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109 (35), 14007–14012.
- (15) Grivennikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M. Immunity, Inflammation, and

Cancer. *Cell* **2010**, *140* (6), 883–899.

- (16) Taniguchi, K.; Wu, L. W.; Grivennikov, S. I.; De Jong, P. R.; Lian, I.; Yu, F. X.; Wang, K.; Ho, S. B.; Boland, B. S.; Chang, J. T.; et al. A Gp130-Src-YAP Module Links Inflammation to Epithelial Regeneration. *Nature* **2015**, *519* (7541), 57–62.
- (17) Shalpour, S.; Karin, M.; Shalpour, S.; Karin, M. Immunity , Inflammation , and Cancer : An Eternal Fight between Good and Evil Find the Latest Version : Immunity , Inflammation , and Cancer : An Eternal Fight between Good and Evil. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125* (9), 3347–3355.
- (18) Miranda-Garduño, L. M.; Reza-Albarrán, A. Obesidad, Inflamación y Diabetes. *Gac. médica México*, **2008**, *144* (1), 39–46.
- (19) Cinti, S.; Mitchell, G.; Barbatelli, G.; Murano, I.; Ceresi, E.; Faloia, E.; Wang, S.; Fortier, M.; Greenberg, A. S.; Obin, M. S. Adipocyte Death Defines Macrophage Localization and Function in Adipose Tissue of Obese Mice and Humans. *J. Lipid Res.* **2005**, *46* (11), 2347–2355.
- (20) Ayoub, S. S.; Flower, R. J. Loss of Hypothermic and Anti-Pyretic Action of Paracetamol in Cyclooxygenase-1 Knockout Mice Is Indicative of Inhibition of Cyclooxygenase-1 Variant Enzymes. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *861* (March), 172609. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172609>.
- (21) Cheng, D. S.; Visco, C. J. Pharmaceutical Therapy for Osteoarthritis. *PM&R* **2012**, *4* (5), S82–S88.
- (22) Laev, S. S.; Salakhutdinov, N. F. Anti-Arthritic Agents: Progress and Potential. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23* (13), 3059–3080.
- (23) Wermuth, C. G. *THE PRACTICE OF MEDICINAL CHEMISTRY*; 2011.
- (24) Hameed, F.; Ihm, J. Injectable Medications for Osteoarthritis. *PM&R* **2012**, *4* (5), S75–S81.
- (25) Furue, K.; Ito, T.; Furue, M. Differential Efficacy of Biologic Treatments Targeting the TNF- α /IL-23/IL-17 Axis in Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Cytokine* **2018**, *111* (July), 182–188.
- (26) Zampeli, E.; Vlachoyiannopoulos, P. G.; Tzioufas, A. G. Treatment of Rheumatoid Arthritis: Unraveling the Conundrum. *J. Autoimmun.* **2015**, *65*, 1–18.
- (27) <http://compras.imss.gob.mx/>.
- (28) Machado, N.P., Téllez, G.A. , Castaño, J. . Anticuerpos Monoclonales: Desarrollo Físico y Perspectivas Terapéuticas Monoclonal. *Infectio* **2006**, *10* (3), 186–197.
- (29) Gupta, M.; Sharma, R.; Kumar, A. Docking Techniques in Pharmacology: How Much Promising? *Comput. Biol. Chem.* **2018**, *76* (1), 210–217.

- (30) Filimonov, D. A.; Lagunin, A. A.; Glorizova, T. A.; Rudik, A. V.; Druzhilovskii, D. S.; Pogodin, P. V.; Poroikov, V. V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2014**, *50* (3), 444–457.
- (31) Filimonov, D.; Poroikov, V. Chapter 6. Probabilistic Approaches in Activity Prediction. *Chemoinformatics Approaches to Virtual Screen.* **2009**, 182–216.
- (32) Filimonov, D.; Poroikov, V.; Borodina, Y.; Glorizova, T. Chemical Similarity Assessment through Multilevel Neighborhoods of Atoms: Definition and Comparison with the Other Descriptors. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, *39* (4), 666–670.
- (33) Druzhilovskiy, D. S.; Rudik, A. V.; Filimonov, D. A.; Lagunin, A. A.; Glorizova, T. A.; Poroikov, V. V. Online Resources for the Prediction of Biological Activity of Organic Compounds. *Russian Chemical Bulletin.* 2016, pp 384–393.
- (34) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1–3), 3–25.
- (35) Leeson, P. Drug Discovery: Chemical Beauty Contest. *Nature.* 2012, pp 455–456.
- (36) McInnes, I. B.; Leung, B. P.; Harnett, M.; Gracie, J. A.; Liew, F. Y.; Harnett, W. A Novel Therapeutic Approach Targeting Articular Inflammation Using the Filarial Nematode-Derived Phosphorylcholine-Containing Glycoprotein ES-62. *J. Immunol.* **2003**, *171* (4), 2127–2133.
- (37) Pineda, M. A.; McGrath, M. A.; Smith, P. C.; Al-Riyami, L.; Rzepecka, J.; Gracie, J. A.; Harnett, W.; Harnett, M. M. The Parasitic Helminth Product ES-62 Suppresses Pathogenesis in Collagen-Induced Arthritis by Targeting the Interleukin-17-Producing Cellular Network at Multiple Sites. *Arthritis Rheum.* **2012**, *64* (10), 3168–3178.
- (38) Wang, Q. M.; Wang, H.; Li, Y. F.; Xie, Z. Y.; Ma, Y.; Yan, J. J.; Gao, Y. F. W.; Wang, Z. M.; Wang, L. S. Inhibition of EMMPRIN and MMP-9 Expression by Epigallocatechin-3-Gallate through 67-KDa Laminin Receptor in PMA-Induced Macrophages. *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *39* (6), 2308–2319.
- (39) Mizushima, Y.; Kobayashi, M. Interaction of Anti-inflammatory Drugs with Serum Proteins, Especially with Some Biologically Active Proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* **1968**, *20* (3), 169–173.
- (40) Damiche, R.; Chafaa, S. Synthesis of New Bioactive Aminophosphonates and Study of Their Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antibacterial Activities as Well the Assessment of Their Toxicological Activity. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1130*, 1009–1017.
- (41) Kim, H.; Zamel, R.; Bai, X. H.; Liu, M. PKC Activation Induces Inflammatory

Response and Cell Death in Human Bronchial Epithelial Cells. *PLoS One* **2013**, *8* (5), 1–12.

- (42) Gupta, A. K.; Fisher, G. J.; Elder, J. T.; Nickoloff, B. J.; Voorhees, J. J. Sphingosine Inhibits Phorbol Ester-Induced Inflammation, Ornithine Decarboxylase Activity, and Activation of Protein Kinase C in Mouse Skin. *J. Invest. Dermatol.* **1988**, *91* (5), 486–491.
- (43) De Young, L. M.; Kheifets, J. B.; Ballaron, S. J.; Young, J. M. Edema and Cell Infiltration in the Phorbol Ester-Treated Mouse Ear Are Temporally Separate and Can Be Differentially Modulated by Pharmacologic Agents. *Agents Actions* **1989**, *26* (3–4), 335–341.
- (44) Borthakur, A.; Bhattacharyya, S.; Anbazhagan, A. N.; Kumar, A.; Dudeja, P. K.; Tobacman, J. K. Prolongation of Carrageenan-Induced Inflammation in Human Colonic Epithelial Cells by Activation of an NFκB-BCL10 Loop. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822* (8), 1300–1307.
- (45) Ramírez-Marroquín, O. A.; Jiménez-Arellanes, M. A.; Cortés-Pacheco, A.; Zambrano-Vásquez, O. R.; López-Torres, A. Synthesis and in Vivo Anti - or pro - Inflammatory Activity of New Bisphosphonates and Vinylphosphonates. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **2019**, *150* (2), 267–274.
- (46) Necas, J.; Bartosikova, L. Carrageenan: A Review. *Vet. Med. (Praha)*. **2013**, *58* (4), 187–205.
- (47) Posadas, I.; Bucci, M.; Roviezzo, F.; Rossi, A.; Parente, L.; Sautebin, L.; Cirino, G. Carrageenan-Induced Mouse Paw Oedema Is Biphasic, Age-Weight Dependent and Displays Differential Nitric Oxide Cyclooxygenase-2 Expression. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142* (2), 331–338.
- (48) Lucetti, D. L.; Lucetti, E. C. P.; Bandeira, M. A. M.; Veras, H. N. H.; Silva, A. H.; Leal, L. K. A. M.; Lopes, A. A.; Alves, V. C. C.; Silva, G. S.; Brito, G. A.; et al. Anti-Inflammatory Effects and Possible Mechanism of Action of Lupeol Acetate Isolated from *Himatanthus Drasticus* (Mart.) Plumel. *J. Inflamm.* **2010**, *7* (1), 60.
- (49) Chassaing, B.; Aitken, J. D.; Malleshappa, M.; Vijay-Kumar, M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr. Protoc. Immunol.* **2014**, *104* (1), 15-25.
- (50) Brand, D. D.; Latham, K. A.; Rosloniec, E. F. Collagen-Induced Arthritis. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (5), 1269–1275.
- (51) Razonable, R. R.; Henault, M.; Watson, H. L.; Paya, C. V. Nystatin Induces Secretion of Interleukin (IL)-1β, IL-8, and Tumor Necrosis Factor Alpha by a Toll-like Receptor-Dependent Mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (8), 3546–3549.
- (52) Woisky, R. G.; Wiesel, G.; Rodrigues, M.; Sertie, J. A. A. Pharmacological Assay of *Cordia Verbenacea* V : Oral and Topical Anti-Inflammatory Activity ,

Analgesic Effect and Fetus Toxicity of a Crude Leaf Extract. *Phytomedicine* **2005**, *12* (5), 338–344.

- (53) Carlson, R. P.; Jacobson, P. B. Comparison of Adjuvant and Streptococcal Cell Wall-Induced Arthritis in the Rat. *Vivo Model. Inflamm.* **1999**, 1–50. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7775-6_1.
- (54) Galezowska, J.; Gumienna-Kontecka, E. Phosphonates, Their Complexes and Bio-Applications: A Spectrum of Surprising Diversity. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (1–2), 105–124.
- (55) Chmielewska, E.; Kafarski, P. Synthetic Procedures Leading towards Aminobisphosphonates. *Molecules* **2016**, *21* (11).
- (56) Barbosa, J. S.; Braga, S. S.; Almeida Paz, F. A. Empowering the Medicinal Applications of Bisphosphonates by Unveiling Their Synthesis Details. *Molecules* **2020**, *25* (12), 1–25.
- (57) Yanvarev, D. V.; Korovina, A. N.; Usanov, N. N.; Khomich, O. A.; Vepsäläinen, J.; Puljula, E.; Kukhanova, M. K.; Kochetkov, S. N. Data on Synthesis of Methylene Bisphosphonates and Screening of Their Inhibitory Activity towards HIV Reverse Transcriptase. *Data Br.* **2016**, *8*, 1157–1167. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.07.039>.
- (58) Bhushan, K. R.; Tanaka, E.; Frangioni, J. V. Synthesis of Conjugatable Bisphosphonates for Molecular Imaging of Large Animals. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (42), 7969–7971.
- (59) Horsman, G. P.; Zechel, D. L. Phosphonate Biochemistry. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (8), 5704–5783.
- (60) Ju, K.-S.; Gao, J.; Doroghazi, J. R.; Wang, K.-K. A.; Thibodeaux, C. J.; Li, S.; Metzger, E.; Fudala, J.; Su, J.; Zhang, J. K.; et al. Discovery of Phosphonic Acid Natural Products by Mining the Genomes of 10,000 Actinomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (39), 12175–12180.
- (61) Frediani, B.; Bertoldi, I. Clodronate: New Directions of Use. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2015**, *12* (2), 97–108.
- (62) Varenna, M.; Adami, S.; Rossini, M.; Gatti, D.; Idolazzi, L.; Zucchi, F.; Malavolta, N.; Sinigaglia, L. Treatment of Complex Regional Pain Syndrome Type I with Neridronate: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Rheumatol. (United Kingdom)* **2013**, *52* (3), 534–542.
- (63) Maksymowych, W. P.; Jhangri, G. S.; Fitzgerald, A. A.; LeClercq, S.; Chiu, P.; Yan, A.; Skeith, K. J.; Aaron, S. L.; Homik, J.; Davis, P.; et al. A Six-Month Randomized, Controlled, Double-Blind, Dose-Response Comparison of Intravenous Pamidronate (60 Mg versus 10 Mg) in the Treatment of Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Refractory Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheum.* **2002**, *46* (3), 766–773.
- (64) Langdon, S. R.; Ertl, P.; Brown, N. Bioisosteric Replacement and Scaffold

- Hopping in Lead Generation and Optimization. *Mol. Inform.* **2010**, *29* (5), 366–385.
- (65) Németh, G.; Greff, Z.; Sipos, A.; Varga, Z.; Székely, R.; Sebestyén, M.; Jászay, Z.; Béni, S.; Nemes, Z.; Pirat, J. L.; et al. Synthesis and Evaluation of Phosphorus Containing, Specific CDK9/CycT1 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (10), 3939–3965.
- (66) Al-Quntar, A. A. A.; Srebnik, M. Reactions of 1-Alkynylphosphonates with Group (IV) Complexes. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690* (10), 2504–2514.
- (67) Quntar, A. A. A. Al; Gallily, R.; Katzavian, G.; Srebnik, M. Potent Anti-Inflammatory Activity of 3-Aminovinylphosphonates as Inhibitors of Reactive Oxygen Intermediates, Nitric Oxides Generation, and Tumor Necrosis Factor-Alpha Release. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *556* (1), 9–13.
- (68) Tauro, M.; Laghezza, A.; Loiodice, F.; Agamennone, M.; Campestre, C.; Tortorella, P. Arylamino Methylene Bisphosphonate Derivatives as Bone Seeking Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (21), 6456–6465.
- (69) Kamel, A. A.; Geronikaki, A.; Abdou, W. M. Inhibitory Effect of Novel S,N-Bisphosphonates on Some Carcinoma Cell Lines, Osteoarthritis, and Chronic Inflammation. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *51*, 239–249.
- (70) Abdou, W. M.; Khidre, R. E.; Shaddy, A. A. Synthesis of Tetrazoloquinoline-Based Mono- and Bisphosphonate Esters as Potent Anti-Inflammatory Agents. *Der Pharma Chem.* **2015**, *7* (2), 39–42.
- (71) PASS Online <http://www.way2drug.com/passonline>. (accessed May 10, 2019).
- (72) Bratislava, S. R. Molinspiration Cheminformatics <http://www.molinspiration.com/services/properties.html>. [Accessed (accessed May 10, 2019).
- (73) GUSAR Online <http://www.way2drug.com/gusar/acutoxpredict.html> (accessed May 10, 2019).
- (74) ADVERPred <https://www.way2drug.com/adverpred>. (accessed May 10, 2019).
- (75) MetaTox <https://www.way2drug.com/mg1/> (accessed May 10, 2019).
- (76) *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Revisado y Publicado El 08-08-2011, Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio.*
- (77) Pérez-González, M. Z.; Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Yépez-Mulia, L.; Rojas-Tomé, I. S.; Luna-Herrera, J.; Jiménez-Arellanes, M. A. Antiprotozoal, Antimycobacterial, and Anti-Inflammatory Evaluation of *Cnidocolus Chayamansa* (Mc Vaugh) Extract and the Isolated Compounds. *Biomed.*

Pharmacother. **2017**, 89 (1), 89–97.

- (78) OECD. *Guidelines for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity. Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Co-Operation and Development. Guide No. 423. (2008). [Revised Draft Guideline December 2001]. (Http://Www. Oecd.Org). [Accessed 29.11.18].*
- (79) (AIST)., N. I. of A. I. S. and T. Spectral database for organic compounds SDBS. Japan: AIST. http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi. (accessed May 10, 2019).
- (80) Klein, S. L.; Flanagan, K. L. Sex Differences in Immune Responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, 16 (10), 626–638.
- (81) Roved, J.; Westerdahl, H.; Hasselquist, D. Sex Differences in Immune Responses: Hormonal Effects, Antagonistic Selection, and Evolutionary Consequences. *Horm. Behav.* **2017**, 88, 95–105.
- (82) Ahnstedt, H.; McCullough, L. D. The Impact of Sex and Age on T Cell Immunity and Ischemic Stroke Outcomes. *Cell. Immunol.* **2019**, 103960.
- (83) Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Pérez-González, M. Z.; Zamilpa, A.; Jiménez-Arellanes, M. A. Anti-Inflammatory Evaluation and Acute Toxicity of Three Food Supplements That Contain Moussonia Deppeana. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, 10 (2), 141–147.
- (84) OECD. *Environment Directorate, Joint Meeting of The Chemicals Committee and The Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology.*; 2000.
- (85) Ailey, S. T. A. B.; Idell, R. O. H. Z.; Erry, R. I. W. P. Relationships Between Organ Weight and Body / Brain Weight in the Rat : What Is the Best Analytical Endpoint ? *Toxicol. Pathol.* **2004**, 32 (1), 448–466.
- (86) <https://go.drugbank.com/drugs/DB00328>.

11. ANEXO

11.1. Parte experimental

11.1.1. Información general

Todos los reactivos empleados se adquirieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin ningún tratamiento adicional. Durante las purificaciones por CC se utilizó sílica gel 60® 230-400 mesh. El avance de las reacciones se monitoreó por cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios Merck 60 F₂₅₄, mezclas de disolventes de diferente polaridad como fase móvil y agentes reveladores como UV, yodo, vainillina-H₂SO₄ y *p*-anisaldehído.

El THF manipulado se obtuvo utilizando malla molecular como desecante, bajo atmósfera de nitrógeno partiendo de THF anhidro comercial.

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker 500 MHz y Magritek Spinsolve 80 MHz. Se utilizó CDCl₃ como disolvente deuterado durante los análisis de RMN. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS). La multiplicidad de los sistemas de espín acoplados se denotó de acuerdo con las siguientes abreviaturas: s (señal sencilla), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), m (multiplete) y sus posibles combinaciones. Las constantes de acoplamiento (*J*) se reportan en Hertz.

Los análisis de las muestras por espectrometría de masas se llevaron a cabo por infusión directa utilizando el equipo SYNAPT G2-Si (Waters) equipado con fuente de ionización por electronebulización (ESI), filtro de masas de cuadrupolo sencillo y analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF).

Los parámetros de operación del espectrómetro de masas fueron los siguientes: voltaje de capilar de 3 kV, Voltaje de cono 30 V, temperatura del capilar 120 °C, temperatura de gas de desolvatación 350 °C, flujo de gas de desolvatación 400 L por hora. Para la corrección de masa se infundió continuamente el compuesto Leucina-encefalina con masa en ESI(+) de 556.2771 Da.

La preparación de las muestras para el análisis de masas se realizó primero diluyendo 3 mg del compuesto en 1 mL de metanol (MeOH), para después

centrifugar la disolución a 18000 xg por 10 minutos. Del sobrenadante se tomaron 10 μL , el cual se mezcló con 2 μL de ácido fórmico (HCOOH) al 50% y 1 mL de MeOH .

Los espectros de IR fueron adquiridos en un equipo Dynascan Perkin Elmer Spectrum 100 mediante la técnica FTIR-ATR. El espectro se adquirió con un número de 4 escaneos con resolución de 4 cm^{-1} y una ventana espectral de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Las muestras fueron aplicadas directamente al porta muestras del equipo hasta cubrir la superficie.

11.2. MÉTODOS DE SÍNTESIS.

11.2.1. Síntesis del alcohol 4-metoxibencílico.

A una solución de 4-metoxibenzaldehído (1,23 g) en MeOH (5 ml) a 0°C, se añadió NaBH₄ (1,1 equiv.) y se agitó durante 3 h hasta que la reacción alcanzó la temperatura ambiente. Posteriormente una solución saturada de NH₄Cl fue agregada y el producto de reacción fue extraído con CH₂Cl₂ (3 X 10 mL). Las fases orgánicas fueron combinadas, desecadas sobre Na₂SO₄ y concentradas a presión reducida, obteniéndose el alcohol 4-metoxibencílico (1,22 g, 98%) como un aceite incoloro.

11.2.2. Procedimiento general para la síntesis de los bromocetoésteres 55-58.

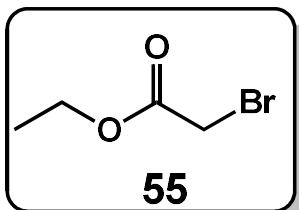
Método A

Una mezcla de etanol o *ter*-butanol (12 equiv) y trietilamina (1.2 equiv) disuelta en CH₂Cl₂ anhidro a 0°C fue mantenida en agitación por 10 minutos, posteriormente el bromuro de bromoacetilo fue agregado a goteo lento y la reacción procedió de 0 a 25°C por 5 horas. Para finalizar la reacción, 5 mL de agua destilada fueron agregados y el producto de reacción fue extraído con CH₂Cl₂ (3 X 10 mL). Las fases orgánicas fueron combinadas, desecadas sobre Na₂SO₄ y concentradas a presión reducida, obteniendo los bromocetoésteres **55-56**

Método B

A una suspensión de bicarbonato de sodio (3 equiv) y alcohol bencílico o alcohol 4-metoxibencílico (1 equiv) se agregó bromuro de bromoacetilo (1.4 equiv) a goteo lento en acetonitrilo anhidro a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 5 horas. Para finalizar la reacción, 5 mL de agua destilada fueron agregados y el producto de reacción fue extraído con CH₂Cl₂ (3 X 10 mL). Las fases orgánicas fueron combinadas, desecadas sobre Na₂SO₄ y concentradas a presión reducida, obteniendo los bromocetoésteres **57-58**.

Bromoacetato de etilo (55).

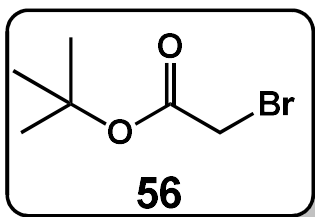


Rendimiento: 0.4 g (42%) como un aceite ligeramente amarillo.

IR (cm⁻¹) = 2983, 1733 (CO₂Et), 1273, 1172, 1110, 1024, 666 (CH₂Br).

RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃): δ = 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.80 (s, 2H, CH₂Br), 4.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂). **RMN ¹³C** (20 MHz, CDCl₃): δ = 14.04 (CH₃), 26.00 (CH₂Br), 62.36 (CH₂O), 167.28 (C=O).

Bromoacetato de terbutilo (56).

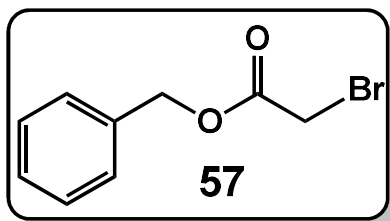


Rendimiento: 0.78 g (71%) como un aceite ligeramente amarillo.

IR (cm⁻¹) = 2983, 1733 (CO₂Et), 1273, 1172, 1110, 1024, 666 (CH₂Br).

RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃): δ = 1.48 (s, 9H, CH₃), 3.75 (s, 2H, CH₂Br). **RMN ¹³C** (20 MHz, CDCl₃): δ = 30.05 (CH₂Br), 30.19 (CH₃), 85.24 (CCH₃), 168.86 (C=O).

Bromoacetato de bencilo (57).

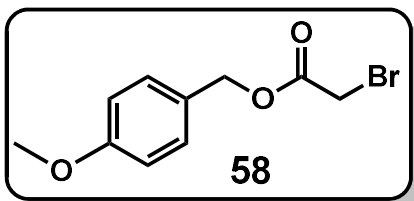


Rendimiento: 0.66 g (71%) como un aceite incoloro.

RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃): δ = 3.72 (s, 2H, CH₂Br), 5.06 (s, 2H, CH₂O), 7.22 (s, 5H, H_{arom}). **RMN ¹³C** (20 MHz, CDCl₃): δ = 25.75 (CH₂Br), 67.87 (CH₂O),

128.33 (C_{arom}), 128.55 (C_{arom}), 128.60 (C_{arom}), 134.93 (C_{arom}), 167.00 (C=O).

Bromoacetato de 4-metoxibencilo (58).



Rendimiento: 0.92 g (91%) como un aceite ligeramente amarillo.

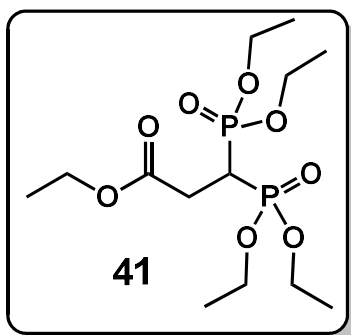
RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃): δ = 3.81 (s, 3H, CH₃O), 3.84 (s, 2H, CH₂Br), 5.14 (s, 2H, CH₂O), 6.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}), 7.32 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{arom}).

RMN ¹³C (20 MHz, CDCl₃): δ = 25.98 (CH₂Br), 55.37 (CH₃O), 67.85 (CH₂O), 114.06 (C_{arom}), 127.12 (C_{arom}), 130.36 (C_{arom}), 159.95 (C_{arom}), 167.12 (C=O).

11.2.3. Procedimiento general para la síntesis de los bisfosfonatos 41-42 y 44-45.

A una disolución de bisfosfonato de tetraetilo en THF (10 ml) a -5°C bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionó gota a gota NaHMDS (1.5 equiv.). La mezcla se mantuvo en agitación por 15 min. Posteriormente se añadió una disolución del haluro de alquilo respectivo **55-58** (2.5 equiv.) en THF, a la solución anterior. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 18 h. Finalmente, el crudo de reacción se concentró y el producto crudo se purificó por CC (AcOEt: MeOH, 95:05), generando así los bisfosfonatos **41-42** y **44-45**.

Síntesis de 3,3-bis (dietoxifosforil) propanoato de etilo (**41**).

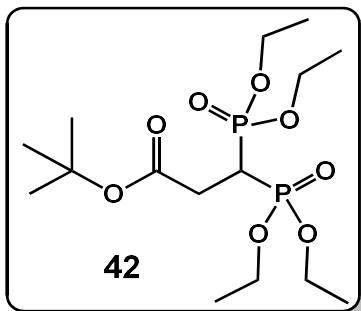


Rendimiento: 0.44 g (73 %) como un aceite ligeramente amarillo.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.33 (t, *J* = 7.1, 12H, CH₃), 2.81 (td, *J* = 15.9, 6.3 Hz, 2H, CH₂C=O), 3.08 (tt, *J* = 23.8, 6.2 Hz, 1H, CHP₂), 4.10 – 4.24 (m, 10H, OCH₂). **RMN ¹³C** (126 MHz, CDCl₃): δ = 14.13 (s, CH₃), 16.27 (d, *J* = 2.9 Hz, CH₃),

16.32 (d, *J* = 2.8 Hz, CH₃), 30.61 (t, *J* = 4.5 Hz, CH₂C=O), 32.82 (t, *J* = 136.0 Hz, CHP₂), 61.22 (s, OCH₂), 62.77 (d, *J* = 6.5 Hz, POCH₂), 62.92 (d, *J* = 6.5 Hz, POCH₂), 170.90 (s, C=O). **RMN ³¹P** (202 MHz, CDCl₃): δ = 22.23. **HRMS** [FAB⁺]: calculado para C₁₃H₂₈O₈P₂ [M+H]⁺, *m/z* 375.1348; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 375.1340.

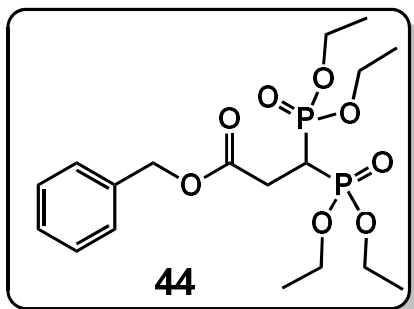
Síntesis de 3,3-bis (dietoxifosforil) propanoato *ter*-butilo (42).



Rendimiento: 0.48 g (44 %) como un aceite ligeramente amarillo.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 (t, *J* = 7.1, 12H, CH₃), 1.46 (s, 9H, CH₃), 2.76 (td, *J* = 16.1, 6.0 Hz, 2H, CH₂C=O), 3.07 (tt, *J* = 23.9, 6.0 Hz, 1H, CHP₂), 4.12 – 4.23 (m, 8H, POCH₂). **RMN ¹³C** (126 MHz, CDCl₃): δ = 16.34 (d, *J* = 6.2 Hz, CH₃), 28.01 (s, CH₃), 31.44 (t, *J* = 4.4 Hz, CH₂C=O), 33.06 (t, *J* = 135.8 Hz, CHP₂), 62.70 (d, *J* = 6.5 Hz, POCH₂), 62.84 (d, *J* = 6.5 Hz, POCH₂), 81.31 (s, CCH₃), 169.85 (s, C=O). **RMN ³¹P** (202 MHz, CDCl₃): δ = 22.74. **HRMS** [FAB⁺]: calculado para C₁₅H₃₂O₈P₂ [M+H]⁺, *m/z* 403.1651; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 403.1650.

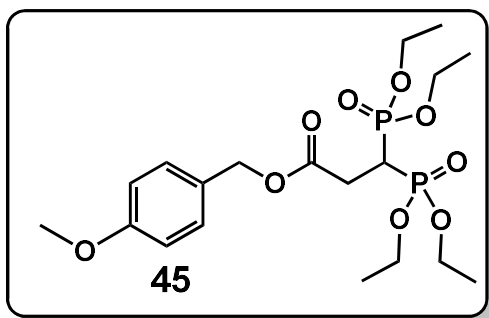
Síntesis de 3,3-bis (dietoxifosforil) propanoato de bencilo (44).



Rendimiento: 0.56 g (65 %) como un aceite ligeramente amarillo.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 12H, CH₃), 2.91 (td, *J* = 15.8, 6.3 Hz, 2H, CH₂C=O), 3.13 (tt, *J* = 23.7, 6.3 Hz, 1H, CHP₂), 4.10-4.25 (m, 8H, POCH₂), 5.17 (s, 2H, CH₂Ph), 7.33-7.41 (m, 5H, H_{arom}). **RMN ¹³C** (126 MHz, CDCl₃): δ = 16.32 (d, *J* = 6.3 Hz, CH₃), 16.29 (d, *J* = 6.2 Hz, CH₃), 30.67 (t, *J* = 4.5 Hz, CH₂C=O), 32.87 (t, *J* = 136.0 Hz, CHP₂), 62.82 (d, *J* = 6.6 Hz, POCH₂), 62.96 (d, *J* = 6.5 Hz, POCH₂), 67.03 (s, CH₂Ph), 128.34 (s, C_{arom}), 128.36 (s, C_{arom}), 128.56 (s, C_{arom}), 135.56 (s, C_{arom}), 170.76 (s, C=O). **RMN ³¹P** (202 MHz, CDCl₃): δ = 22.08. **HRMS** [FAB⁺]: calculado para C₁₈H₃₀O₈P₂ [M+H]⁺, *m/z* 437.1494; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 437.1505.

Síntesis de 3,3-bis(dietoxifosforil) propanoato de 4-metoxibencilo (45).

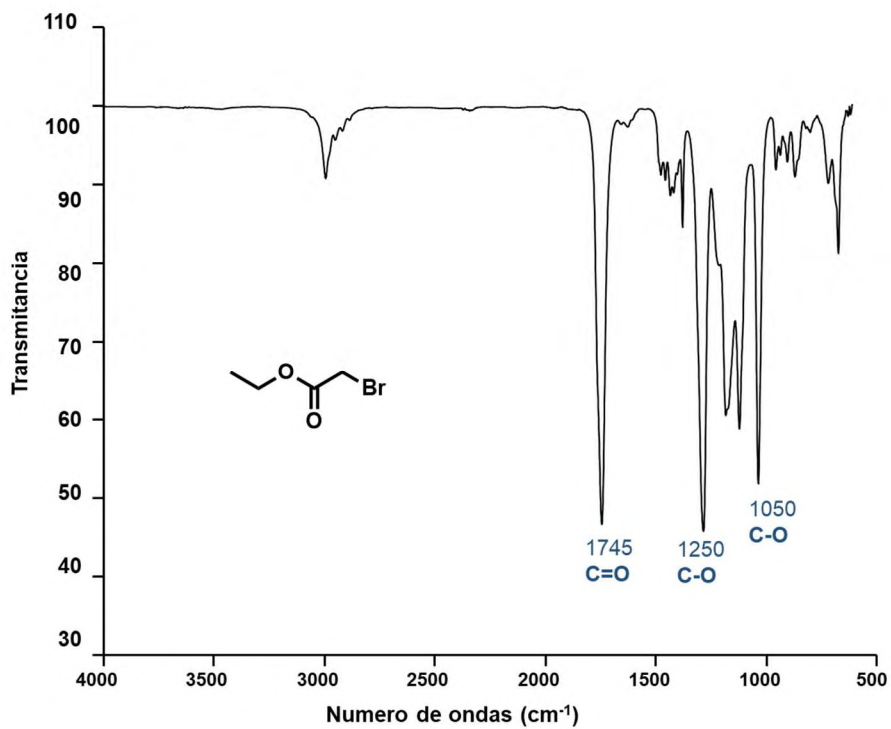


Rendimiento: 0.366 g (41 %) como un aceite ligeramente amarillo.

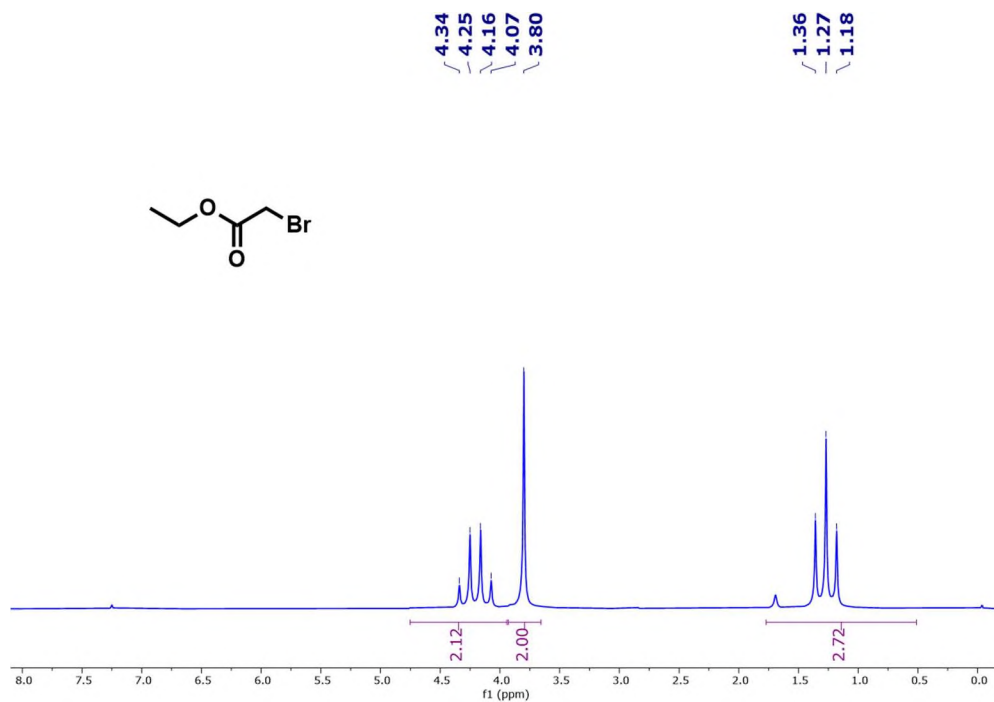
RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃): δ = 1.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 12H, CH₃), 2.62-3.47 (m, 3H, CHP₂; CH₂C=O), 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.50 – 3.89 (m, 8H, POCH₂), 5.12 (s, 2H, CH₂Ph), 6.91 (d, *J* =

8.6 Hz, 1H, H_{arom}), 7.34 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H_{arom}). **RMN ¹³C** (20 MHz, CDCl₃): δ = 16.38 (d, *J* = 6.2 Hz, CH₃), 30.76 (t, *J* = 4.4 Hz, CH₂C=O), 32.95 (t, *J* = 135.9 Hz, CHP₂), 55.35 (s, CH₃O), 63.00 (d, *J* = 6.6 Hz, POCH₂), 62.86 (d, *J* = 6.6 Hz, POCH₂), 66.93 (s, CH₂Ph), 114.01 (s, C_{arom}), 127.78 (s, C_{arom}), 130.26 (s, C_{arom}), 159.83 (s, C_{arom}), 170.85 (s, C=O). **HRMS** [FAB⁺]: calculado para C₁₉H₃₂O₉P₂ [M+H]⁺, *m/z* 467.1600; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 467.1652.

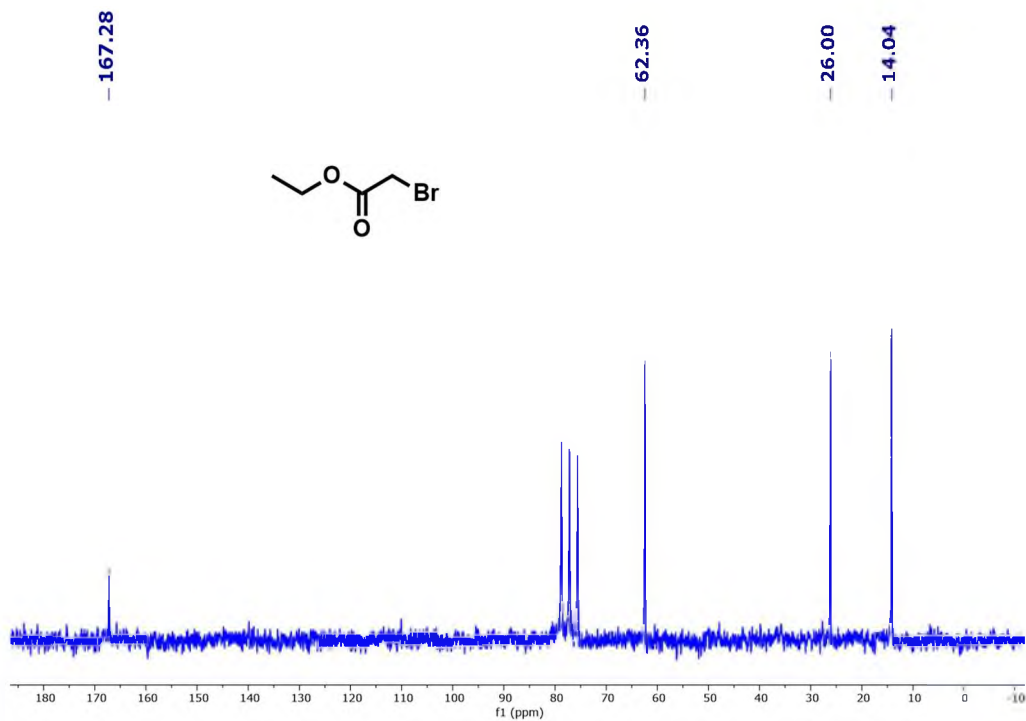
11.3. ESPECTROS.



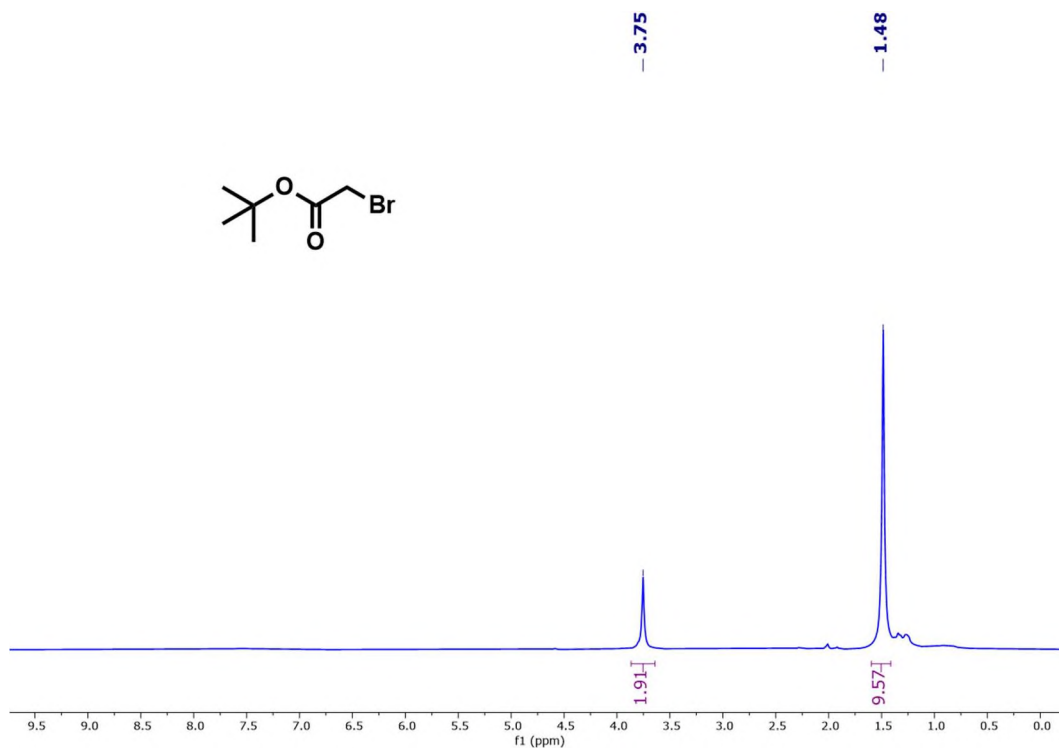
Espectro IR de 55.



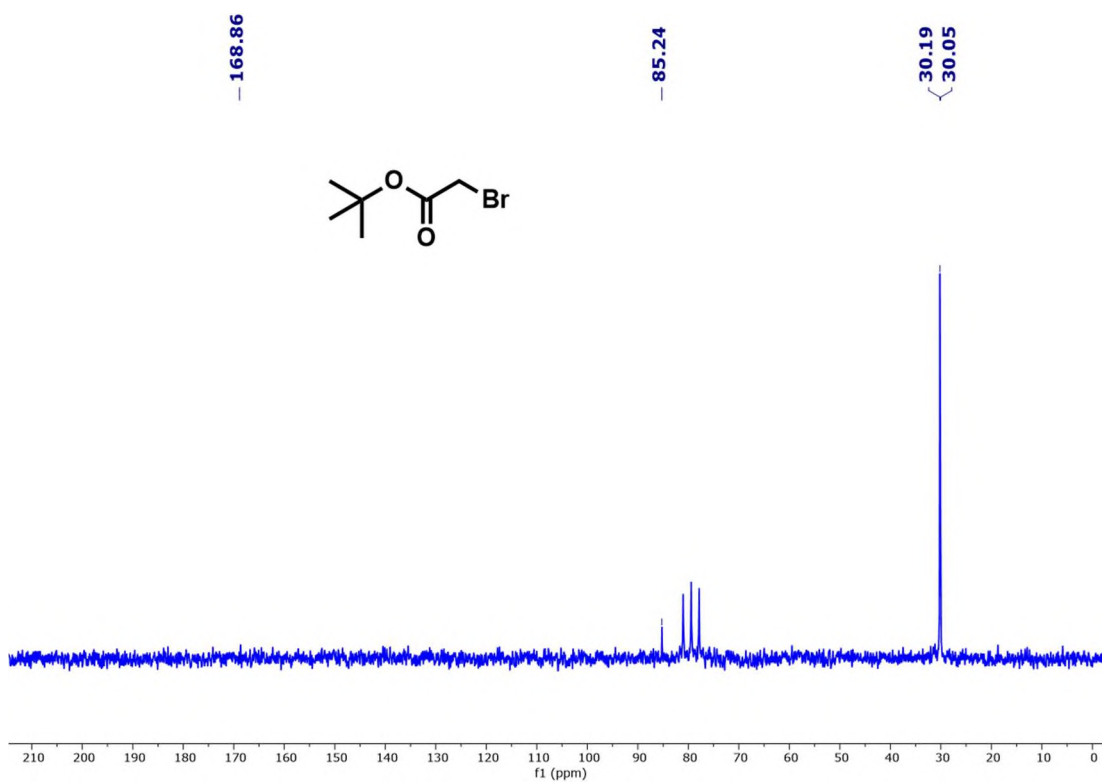
Espectro RMN de ¹H (80 MHz, CDCl₃) de 55.



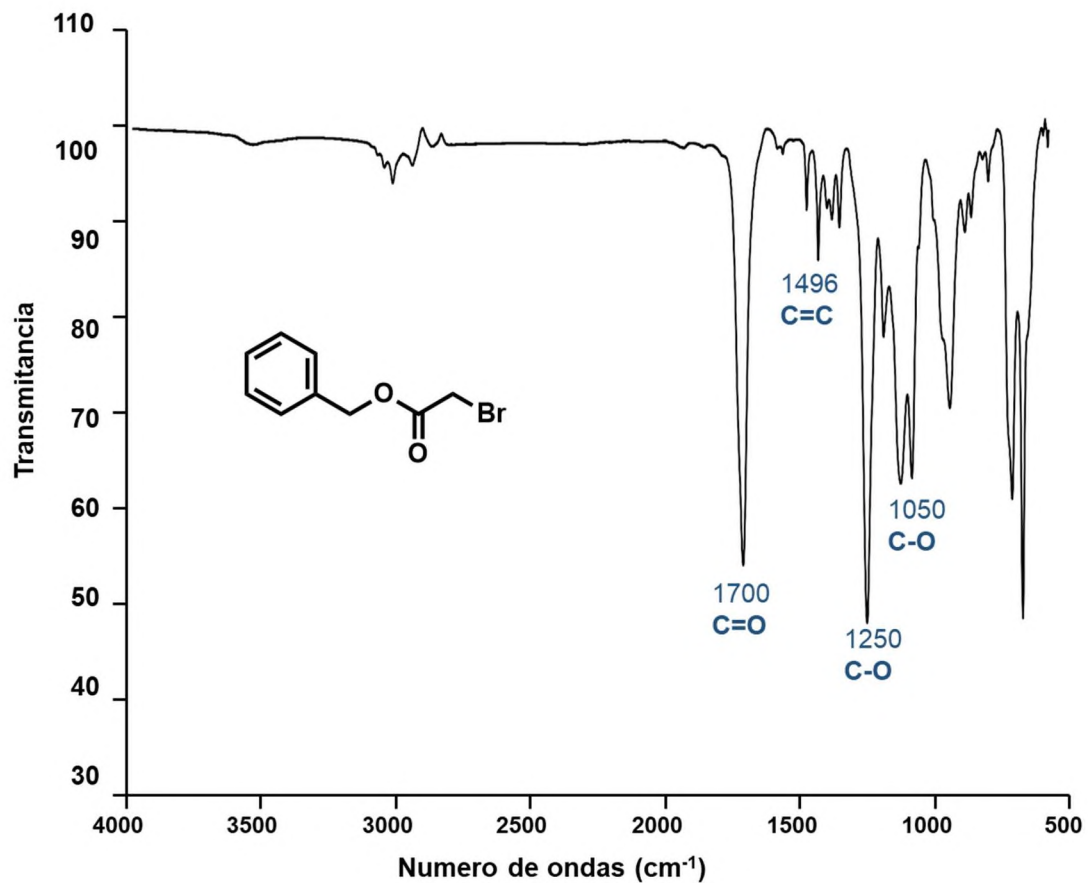
Espectro RMN de ^{13}C (20 MHz, CDCl_3) de **55**.



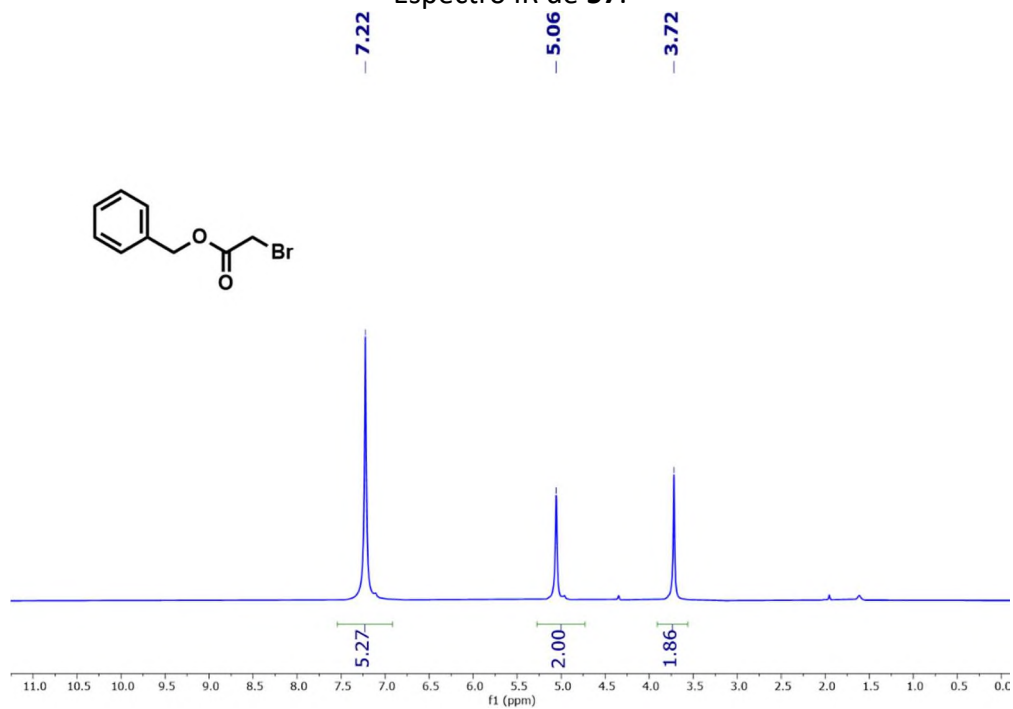
Espectro RMN de ¹H (80 MHz, CDCl₃) de 56.



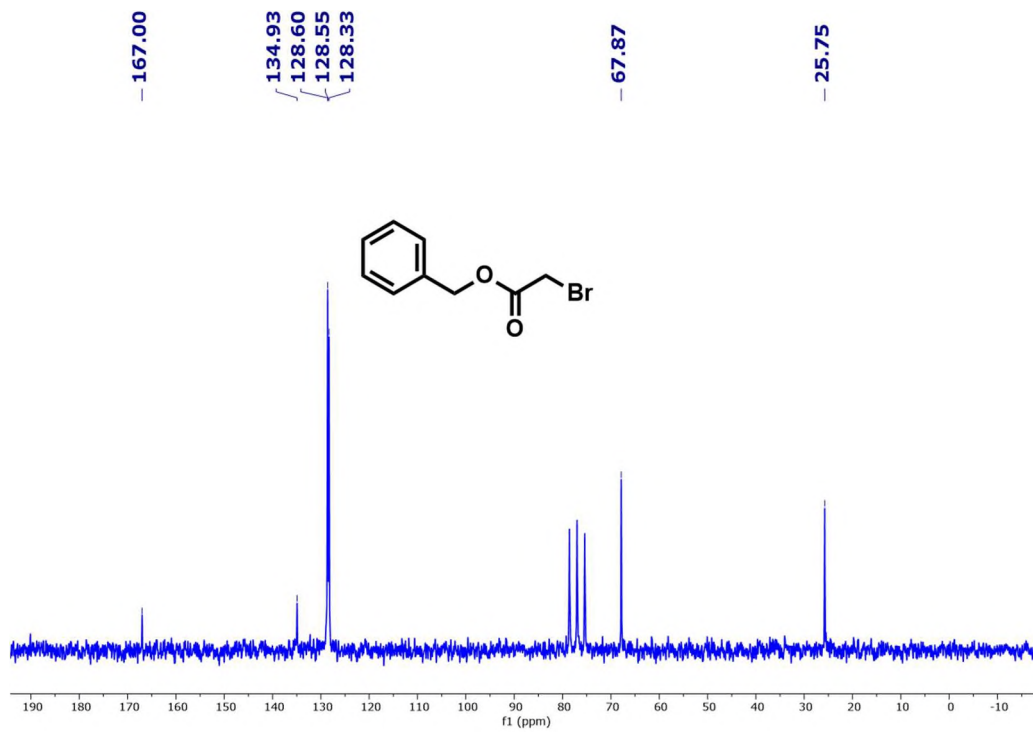
Espectro RMN de ¹³C (20 MHz, CDCl₃) de 56.



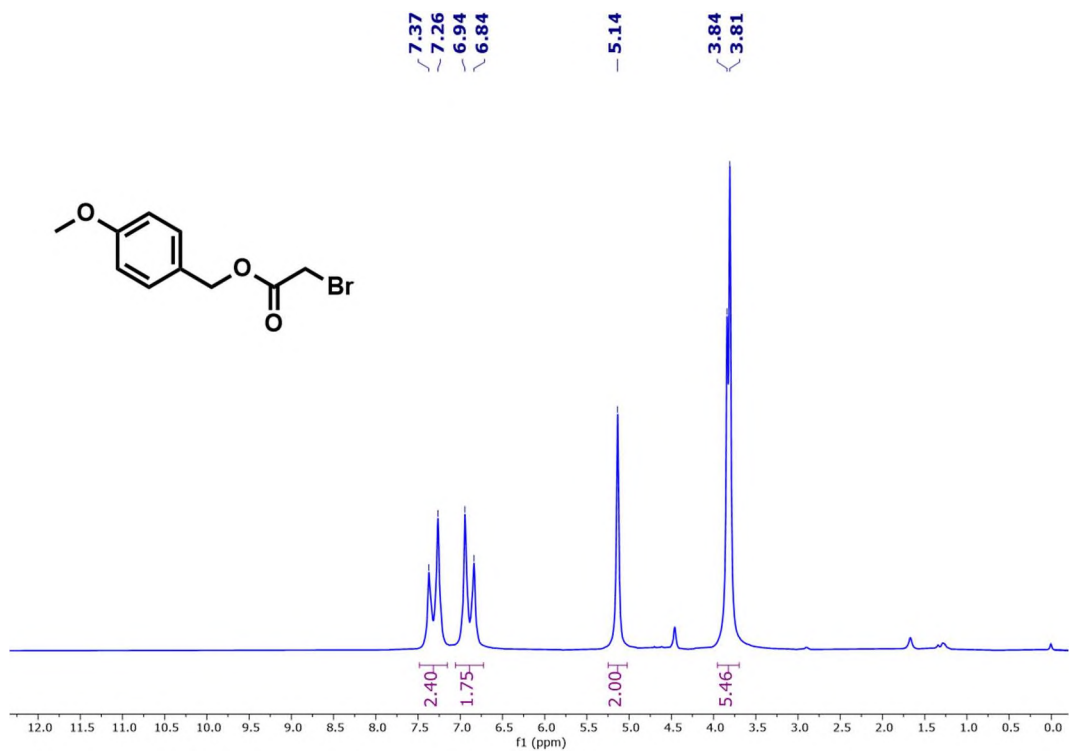
Espectro IR de 57.



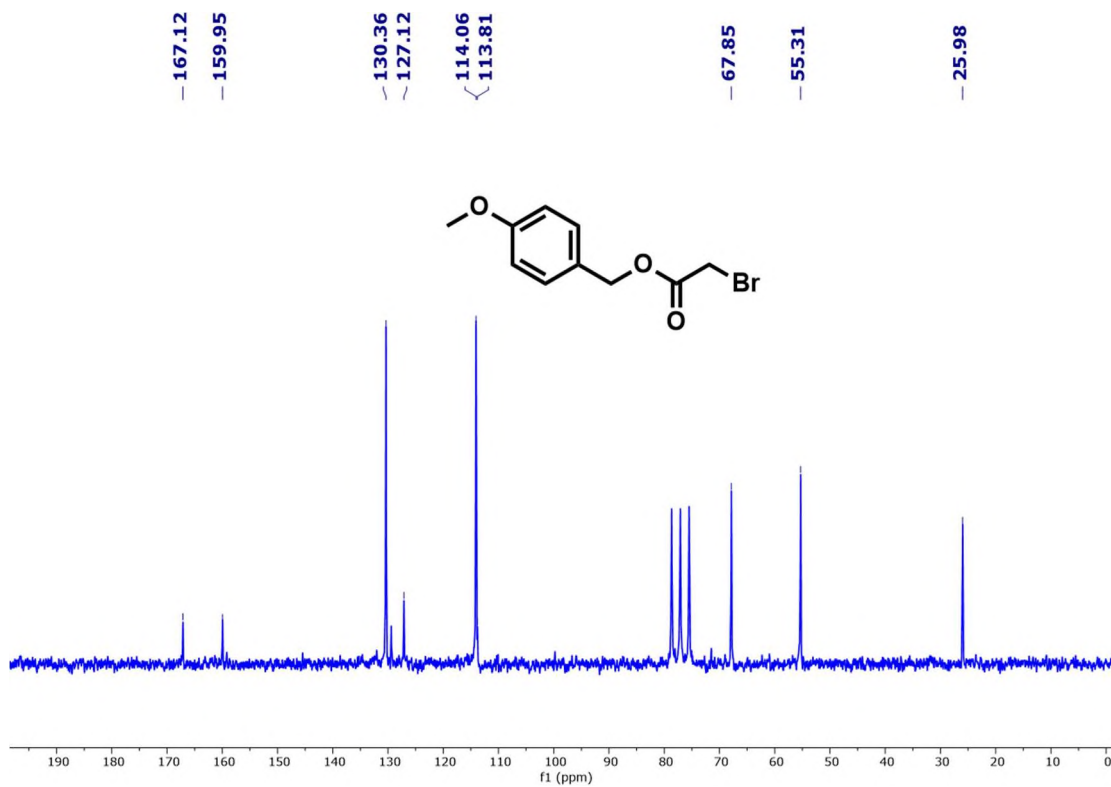
Espectro RMN de ¹H (80 MHz, CDCl₃) de 57.



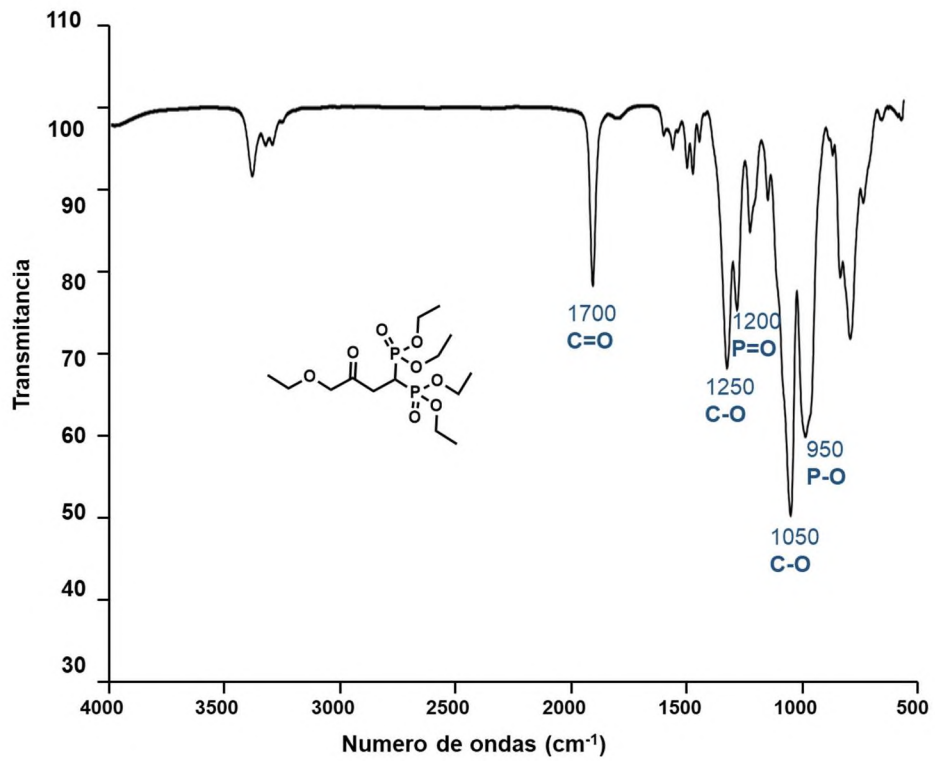
Espectro RMN de ^{13}C (20 MHz, CDCl_3) de **57**.



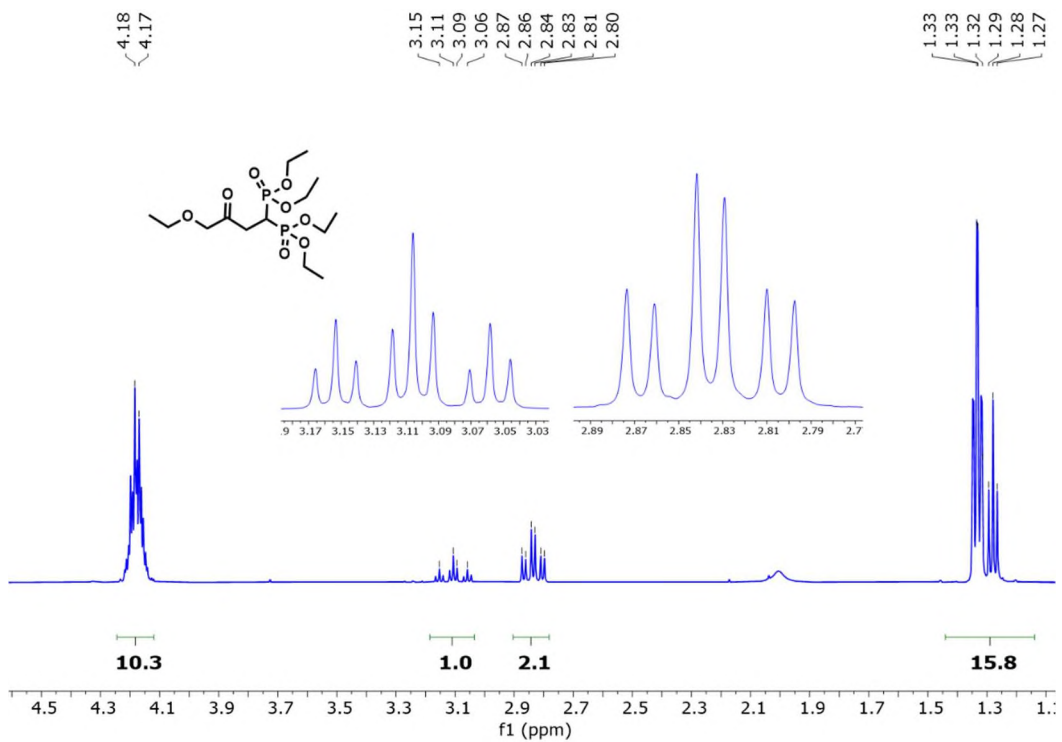
Espectro RMN de ¹H (80 MHz, CDCl₃) de **58**.



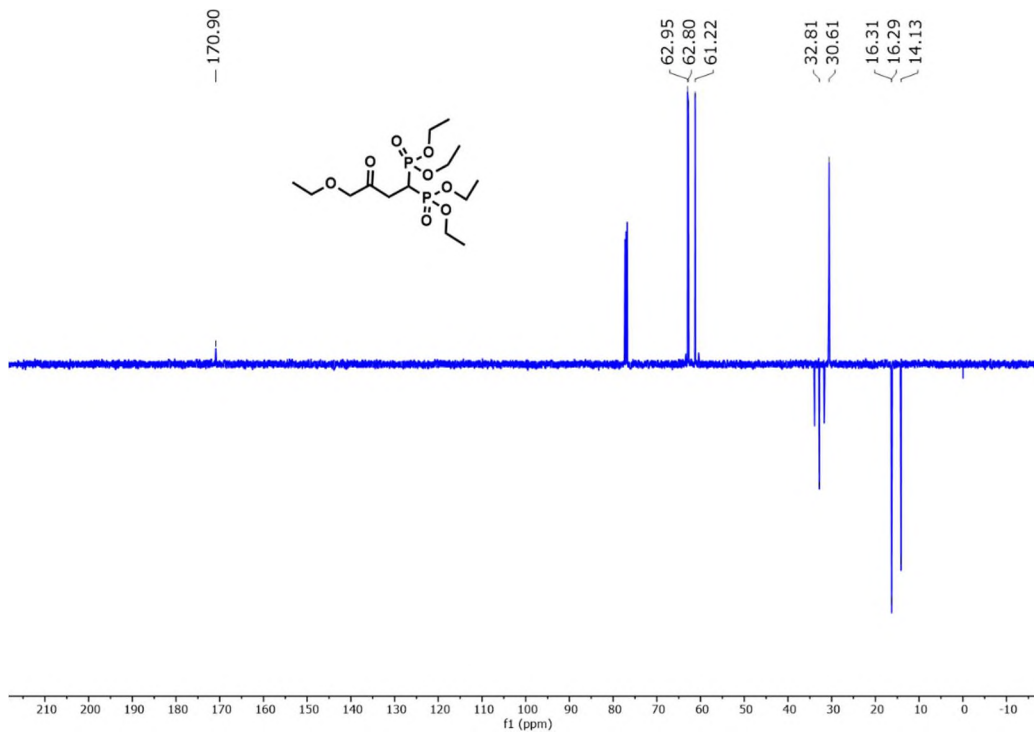
Espectro RMN de ¹³C (20 MHz, CDCl₃) de **58**.



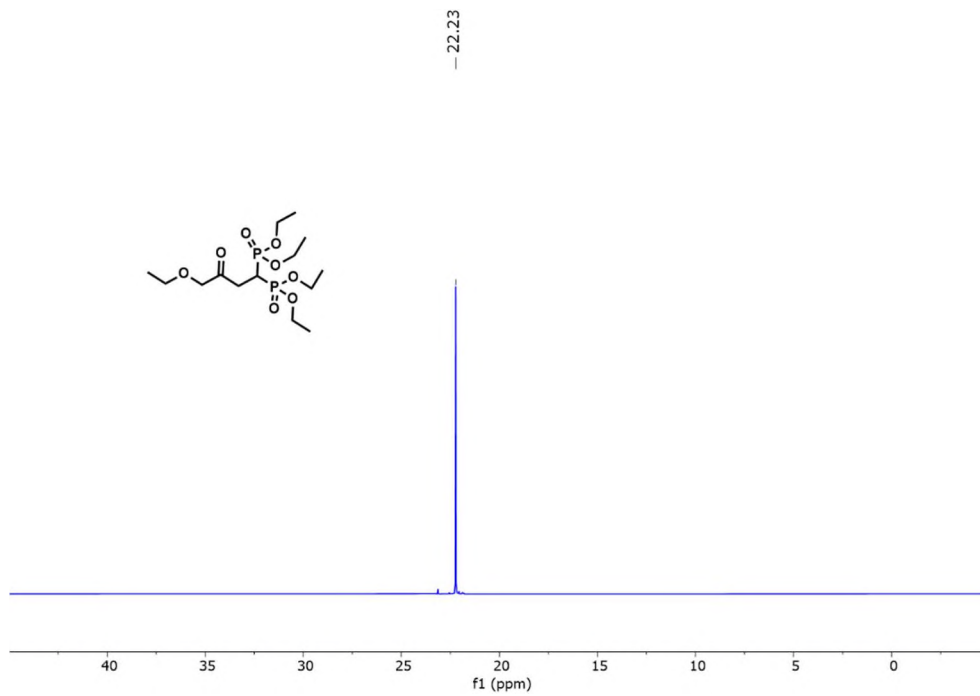
Espectro IR de **41**.



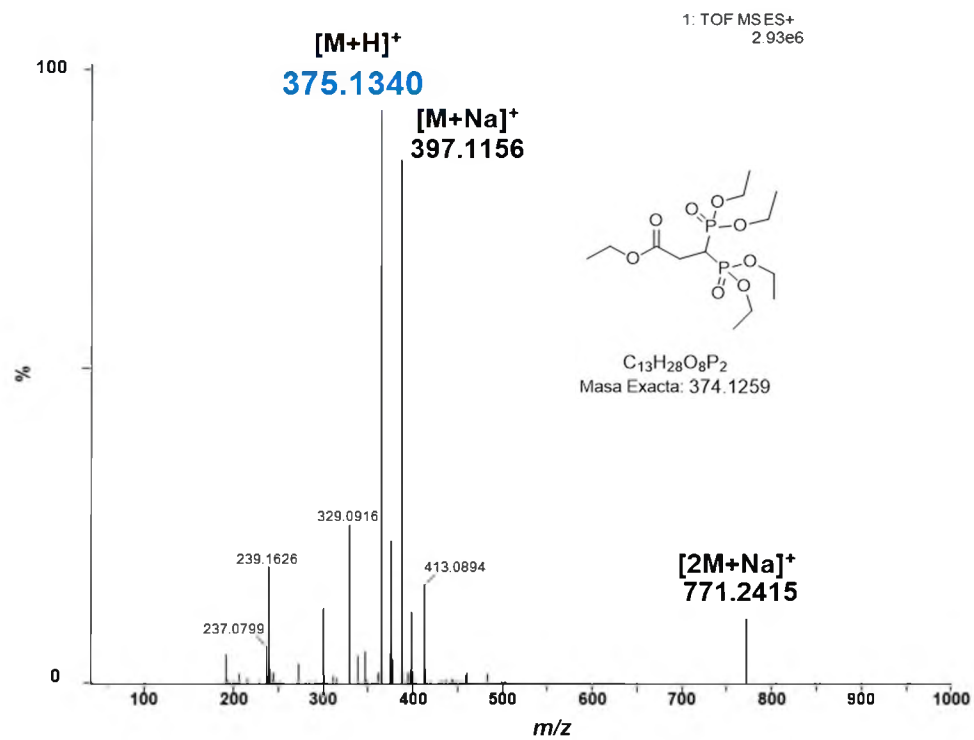
Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de **41**.



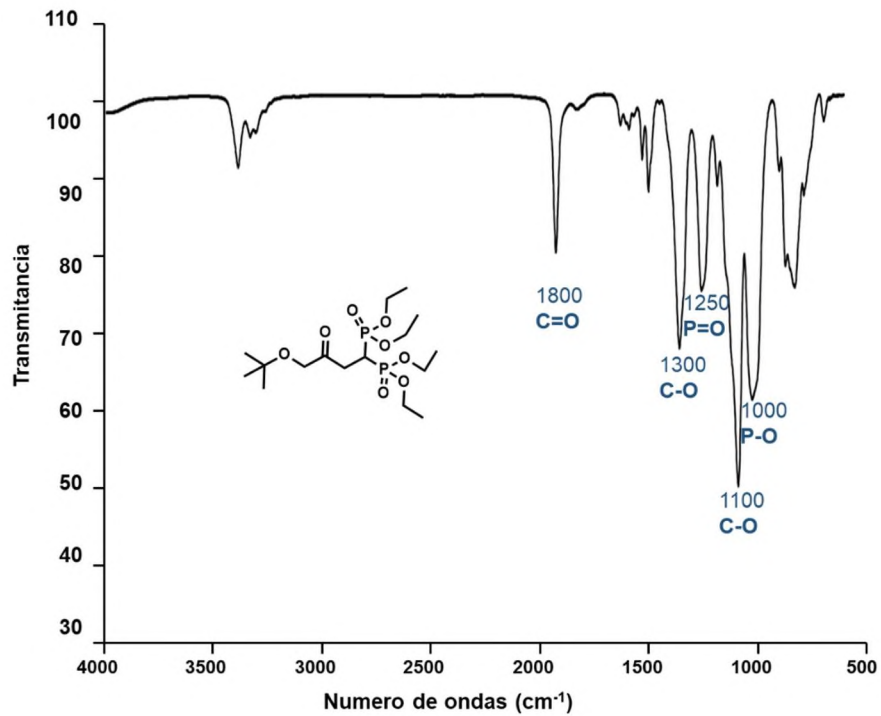
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl_3) de **41**.



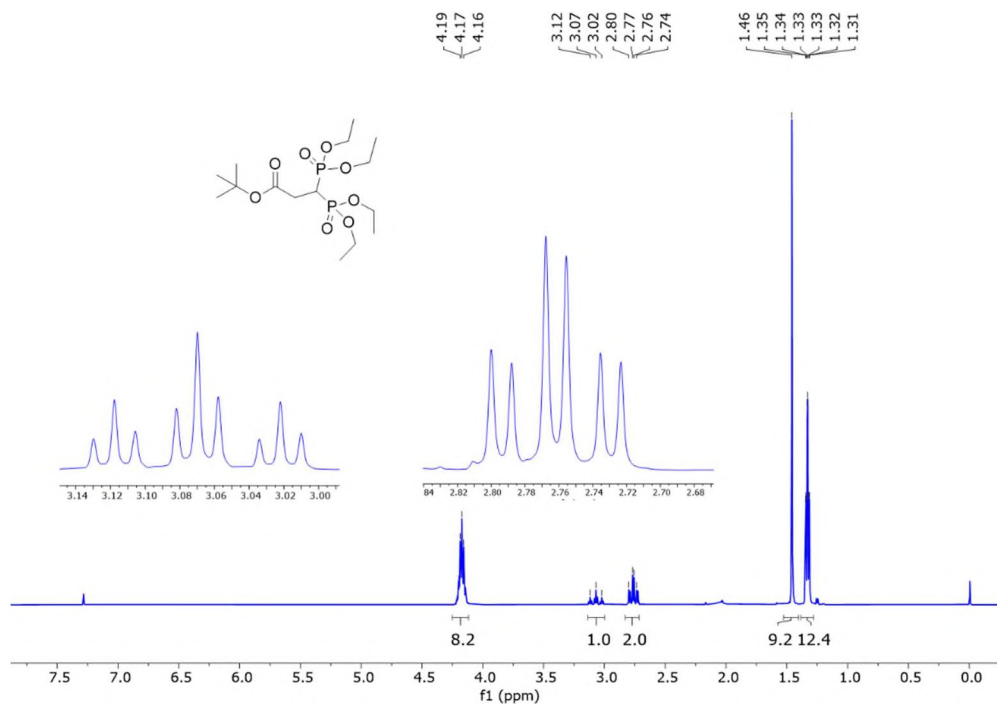
Espectro de ^{31}P (202 MHz, CDCl_3) de **41**.



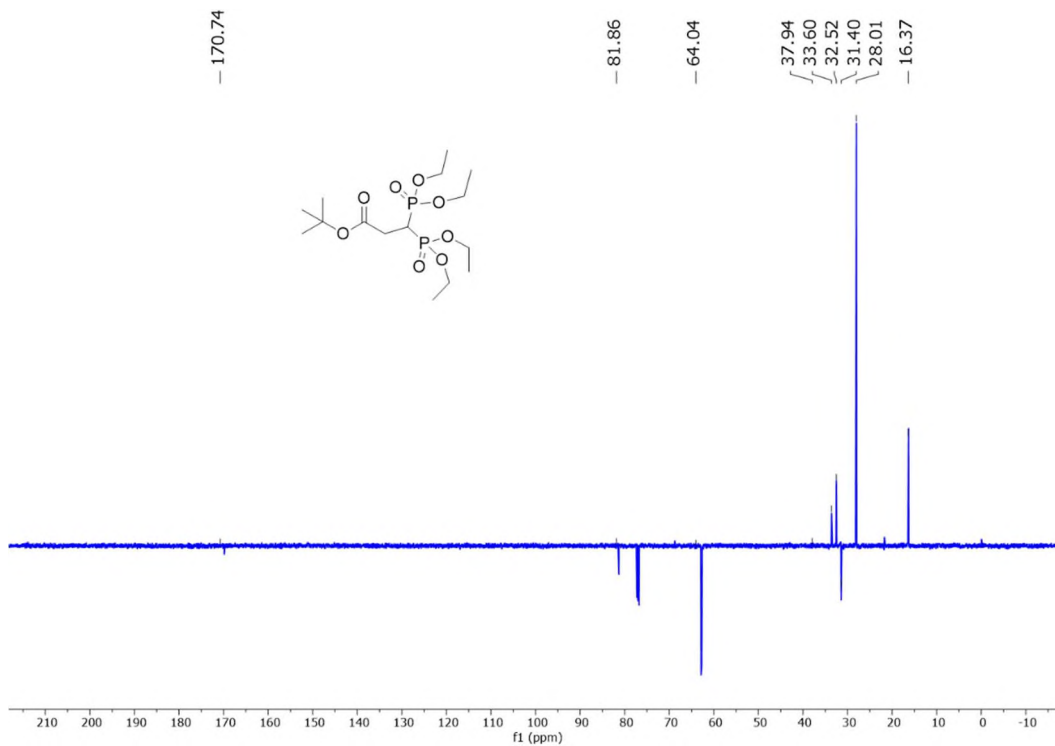
Espectro HRMS TOF MS ES+ de 41.



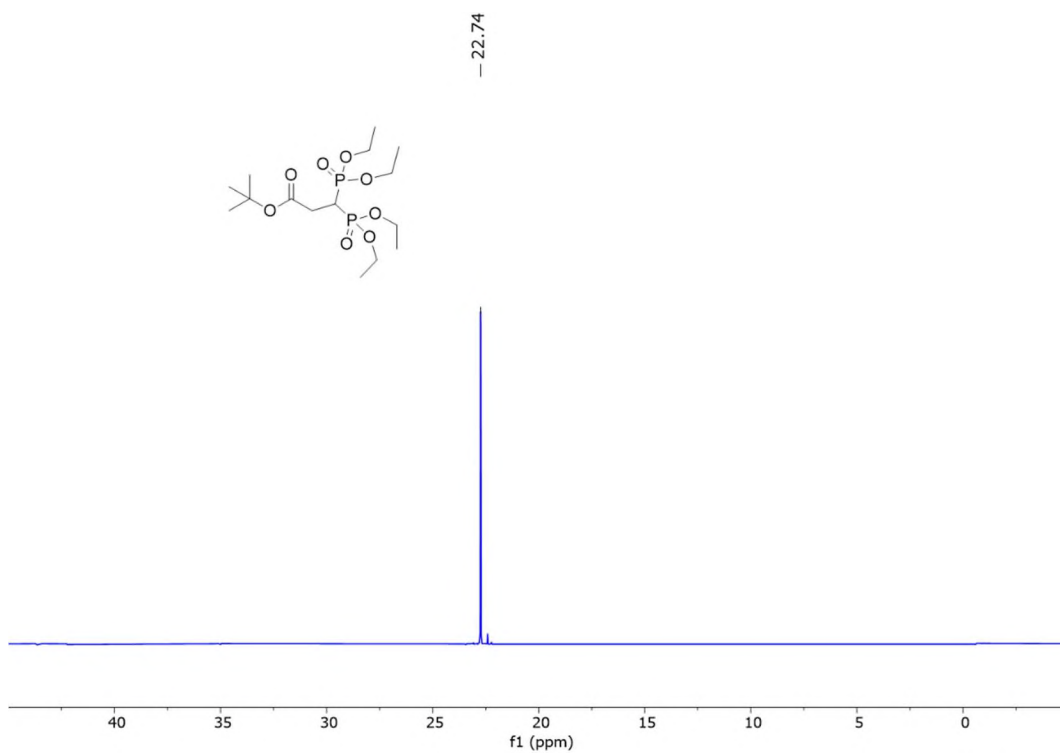
Espectro IR de **42**.



Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de **42**.

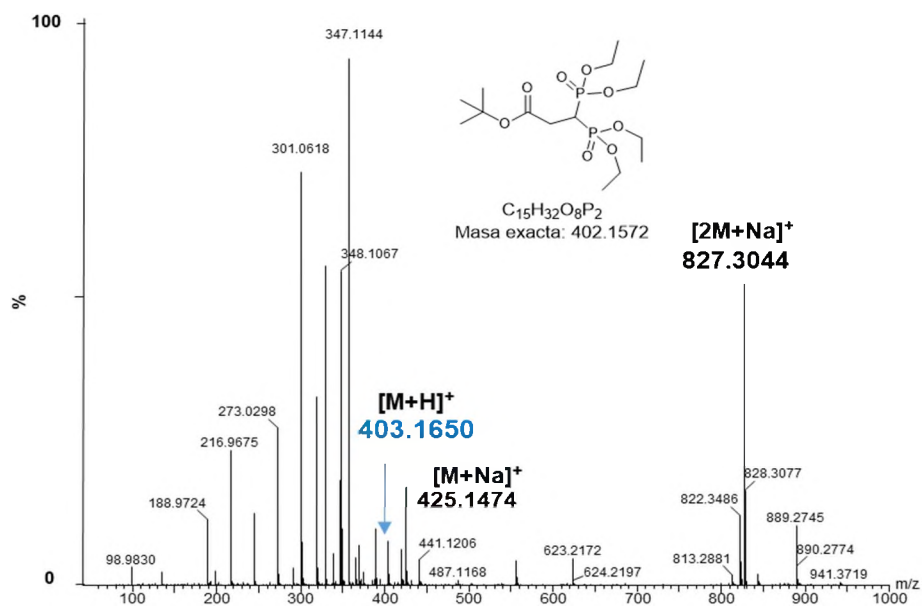


Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl₃) de **42**.

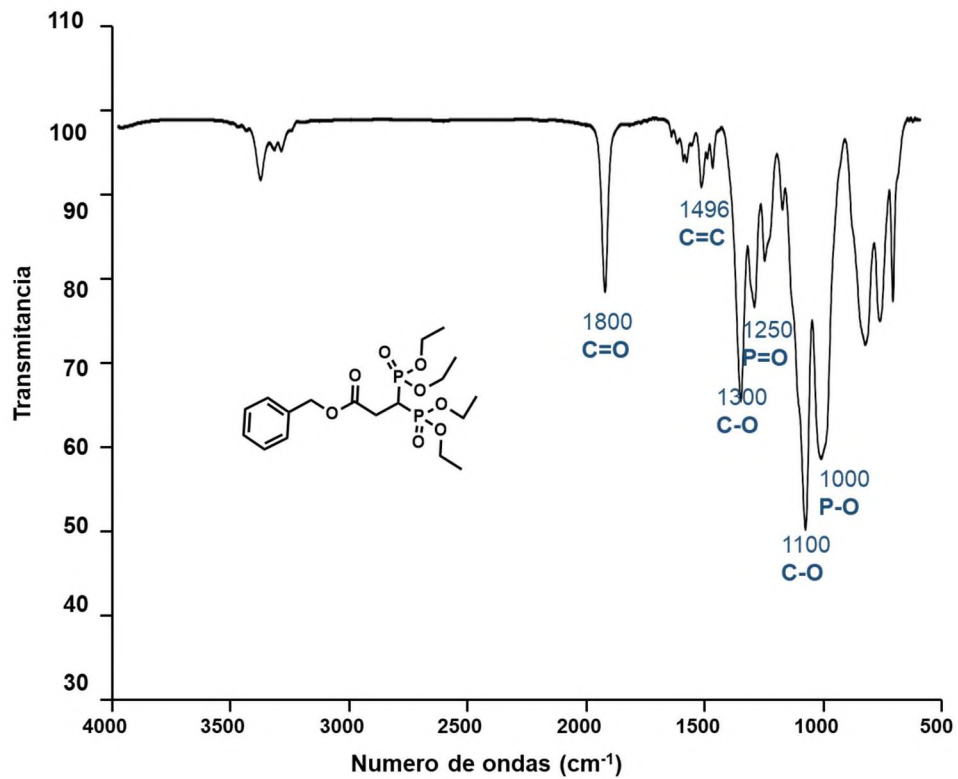


Espectro de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de **42**.

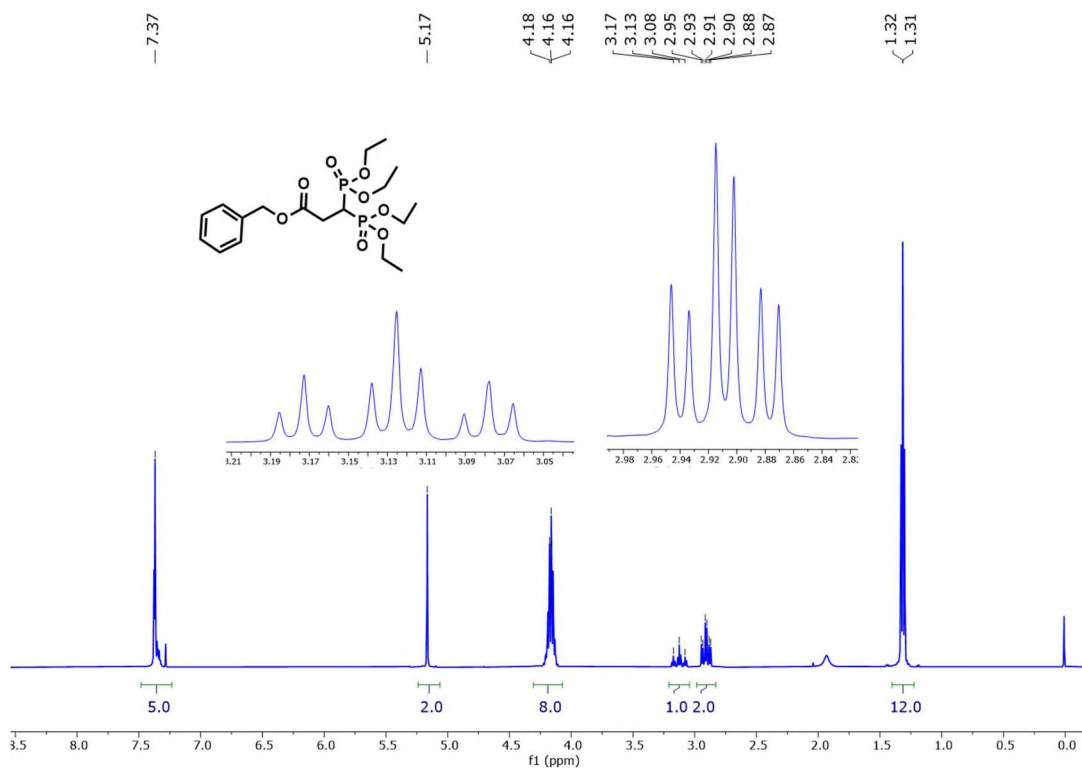
1: TOF MSES+
1.66e7



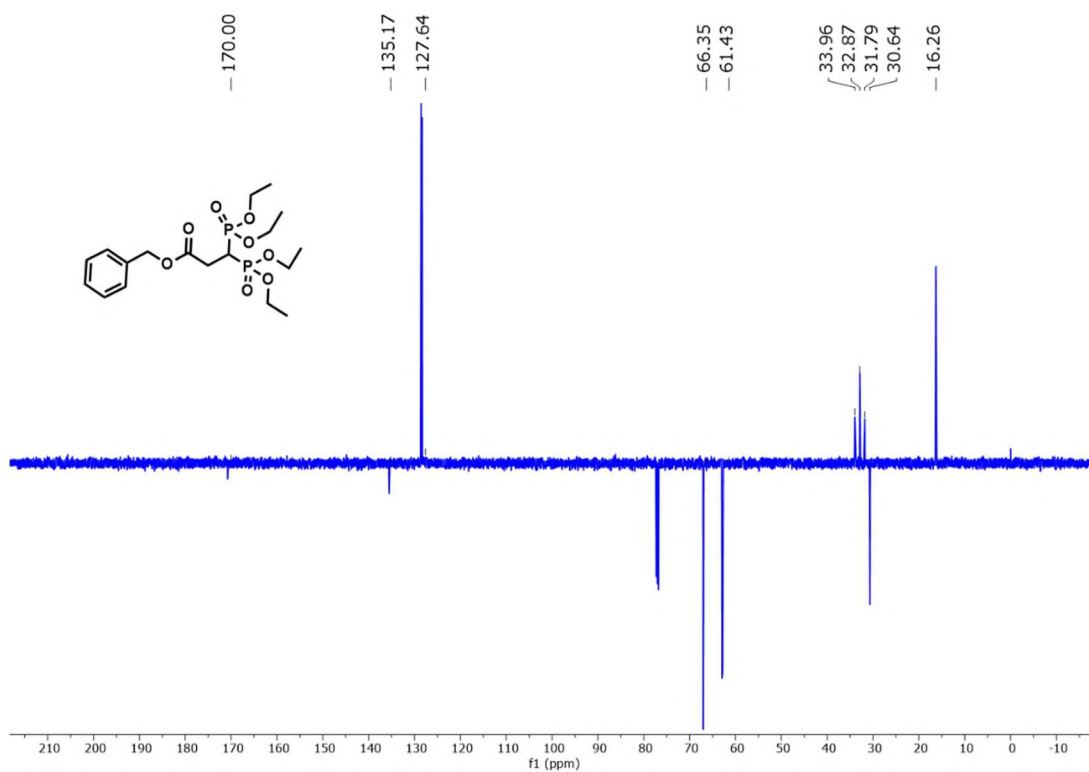
ES+ Espectro HRMS TOF M de **42**.



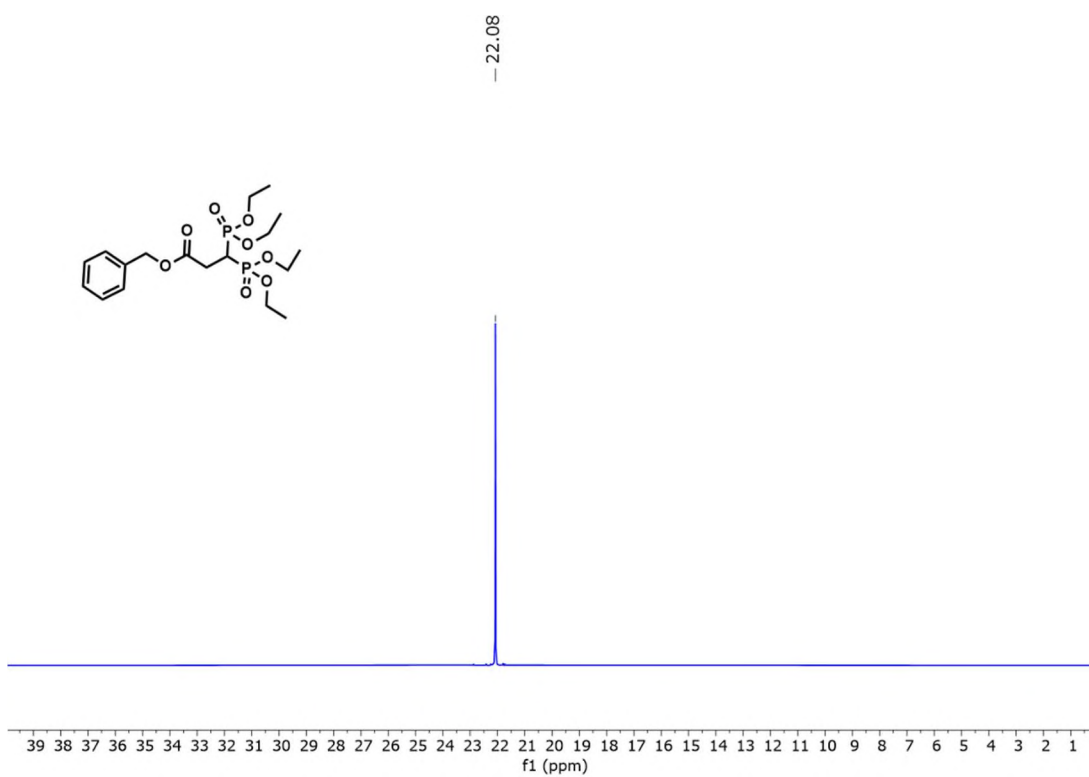
Espectro IR de **44**.



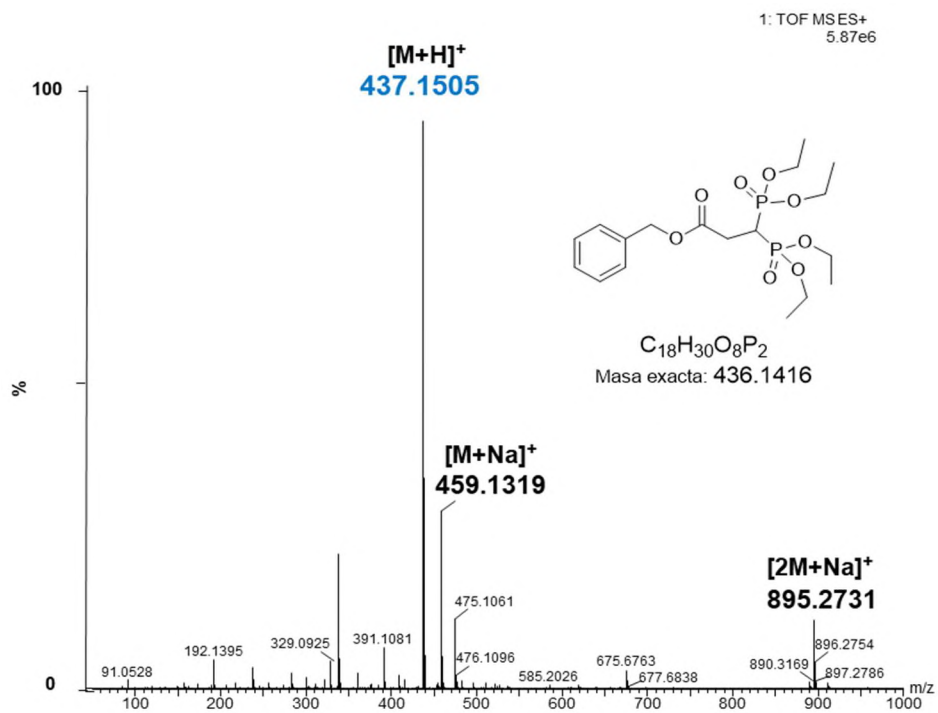
Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de **44**.



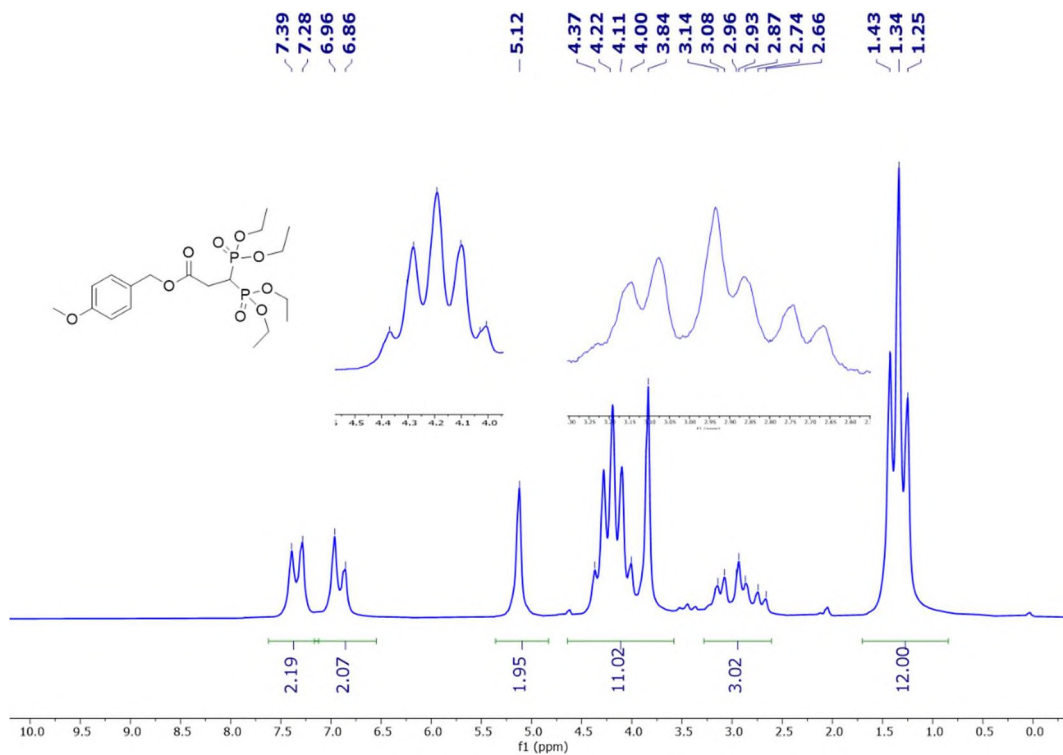
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl₃) de **44**.



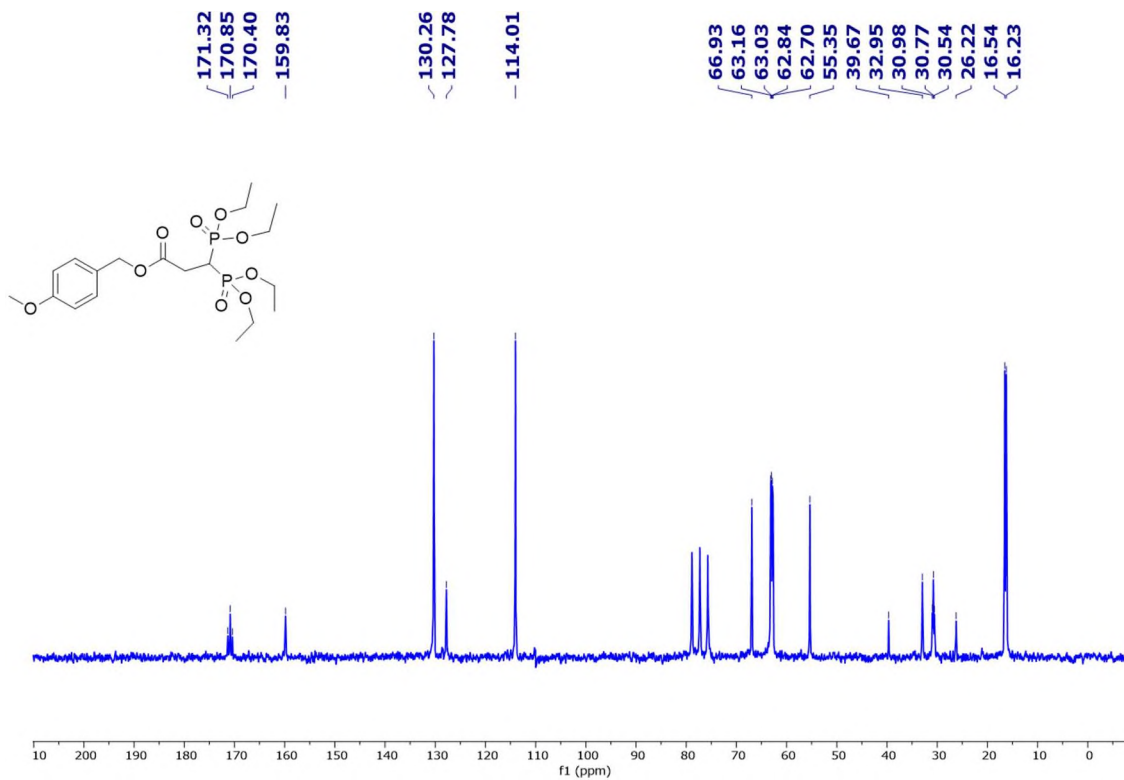
Espectro de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de **44**.



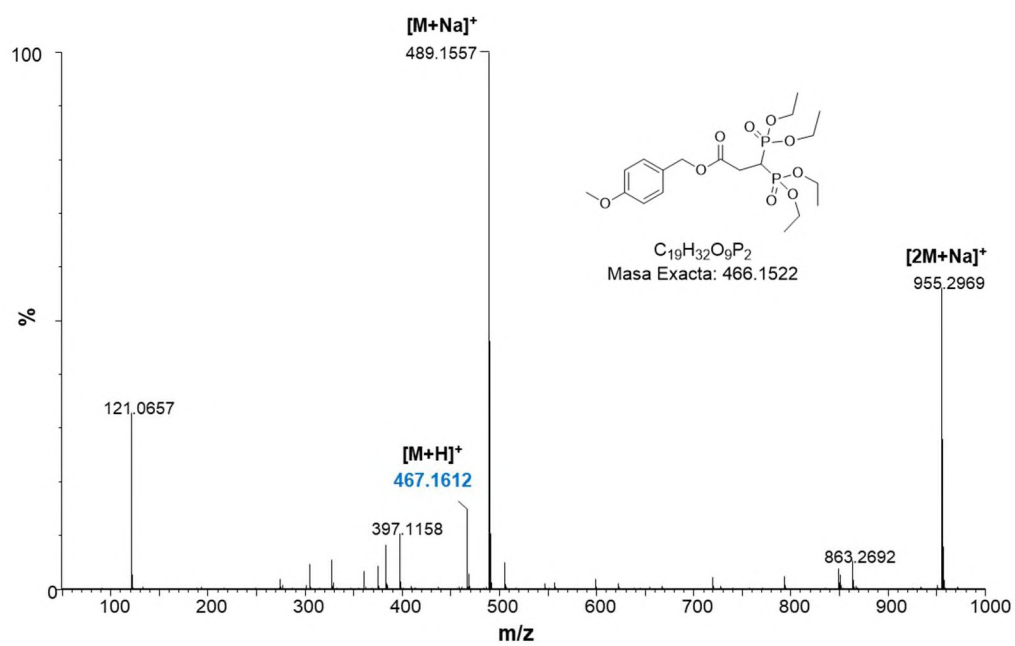
Espectro HRMS TOF MS ES+ de **44**.



Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **45**.



Espectro RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) de **45**.



Espectro HRMS TOF MS ES+ de 45.

Anexos

Tabla 14. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos **41-42** y **44-45** en el modelo de carragenina en ratones hembra Balb/C.

Tratamiento	Formación de edema subplantar (mm)				
	1 h	3 h	5 h	7 h	24 h
Control	0.276±0.03	0.560±0.03	0.722±0.03	0.485±0.03	0.314±0.04
Indo (20 mg)	0.298±0.02	0.360±0.03 ^a	0.438±0.03 ^a	0.433±0.03	0.312±0.04
41 (25 mg)	0.246±0.02	0.449±0.05	0.517±0.03 ^a	0.425±0.04	0.238±0.03
42 (25 mg)	0.302±0.04	0.549±0.03 ^b	0.523±0.03 ^a	0.497±0.04	0.315±0.02
44 (25 mg)	0.294±0.03	0.533±0.05 ^b	0.661±0.06 ^{b,c}	0.403±0.04	0.313±0.05
45 (25 mg)	0.295±0.04	0.559±0.03 ^b	0.624±0.04 ^b	0.426±0.02	0.311±0.03

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo. ^avs. Control carragenina; ^bvs. Indometacina.

Tabla 15. Resultados de la actividad antiinflamatoria de los compuestos **41-42** y **44-45** en el modelo de carragenina en ratones macho Balb/C.

Tratamiento	Formación de edema subplantar (mm)				
	1 h	3 h	5 h	7 h	24 h
Control	0.382±0.01	0.580±0.03	0.830±0.017	0.678±0.02	0.360±0.02
Indo (20 mg)	0.369±0.03	0.496±0.02 ^a	0.530±0.04 ^a	0.555±0.04 ^a	0.306±0.02
41 (25 mg)	0.394±0.04	0.475±0.02 ^a	0.626±0.03 ^{a,b}	0.565±0.04 ^a	0.317±0.03
42 (25 mg)	0.344±0.01	0.536±0.01	0.657±0.02 ^{ab}	0.585±0.03 ^a	0.315±0.024
44 (25 mg)	0.357±0.02	0.503±0.02	0.716±0.03 ^{a,b}	0.592±0.02 ^a	0.299±0.02
45 (25 mg)	0.419±0.02	0.619±0.03 ^b	0.755±0.06 ^b	0.713±0.06	0.449±0.06

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo. ^avs. Control carragenina; ^bvs. Indometacina.

Tabla 16. Resultados de la ganancia de peso en la evaluación de toxicidad aguda de los compuestos **41-42 y 44-45** en ratones hembra Balb/C durante un periodo de 14 días.

Tratamiento	Ganancia de peso (g)					
	Día 3	Día 5	Día 7	Día 10	Día 12	Día 14
Control	0.006±0.15	-0.226±0.16	0.034±0.17	0.262±0.35	0.294±0.32	0.616±0.27
41 (50 mg/kg)	0.246±0.11	0.328±0.04 ^a	0.248±0.08	0.214±0.06	0.328 ±0.07	0.502±0.15
41 (100 mg/kg)	-0.274±0.10	-0.102±0.13	0.044±0.034	0.194 ±0.21	0.330±0.22	0.498±0.22
42 (50 mg/kg)	-0.092±0.11	0.096±0.08	0.090±0.08	0.158±0.09	0.368±0.10	0.404±0.17
42 (100 mg/kg)	-0.084±0.08	0.220±0.21	0.252±0.17	0.304±0.17	0.370±0.29	0.658±0.18
44 (50 mg/kg)	-0.214±0.12	-0.362±0.10	0.044±0.11	0.056±0.04	0.300±0.04	0.606±0.10
44 (100 mg/kg)	-0.386±0.05 ^a	-0.134±0.03	0.028±0.11	0.144±0.15	0.236±0.15	0.706±0.18
45 (50 mg/kg)	-0.232±0.08	-0.26±0.10	0.020±0.05	0.108±0.09	0.278±0.06	0.642±0.13
45 (100 mg/kg)	0.188±0.62	0.184±0.67	0.376±0.67	0.654±0.55	0.668±0.55	0.888±0.62

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo.