



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
ANTITUMORALES INHIBIDORES DE LA
TIMIDILATO SINTASA

Autora: María Teresa Esteban Alonso

Fecha: Convocatoria Ordinaria 2020

Tutor: Nieves Cabezas Baudot

Índice

1. Listado de abreviaturas.
2. Resumen.
3. Introducción y antecedentes.
4. Objetivos.
5. Metodología.
6. Resultados y discusión.
 - 6.1. Timidilato sintasa.
 - 6.2. Inhibidores que se unen al sitio de unión del dUMP
 - 6.2.1. 5-FU y Floxuridina.
 - 6.2.2. Profármacos del 5-FU.
 - 6.2.2.1. Tegafur.
 - 6.2.2.2. Doxifluridina.
 - 6.2.2.3. Capecitabina.
 - 6.2.2.4. 5-FP.
 - 6.2.2.5. Emitefur.
 - 6.2.2.6. Flucitosina.
 - 6.2.3. Análogos del 5-FU.
 - 6.2.3.1. Trifluridina.
 - 6.3. Análogos del ácido fólico.
 - 6.3.1. Raltitrexed
 - 6.3.2. Pemetrexed
 - 6.3.3. Plevitrexed
 - 6.3.4. Nolatrexed
7. Conclusiones.
8. Bibliografía.

1. LISTADO DE ABREVIATURAS

5,10-metilen-THF	5,10-metilentetrahidrofolato
5-FdUTP	5-Fluoro-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato
5-FdUMP	Ácido 5-fluoro-2'-desoxiurídico
5-FU	5-Fluorouracilo
CCR	Cáncer colorrectal
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHF	Ácido dihidrofólico
DPD	Dihidropirimidina deshidrogenasa
dUMP	Desoxiuridilmonofosfato
FPGS	Folipoliglutamato sintetasa
LV	Leucovorina
PLP	Piridoxal fosfato
RFC	Transportador de folatos reducidos
SHMT	Hidroximetil transferasa
THF	Tetrahidrofolato
TFT	Trifluoridina
TMP	Ácido timidílico
TP	Timidina fosforilasa
TS	Timidilato sintasa

2. RESUMEN

Las células tumorales son generalmente de división rápida, por lo que presentan una alta demanda de bases púricas y pirimidínicas. Entre las derivadas del anillo de pirimidina, se encuentra la timina. Los nucleótidos que contienen esta base nitrogenada forman parte del ADN en forma de ácido timidílico.

La timidilato sintasa (TS) es una enzima fundamental en el proceso de síntesis del ADN, ya que cataliza la transformación de dUMP a ácido timidílico. Es la única fuente de obtención de timidina *de novo* en la célula. Su inhibición supone el desabastecimiento total de esta base pirimidínica y por tanto la alteración de la síntesis del ADN.

Se han desarrollado gran variedad de fármacos, entre los que destaca el 5-fluorouracilo (5-FU) que lleva usándose en clínica desde hace 60 años, y actualmente continúa siendo el tratamiento de elección para algunos cánceres. Su diseño se basa en la analogía de éste con el sustrato original de la TS.

A partir del 5-FU se han desarrollado otros fármacos antitumorales para multitud de tipos de cáncer. Las aproximaciones realizadas para su mejora en su mayoría han ido encaminadas a la disminución de la toxicidad del 5-FU y la mejora de sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo responsable de aproximadamente 9.6 millones de decesos durante el 2018 según la OMS. (1)

Éste término se usa para englobar aquellas enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo y que se caracterizan por la pérdida de control de los mecanismos de regulación de los procesos normales de multiplicación y crecimiento celular. El crecimiento

descontrolado de dichas células en determinados tejidos puede dar lugar a la invasión y destrucción de tejidos adyacentes y a su vez a la propagación a otras zonas del cuerpo en un proceso denominado metástasis.

Estas células neoplásicas o tumorales pierden capacidades como la de diferenciarse y adquieren otras como son: la proliferación independiente de las señales de crecimiento, la capacidad de replicación ilimitada, el desarrollo de mecanismos para escapar de la apoptosis, la resistencia a señales antiproliferativas y la emisión de factores angiogénicos que permiten la formación de nuevos vasos sanguíneos para la llegada de mayor cantidad de metabolitos y oxígeno, en definitiva, para suplir ese aumento de la masa tumoral.

El obstáculo más importante a la hora de tratar el cáncer es que es una enfermedad multifactorial, de evolución lenta, en la que intervienen tanto factores externos como genéticos. Varios tipos de genes participan en su desarrollo, encontrándose entre ellos los oncogenes, los genes supresores, los de la telomerasa y los que codifican para la señalización de la apoptosis, entre otros. Hay más de 200 cánceres procedentes de distintos defectos celulares, por lo que el tratamiento efectivo para un tipo de cáncer puede no serlo para otro.

Entre los tratamientos más usuales encontramos la radioterapia, la cirugía y la quimioterapia. En esta última, los fármacos administrados concomitantemente deben tener mecanismos de acción diferentes, de tal manera que aumente la efectividad, disminuya la toxicidad y se evite el desarrollo de mecanismos de resistencia al tratamiento (2).

La quimioterapia moderna tiene su origen en el desarrollo de las mostazas nitrogenadas como arma química. Desde aquel entonces se han desarrollado sustancias tanto sintéticas como semi-sintéticas para suplir la escasez de productos naturales para la terapia del cáncer. Una de estas estrategias son los antimetabolitos. Son compuestos análogos al sustrato natural, de tal manera que interfieren con el proceso normal, inhibiendo rutas metabólicas esenciales.

La selectividad hacia las células tumorales se debe a la capacidad de estas de dividirse rápidamente, ya que las enzimas que son inhibidas por estos metabolitos también pueden encontrarse en células no cancerosas.

Un elemento fundamental para esta división es la síntesis de ADN, que puede ser inhibida indirectamente gracias a fármacos que impiden a las enzimas intervenir en dicho proceso.

Entre ellas se encuentran los inhibidores de la timidilato sintasa.

4. OBJETIVOS

Este trabajo trata de sintetizar la información recopilada a partir de varias fuentes bibliográficas con respecto al mecanismo de la TS, la inhibición de este mismo, y sus consecuencias. También se busca entender la necesidad de inhibir esta enzima y las formas de optimizar este proceso, de tal manera que se evite la toxicidad a la hora de utilizar los fármacos antitumorales disponibles actualmente. No sólo se busca conocer los fármacos en uso, si no que también nos interesan las causas que llevaron a desechar los que entraron en los ensayos clínicos y, por tanto, no han sido aprobados para su uso en clínica.

5. METODOLOGÍA

Se ha realizado un trabajo analítico, basado en la planificación, organización y búsqueda de información en diferentes fuentes bibliográficas. Partiendo fundamentalmente de los datos obtenidos del libro *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* y ampliando la información contenida en éste mediante bases de datos y otros estudios relacionados con la TS y los fármacos que la inhiben. En este trabajo se intenta mostrar la visión más actual del conocimiento disponible acerca de esta enzima.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. TIMIDILATO SINTASA

La timidilato sintasa es un homodímero formado por dos subunidades estructuralmente idénticas entre sí, cada una de ellas tiene una cavidad donde se encuentra el sitio activo. (3) Un residuo de cisteína se sitúa a un lado de la cavidad, mientras que varios residuos de arginina y uno de serina forman la base de esta. Cada sitio activo contiene residuos de ambas subunidades, lo que hace que la enzima sea un dímero obligado. (4) (Figura 1)

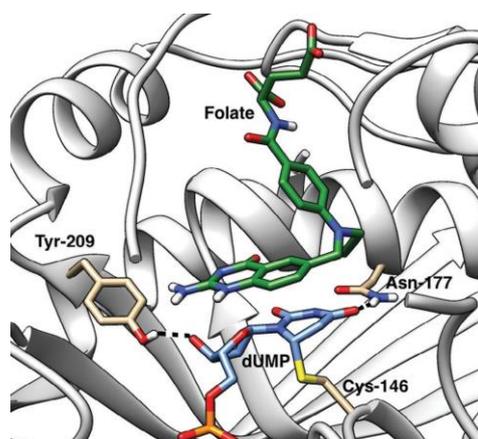


Figura 1: Estructura del complejo ternario de la TS de *E coli*

En seres humanos, es el producto de la expresión del gen TYMS, localizado en el brazo corto del cromosoma 18. Está constituido por 7 exones. (5) Su RNA tiene un número variable de repeticiones en tandem, las cuales constan de 28pb. Estas secuencias repetidas juegan un papel importante en el control de su expresión y además son variantes que pueden predecir la efectividad del 5-FU.

Mecanismo de acción

La timidilato sintasa es una enzima metiltransferasa que interviene en la síntesis del ácido timidílico. Cataliza la conversión del dUMP a timidilato en una metilación reductiva.

El proceso catalítico normal llevado a cabo por la TS, comienza cuando el dUMP se une a la zona de reconocimiento de la enzima, lo que da lugar a un cambio de conformación que permite la apertura de la zona de unión del cofactor. Mediante una adición de Michael el residuo de cisteína situado en el centro activo de la TS queda unido covalentemente al C-6 del dUMP, siendo así activado el C-5 en forma de enolato nucleófilo.

Por otro lado, el cofactor, 5,10-CH₂-THF, debe transformarse en su especie reactiva (2.21), el ion metileniminio, especie capaz de ceder una unidad de carbono a la posición 5 del dUMP. Su formación ocurre tras la apertura del anillo de imidazolina, que podría dar lugar tanto al ion 5- iminio como al 10- iminio, ya que ambos son suficientemente inestables para su determinación. En estudios cinéticos de la hidrólisis del 5,10-CH₂-THF se propuso el ion 5- iminio ya que el N 5 es ligeramente más básico que el N 10, además de ser este último mejor saliente.

Una vez formado el catión (2.21), será atacado por el enolato del C-5 del dUMP (2.22), para dar paso a un complejo ternario, formado por el cofactor, la enzima y el dUMP (2.23).

Un centro básico de la enzima capta el hidrógeno ácido (H5), situado en alfa al carbonilo de la base nitrogenada, permitiendo la separación del THF (2.24). Se genera así un intermediario con un radical metilen en el C5 (2.25). Éste intermediario es una especie muy reactiva, por lo que será atacada por un anión hidruro procedente del THF. En este último paso el 2.25 se reducirá para obtener el TMP, además de permitir la liberación de la enzima y el cofactor en su forma oxidada (DHF). Figura 2. (6)

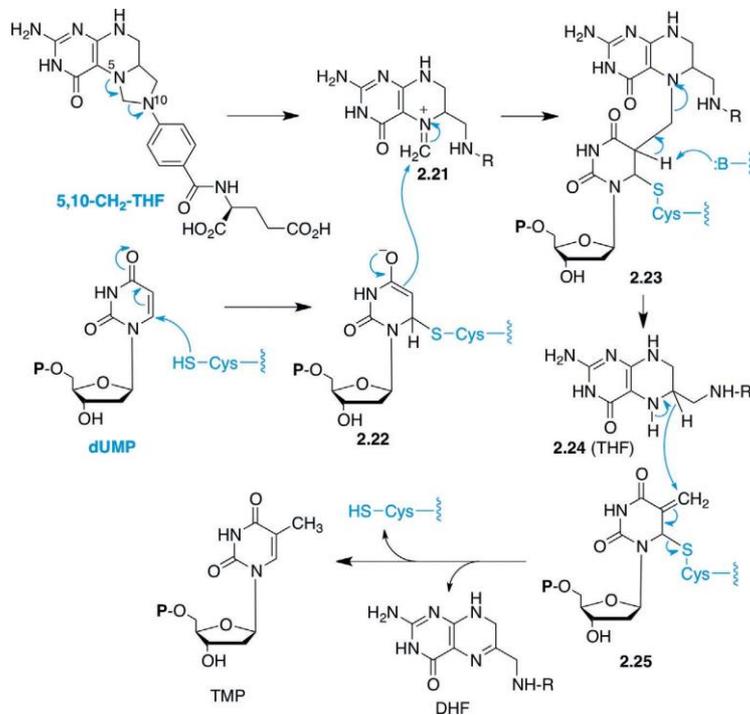


Figura 2: Mecanismo de metilación del dUMP por la TS.

El cofactor es fundamental para llevar a cabo la reacción, ya que es el encargado de transferir el átomo de carbono desde su estructura a la posición 5 del anillo de pirimidina. Una vez obtenido el TMP, el ácido dihidrofólico (DHF) debe volver a ser transformado en 5,10-CH₂-THF. En este proceso de recuperación intervienen otras dos enzimas (Figura 3):

- DHF reductasa (DHFR): reduce el producto de la reacción a THF.
- Hidroximetil transferasa (SHMT): usa como cofactor el Piridoxal fosfato (PLP) y cataliza la formación del 5,10-CH₂-THF, a la vez que transforma la serina en glicina.

Este proceso de metilación forma parte del ciclo del timidilato.

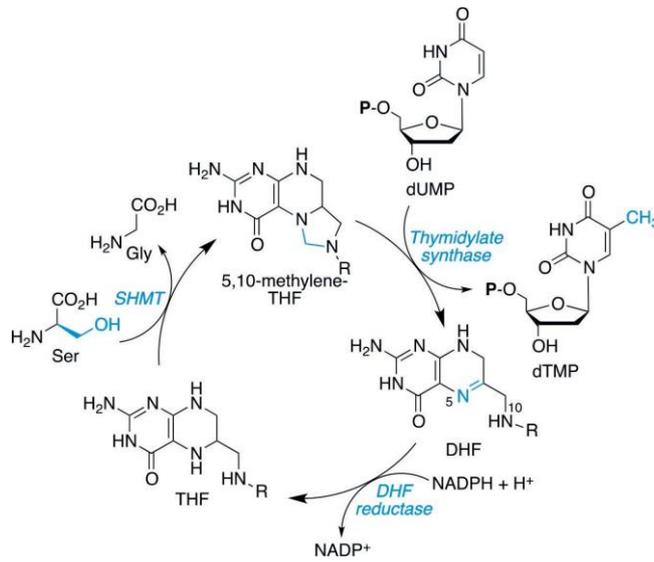


Figura 3: Ciclo del timidilato.

6.2. INHIBIDORES QUE SE UNEN AL SITIO DE UNIÓN DEL dUMP EN LA TS.

6.2.1 5- FU Y FLOXURIDINA

Los principales inhibidores de la TS son el 5-FU y su desoxinucleósido, la floxuridina (5-FUdR). Estas fluoropirimidinas son el grupo de fármacos anticancerosos más prescritos a nivel mundial (6). Ambos se administran en forma de profármacos.

El 5-FU accede a la célula mediante el mismo mecanismo de transporte facilitado que el uracilo. Una vez dentro, es transformado en 5-fluoro-2'-desoxiuridina monofosfato (5-FdUMP), su forma activa.

La bioactivación de la Floxuridina es mucho más simple, ya que solo necesita ser monofosforilada para poder inhibir la TS. (Figura 4).

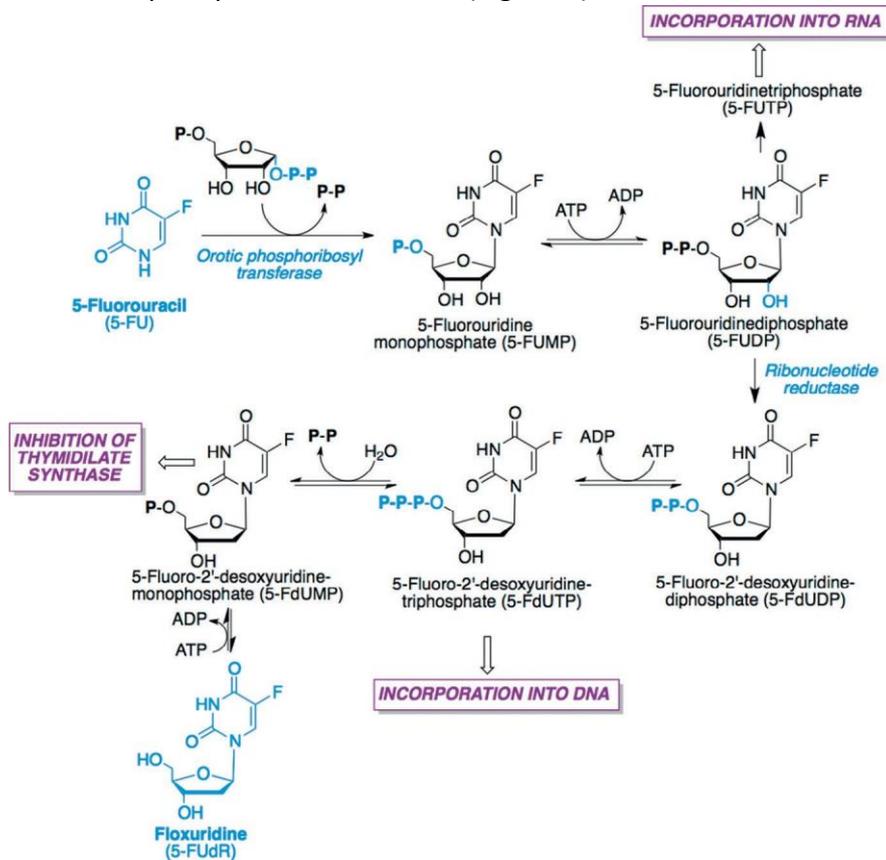


Figura 4: Especies antitumorales del metabolismo del 5-FU y la Floxuridina.

Consecuencias de la inhibición

Durante su bioactivación, el 5-FU sufre una serie de cambios estructurales hasta llegar a su forma activa. Algunos de los intermediarios de esta secuencia pueden contribuir mediante distintos mecanismos a la generación del daño celular, estos son: (Figura 4)

- **Inhibición de la TS:** Su forma activa, el 5-FdUMP, actúa como antimetabolito. Impide la acción de la enzima, disminuyendo la síntesis de nucleótidos de timina. Esto favorece la mutagénesis ya que llegado un punto comienzan a usarse otros nucleótidos en sustitución de los de timina. (7)
Por otro lado, la disminución de timina también implica el agotamiento de TMP y consecuentemente de dTTP, lo que altera el balance de otros desoxinucleótidos a través de varios mecanismos *feed-back*. Estos desequilibrios, a su vez, llevan a la alteración de la relación dATP/ TTP que interrumpe la síntesis de ADN y su reparación, y causa la muerte atimínica de la célula.
- **Incorporación al ADN:** Las ADN polimerasas insertan en el genoma :
 - o El 5-fluoro-2'-desoxiuridin-5'-trifosfato (5-FdUTP) que genera daño directo al afectar al apareamiento de las bases.
 - o El dUMP acumulado como consecuencia de la inhibición de la TS.Una vez insertados en el genoma, la toxicidad ocurre durante su reparación, cuando la ADN glicosilasa, enzima reparadora, encuentra el daño y lo escinde, generando muchas roturas en el ADN. (7)
- **Incorporación al ARN:** Las ARN polimerasas incorporan el 5-FUTP al ARN, causando alteraciones en el metabolismo y viabilidad celular.

Todo lo mencionado anteriormente influye en la estabilidad del gen p53. Este gen es el encargado de mantener la integridad del ADN, mediante la activación de genes que interrumpen el ciclo celular como respuesta a cualquier daño. Suele encontrarse inactivado en la mayoría de tumores, permitiendo su progresión. Varios estudios han demostrado que la expresión del p53 aumenta tras la quimioterapia. La respuesta apoptótica al 5-FU puede ser un factor predictivo adicional en determinados tipos de cáncer. (8) (9)

Mecanismo de acción

Una vez finalizada la bioactivación, el 5-FU y la fluxoridina se encuentran en su forma activa, el 5-FdUMP, compuesto análogo al ácido 2'-desoxiuridílico. Este falso sustrato bloquea la metilación del sustrato natural, impidiendo la obtención de ácido timidílico.

El 5-FdUMP es un inhibidor suicida, ya que antes de inhibir la enzima necesita ser activado por esta misma mediante el ataque nucleofílico del residuo de cisteína del centro activo.

La reacción comienza con la unión de forma covalente del 5-FdUMP en la misma zona de la TS a la que se uniría el sustrato natural. Esta unión desencadena un cambio de conformación en la enzima que permite la unión del cofactor, formándose un complejo ternario estable (5-FdUMP-TS-THF). El siguiente paso es la generación de un enlace covalente entre el THF y el esqueleto de uracilo a través de la unidad de metileno, la cual es normalmente transferida al uracilo, no siendo así en este caso. En este punto el resto básico no puede actuar al encontrar en 5 un átomo de flúor, en vez del protón esperado. La reacción no puede

continuar ya que conllevaría la salida del flúor en forma de ión positivo, siendo este demasiado electronegativo para que esto ocurra.

Como resultado, el esqueleto de 5-FU queda unido covalente e irreversiblemente al sitio activo de la enzima. Al quedar inhibida la TS, se interrumpe la biosíntesis de ácido timidílico, lo que impedirá la síntesis de ADN y posteriormente la replicación y la división celular. (Figura 5)

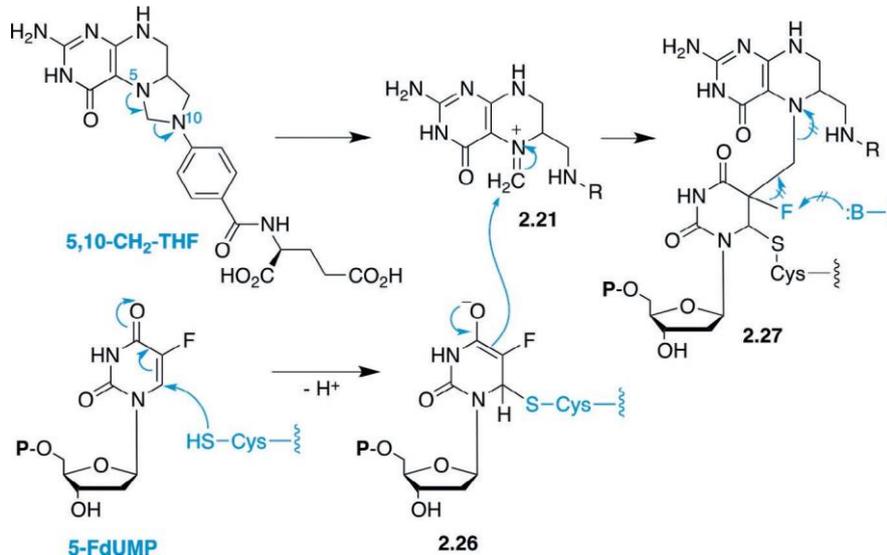


Figura 5: Mecanismo de inhibición de la TS por el 5-FdUMP, el metabolito activo del 5-FU.

Estructura

Tanto el 5-FU como la Fluxuridina son profármacos. En el organismo son transformados en su forma activa, análoga al ácido 2'-desoxiuridílico. La analogía se debe a la sustitución del hidrógeno de la estructura del dUMP, por el fluor presente en el 5-FdUMP. Estos elementos tienen un radio de Van de Waals similar (F: 1,47 Å/ H: 1,20 Å), por lo que se consideran isósteros. El átomo de fluor es fundamental para su actividad, y además optimiza su acción por tres razones:

- Aumenta la afinidad del fármaco por la enzima (en comparación con el sustrato natural), ya que aumenta la acidez del hidrógeno en posición 3 y favorece la interacción por enlace de hidrógeno con la enzima.
- Aumenta la electrofilia del C en posición 6, favoreciendo el ataque nucleofílico por la TS.
- Aumenta la estabilidad del complejo ternario, ya que hace imposible el ataque básico.

Asimismo la administración del 5-FU en forma de profármaco supone una ventaja, ya que los nucleótidos a pH fisiológico se encuentran ionizados y no penetran bien en las células, además son degradados a nucleósidos por las fosfatasa.

Aplicación terapéutica y posología

Son dos quimioterápicos del grupo de las fluoropirimidinas usados ampliamente para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

La Floxuridina suele usarse en infusión continua intaarterial para tratar la metástasis hepática del cáncer de colon. Actúa en tumores sólidos como: el de hígado, el adenocarcinoma gastrointestinal y el CCR. Se encuentra disponible en viales de 500mg para su reconstitución. La administración por infusión directamente en la arteria hepática, de una dosis de entre 0,1 a 0,6 mg/kg/día, evita el efecto de primer paso hepático, impidiendo a su vez la aparición de efectos adversos sistémicos que pueden ser graves (10). Además, su baja biodisponibilidad oral, por su estructura de nucleósido, hace que la inyección arterial sea la forma más adecuada.

El 5-FU tampoco tiene buena absorción oral, por lo que su administración se realiza por vía intravenosa. Es dado habitualmente junto a ácido folínico en el tratamiento de CCR y otros tipos de tumores sólidos, incluyendo el cáncer de mama y los gastrointestinales.

De manera tópica es muy útil para el cáncer de piel ya que tiene una alta selectividad para las células cancerosas de la piel con respecto a las normales. (2)

Sus efectos secundarios son la neuro y cardiotoxicidad. Una infusión continua puede causar diarrea, es la toxicidad dosis-limitante más común. Para prevenirla se han propuesto varias formulaciones que contienen la sal potásica del ácido oxónico (oteracil potasio), un potente inhibidor de la fosforribosilación del 5-FU en la mucosa gastrointestinal, impidiendo así su bioactivación en el intestino.

Disminución de la eficacia clínica

Varios mecanismos pueden alterar la eficacia clínica del 5-FU, disminuyendo su actividad citotóxica en las células diana y por tanto su acción antitumoral.

1. **Disminución de la incorporación del 5-FUTP en el ARN.** La alta concentración intracelular de UTP hace que compita con el 5-FUTP para su incorporación, disminuyéndola.
2. **Aumento de la expresión de la TS:** La formación del complejo ternario (TS-FdUMP-CH₂-THF) induce a la expresión de TS por la inhibición de un mecanismo *feed-back* negativo.
Normalmente la TS se une a su propio mRNA, e inhibe el proceso de traducción. Este mecanismo es impedido por la formación del complejo ternario, que no es capaz de unirse a su mRNA, lo que lleva a un aumento de expresión de TS, y a lo que vendría a ser un posible mecanismo de resistencia (6).
3. **Aumento intracelular de dUMP:** La inhibición de la TS lleva a un aumento intracelular de dUMP que compite con el 5-FdUMP para unirse al sitio activo de la enzima.

Modulación de la actividad

- **Disminuir la degradación del 5-FU**

La mayor parte del 5-FU administrado es degradado en el hígado por la dihidropirimidina deshidrogenasa. Esta enzima reduce el doble enlace del 5-FU transformándolo en

dihidrofluorouracilo (DHU), un metabolito inactivo. Éste no puede dar lugar a la adición de Michael con la zona nucleofílica del centro activo de la TS.

Se han desarrollado tres posibles alternativas para impedir que esto ocurra:

1. **Administración junto con uracilo** para aumentar la vida media de los derivados de 5-FU. El uracilo es el sustrato natural de la DPD, por lo que, administrado en grandes cantidades, satura la enzima e impide la degradación del fármaco. Es un inhibidor competitivo. (Figura 6) Un ejemplo de esta estrategia es el **UFT**. Es una fluoropirimidina de administración oral, formada por la combinación del tegafur, profármaco del 5-FU, y el uracilo en una relación molar fija de 4:1. Esta estrategia se usa para el tratamiento de primera línea de cáncer colorrectal en combinación con folinato cálcico (Leucovorina) en un fármaco llamado **Orzel** (11). Este fármaco, sin embargo, aunque es bien tolerado, no es eficaz para el tratamiento de otros cánceres como el carcinoma avanzado del tracto biliar (12).

2. **Administración conjunta de inhibidores de la DPD y 5-FU o UFT**. El procedimiento sería similar al caso anterior, pero de esta manera la enzima quedaría inhibida, no saturada. Entre los inhibidores de la DPD encontramos: 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina (CDHP; Gimeracilo, Gimestat) y 5-etiniluracilo (Eniluracilo). (Figura 6)

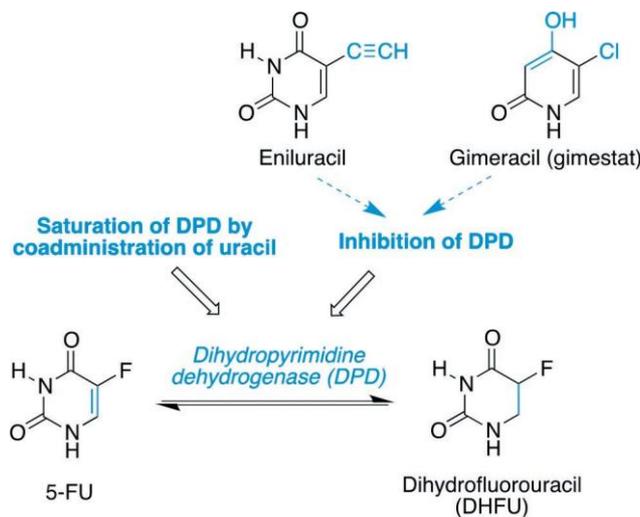


Figura 6: Combinación de fármacos encaminada a la disminución de la degradación de 5-FU.

3. Se diseñó un fármaco que fuese a la vez un **profármaco del 5-FU y un inhibidor de la DPD** simultáneamente, el Emitefur (BOF-A2). Demostró toxicidad, severa en algunos pacientes, por lo que se descartó.

- **Mejorar la inhibición de la TS por el 5-FU**

Para la formación del complejo ternario es necesaria la presencia de del cofactor 5,10-metilen-THF. Se administra en forma de **Leucovorina** (LV), 5- formiltetrahidrofolato.

Entra en la célula a través del transportador de folatos en su forma reducida, y es metabolizada inmediatamente a 5,10-metilenil-THF. Este compuesto sufre una reducción de la función iminio mediada por el NADPH para dar 5,10-metilen-THF, uno de sus metabolitos intracelulares (Figura 7). La administración concomitante de este cofactor y el 5-FU mejora la citotoxicidad de este en muchos tipos celulares. Se utilizan diferentes regímenes y diferentes dosis, sin que se haya demostrado que ninguna de ellas sea la óptima (13).

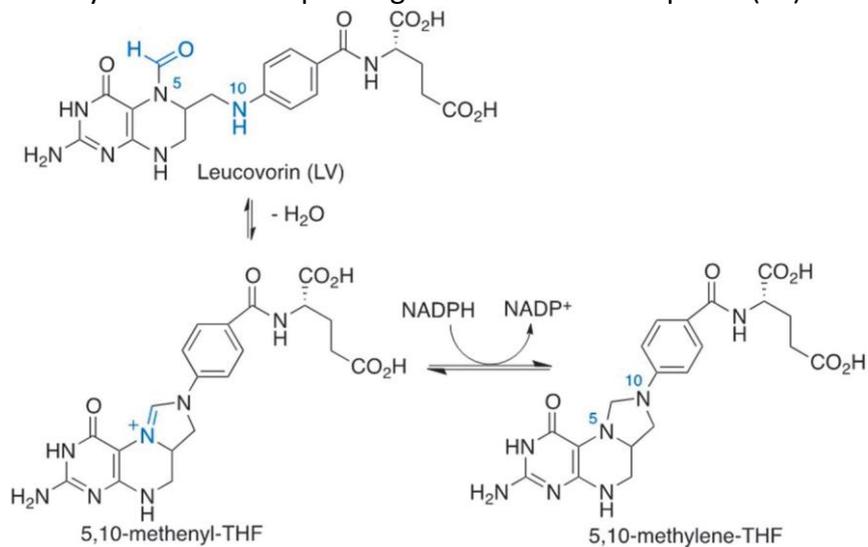


Figura 7: Biotransformación de LV en 5,10-metilen-THF.

El **Folfirinox**, contiene LV y 5-FU, junto con irinotecan y oxoplatino. Estudios preclínicos han demostrado que el irinotecan tiene cierta actividad sinérgica cuando es administrado antes del 5-FU y la LV. Se usa para tratar el cáncer pancreático metastásico. Este tipo de cáncer, en 2010 en Estados Unidos fue la cuarta causa de muerte. Era previamente tratado con Gemcitabina (análogo a nucleósido con el anillo de ribosa modificado), ya que daba buenos resultados. El tratamiento con Folfirinox tiene mayor tasa de supervivencia aunque mayor toxicidad (14).

- **Mejorar la activación del 5-FU**

La dihidrofolato reductasa (DHFR) es una enzima que reduce el DHF a THF. Su inhibición impide la continuación del ciclo del timidilato, ya que es fundamental para la recuperación del cofactor de la TS.

El **Metotrexato** es un inhibidor clásico de la DHFR. Su estructura es similar a la del ácido fólico, por lo que ambos compiten para unirse a la misma zona en el centro activo de la enzima. Los puntos de unión que establecen son los mismos, pero los tipos de enlace que se disponen en dichos puntos varían, ya que ambas moléculas se acoplan de manera diferente. De esta forma se bloquea la obtención de THF, necesario para la síntesis de purinas. Al no poder sintetizarse estas últimas, el fosforibosil pirofosfato (necesario para la bioactivación del 5-FU) se acumula, facilitando ese paso de la bioactivación del 5-FU. El tratamiento con Metotrexato antes de la administración del 5-FU mejora la actividad antitumoral (Figura 8). Clínicamente esta combinación no siempre ha mostrado un aumento de actividad antitumoral. Sin embargo, en estudios en fase II, ha demostrado beneficio clínico en pacientes con CCR, en uso conjunto con LV. (6)

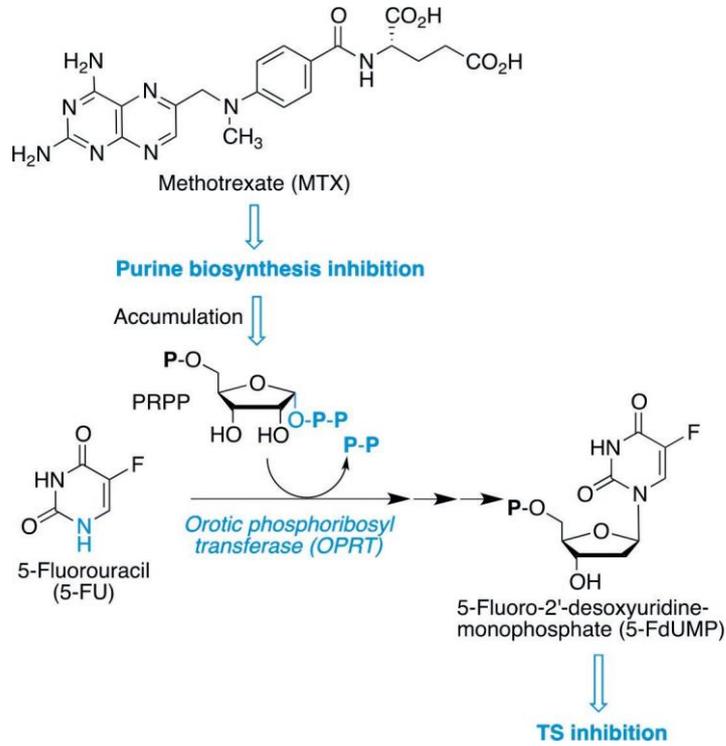


Figura 8: Estrategia para mejorar la activación del 5-FU.

Problemas farmacocinéticos

La estructura del 5-FU favorece la asociación por medio de enlaces intermoleculares y la formación de **redes cristalinas muy estables**. Esto hace que presente una baja solubilidad acuosa, lo que impide su uso por vía oral y dificulta la vía intravenosa. Para mejorar su solubilidad se han diseñado profármacos en los que se disminuye la estabilidad de la red cristalina.

6.2.2. PROFÁRMACOS

6.2.2.1. Tegafur (Ftorafur)

Este profármaco se absorbe completamente a través del tracto gastrointestinal, donde se puede bioactivar siguiendo dos rutas (Figura 9):

- Oxidación por citocromo P-450: conlleva la hidroxilación del C5 del tetrahidrofurano por el citocromo, seguida por la descomposición espontánea a aldehído succínico y 5-FU.
- Activación por fosforilasas: mediante el ataque de la pirimidina nucleósido fosforilasa dando 2-tetrahidrofuril fosfato y 5-FU.

Lleva usándose en clínica desde 1967, cuando fue aprobado por la FDA. Sin embargo, debido a cierta toxicidad cardíaca y digestiva, fue reemplazado por la combinación de éste con otros inhibidores enzimáticos. Por ejemplo el **UFT**, previamente mencionado, y el **S-1**, que contiene Tegafur, Oteracil potasio y Gimestat.

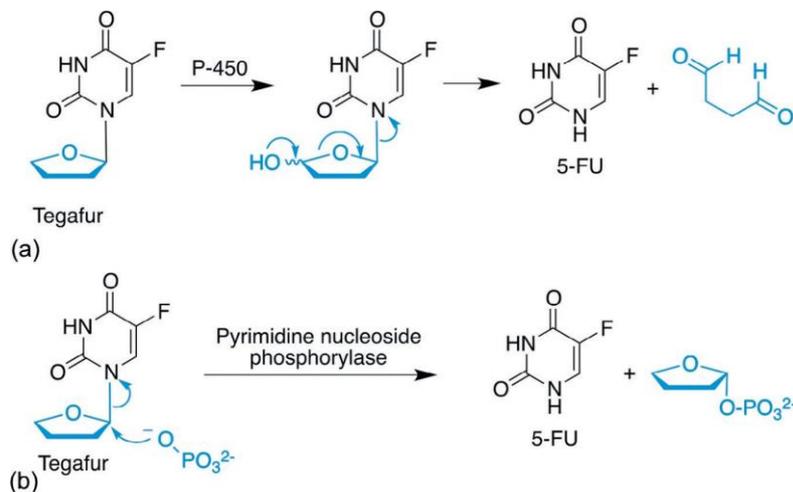


Figura 9: Bioactivación de Tegafur.

6.2.2.2 Doxifluridina

Es la 5'-desoxi-5-fluorouridina. Su bioactivación está basada en la presencia de mayor cantidad de timidina fosforilasa (TP), una enzima hidrolítica, en ciertos tumores sólidos, como el colorrectal, el de pecho y el de riñón, en comparación con los tejidos normales. (Figura 10)

Causa toxicidad renal por la liberación indeseada de 5-FU en el intestino, mediante la acción de una fosforilasa intestinal.

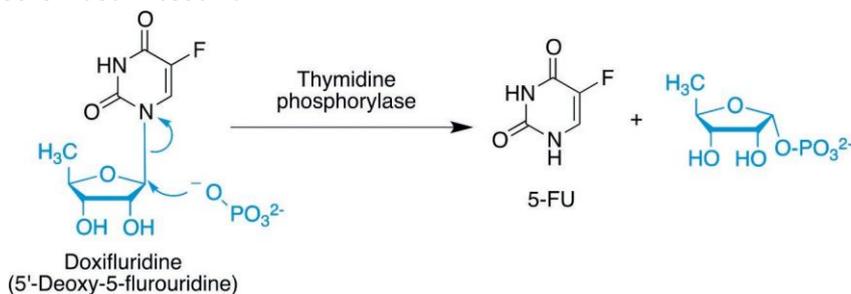


Figura 10: Bioactivación de la Doxifluridina.

6.2.2.3 Capecitabina

Para evitar la toxicidad gástrica se diseñó la capecitabina, carbamato de fluoropirimidina (Xeloda). Se bioactiva mediante un proceso en cascada mediado por tres enzimas, y es selectiva de las células tumorales, ya que el último paso se desarrolla de manera mucho más eficiente en ellas, de tal manera que el 5-FU es liberado selectivamente en el tumor.

Después de su administración oral, el profármaco es absorbido sin ser alterado en el hígado, gracias a la cadena de pentiloxicarbonil, que aumenta su lipofilia. Allí es metabolizado por la carboxiesterasa, en 5'-desoxi-5-fluorocitidina, que a su vez es transformada en 5-desoxi-5-fluorouridina por la citidina desaminasa. La timidina fosforilasa (TP) lo convierte finalmente en 5-FU.

Este último paso es 10 veces más efectivo en los tumores, ya que la TP se expresa en concentraciones significativamente mayores en las células cancerosas, en comparación con el tejido normal circundante (Figura 11). Esto implica un aumento de la concentración intratumoral del fármaco y una disminución de la toxicidad en el resto del organismo.

La Capecitabina está indicada como tratamiento de primera línea en pacientes con CCR metastásico. Fármacos como Paclitaxel, Docetaxel, y Ciclofosfamida aumentan la cantidad de TP, facilitando la transformación de la capecitabina en 5-FU.

La combinación de Capecitabina y Docetaxel se usa para el tratamiento de cáncer de mama. El uso junto a la terapia con platino fue aprobado por la EMA para el tratamiento de cáncer de estómago avanzado.

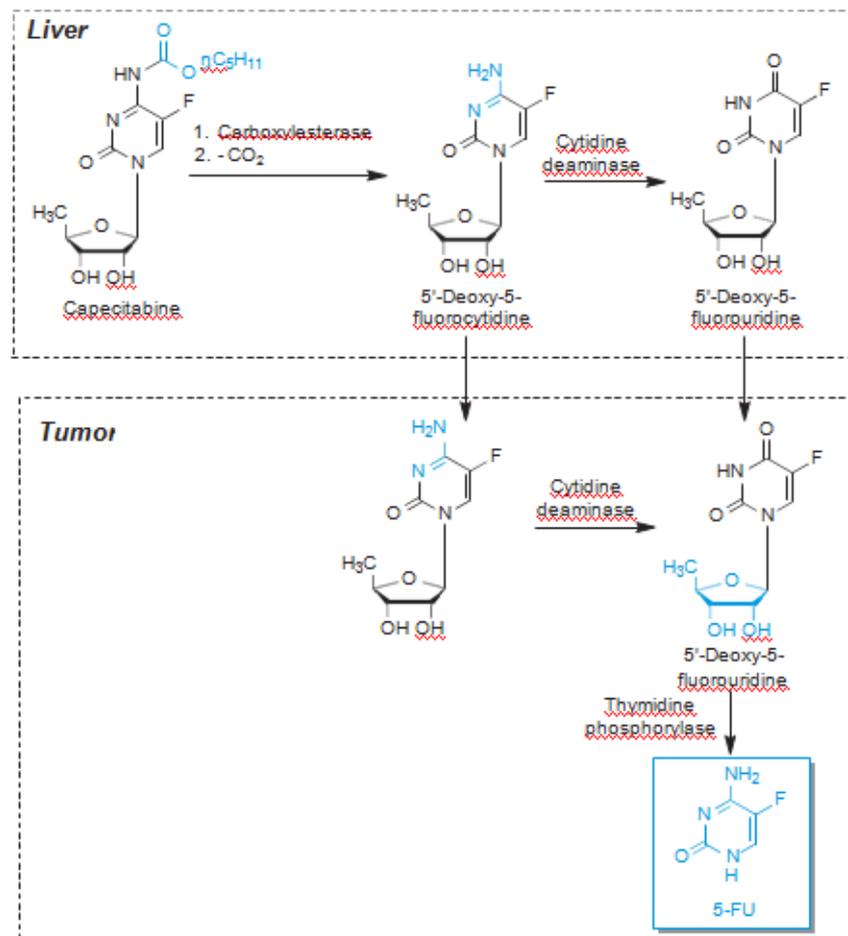


Figura 11: Bioactivación de la Capecitabina.

6.2.2.4 5-FP

La 5-fluoro-2-pirimidinona es otro profármaco del 5-FU. Es activado por una aldehído oxidasa hepática (Figura 12), presente en altas concentraciones en el hígado, pero no en el tracto gastrointestinal. La administración puede ser oral o intravenosa (15).

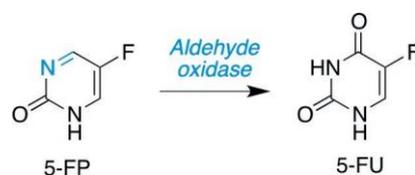


Figura 12: Bioactivación del 5-FP.

6.2.2.5 Emitefur

El Emitefur (BOF-A2) se diseñó como intento de modulación de la actividad del 5-FU, de tal manera que disminuyese su degradación. Se trata de la asociación de 5-FU y un inhibidor de la DPD, la 5-ciano-6-dihidropiridin-2(1H)-ona, en un ratio 1:1.

Se bioactiva mediante dos reacciones de hidrólisis consecutivas que liberan el fragmento inhibidor de la DPD y una tercera hidrólisis, seguida por la pérdida de dos moléculas de acetaldehído, dando lugar al 5-FU. De esta manera se evita la liberación simultánea de grandes concentraciones, además, al impedir la formación de metabolitos del 5-FU, se disminuye su toxicidad (Figura 13). Entró en ensayos clínicos para el tratamiento del CCR, pero mostró toxicidad grave en algunos pacientes.

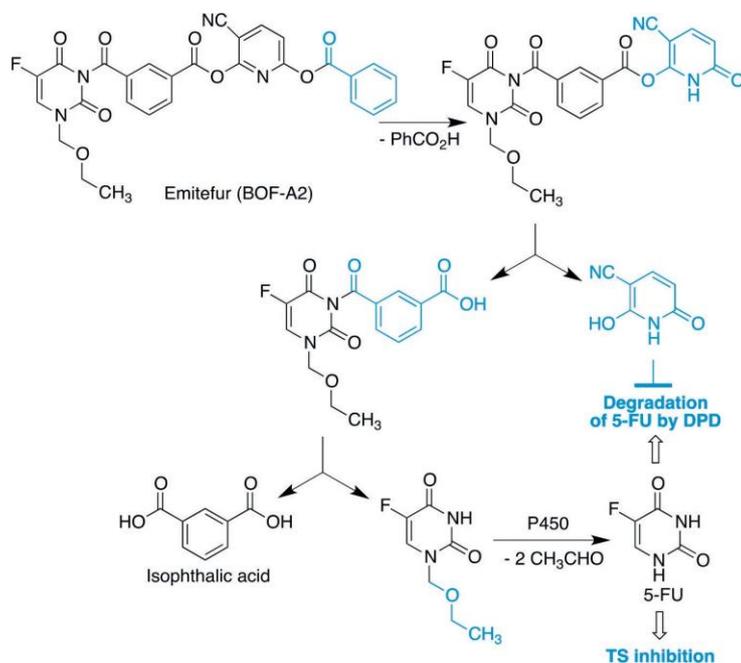
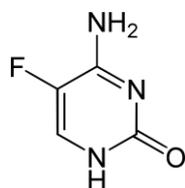


Figura 13: Bioactivación del Emitefur.

6.2.2.6 Flucitosina

Aunque es un profármaco del 5-FU, se usa como antifúngico. Entra en las células del hongo a través de una proteína de transporte. La enzima necesaria para su bioactivación es la citosina desaminasa, que no existe en mamíferos, pero sí se encuentra en los hongos.



6.2.3 ANÁLOGOS DEL 5-FU

6.2.3.1 Trifluridina

La trifluorotimidina es un profármaco que se bioactiva por fosforilación:

- La forma **trifosforilada** es inhibidor reversible competitivo de la ADN polimerasa vírica. Actúa incorporándose al ADN viral, por lo que se usa como tratamiento en la queratitis herpética ocular, en la que la córnea se ve afectada por el virus herpes simple.
- En su forma **monofosforilada** es inhibidor irreversible suicida de la TS.

Mecanismo de inhibición de la TS

Tras la acción de una quinasa, la TFT queda monofosforilada. La reacción comienza con el ataque nucleofílico del residuo de cisteína al doble enlace, generándose un anión enolato. Este intermediario facilita la salida de un átomo de fluor, quedando así el TFT transformado en una especie altamente electrófila. Ésta a su vez es atacada por el residuo de tirosina-146 del sitio activo de la TS, volviéndose a perder HF por segunda vez. Finalmente el ataque con una molécula de agua, junto a la liberación de HF, lleva al producto final (Figura 14).

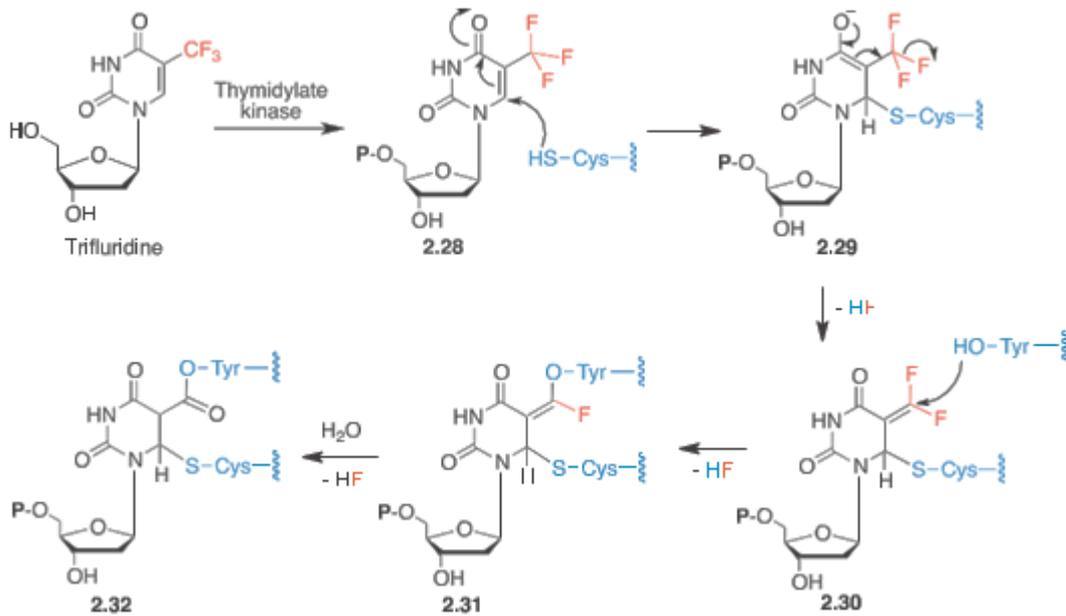


Figura 14: Mecanismo de inhibición de la TS por la Trifluridina.

Al administrarse por vía oral la trifluridina sufre el metabolismo de primer paso hepático por la timidina fosforilasa. Esta enzima la inactiva al transformarla en 5-trifluorometiluracilo. La TFT se asocia con Tipiracil, un inhibidor de la timidina fosforilasa (Figura 15). La finalidad es impedir su degradación y aumentar, por tanto, la duración de la acción. Esta asociación se conoce como **TAS-102** (Lonsurf), y se encuentra actualmente aprobado por la EMA para el tratamiento de pacientes adultos con CCR metastásico previamente tratados, o que no son candidatos a los tratamientos disponibles (16). Actualmente está sujeto a seguimiento adicional.

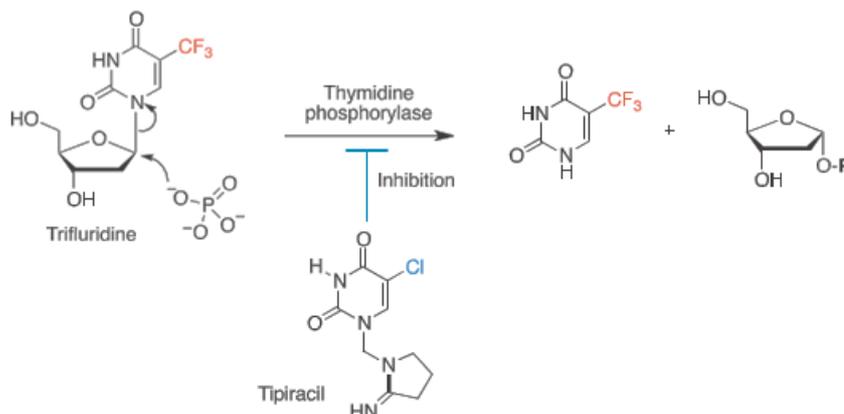


Figura 15: Base de la asociación Tipiracilo y Trifluridina.

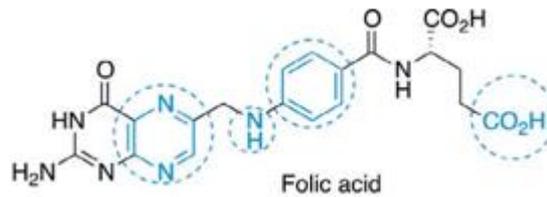
6.3. INHIBIDORES ANÁLOGOS AL ÁCIDO FÓLICO

Hasta ahora nos hemos referido a las fluoropirimidinas, fármacos que inhiben la TS de manera inespecífica. Esta falta de especificidad es debida principalmente a que los nucleótidos fluorados:

- Pueden afectar a otras rutas, especialmente las relacionadas con el ARN.
- Inducen a la acumulación de dUMP que compite con ellos para la unión en la misma zona de la TS.

Ésto ha traído consigo el desarrollo de inhibidores que reconocen específicamente el sitio de unión del cofactor, es decir, de los folatos, y se unen a él para inhibir la enzima.

La manipulación de la estructura del ácido fólico ha llevado a varios compuestos, cuatro de ellos ya se usan en clínica o están siendo evaluados en fases avanzadas de los ensayos clínicos (Raltitrexed, Pemetrexed, Nolatrexed, Plevitrexed) mientras que otros no llegaron a superar todas las fases de los ensayos.



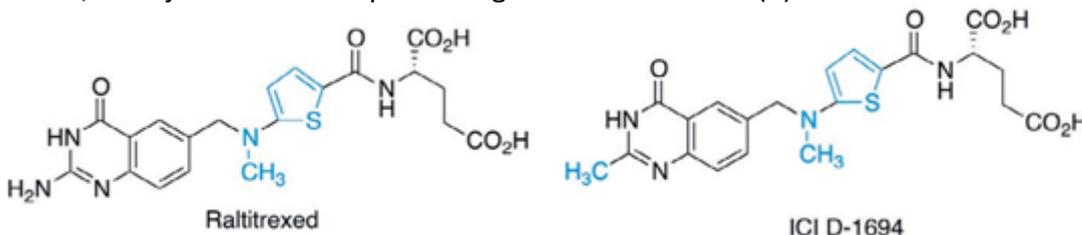
6.3.1 RALTITREXED

Fue el primero en ser aprobado por la FDA en 1998 y en ser usado en clínica para el tratamiento de CCR. Es el cabeza de serie de este tipo de fármacos. Tiene una estructura similar al ácido fólico, pero en él se reemplazó el anillo de pteridina por una quinazolina y el anillo de benceno por uno de tiofeno.

El Raltitrexed llega al interior celular mediante un transportador de folatos reducidos (RFC), una vez en el interior, la folipoliglutamato sintetasa (FPGS) actúa transformando el residuo terminal del glutamato en poliglutamato. De esta manera es más potente como inhibidor enzimático ya que es retenido en el interior celular. La poliglutamación es un proceso dependiente del tiempo y de la concentración que ocurre en las células tumorales y, en menor medida, en tejidos normales, lo que causa su toxicidad. Los metabolitos poliglutamados poseen una semivida intracelular más larga que se traduce en una acción del fármaco prolongada en las células malignas.

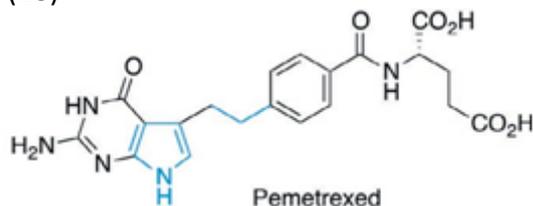
Se usa en el tratamiento de CCR avanzado con eficacia parecida al fluorouracilo combinado con folinato.

Parecido al Raltitrexed encontramos el **ICI D-1694**. En el que se sustituyó el metilo por el grupo amino. A pesar de mostrar buenos resultados en las fases tempranas de los estudios clínicos, su baja solubilidad a pH fisiológico limitaba su uso (6).



6.3.2 PEMETREXED

Es un fármaco multidiana. Inhibe la TS además de otras enzimas dependientes de folatos, como la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (GARFT), que son enzimas clave para la biosíntesis *de novo* de los nucleótidos de timidina y purina (17). Su actividad también depende del RFC y FPGS. Usado en mesotelioma y cáncer no microcítico de pulmón (18).



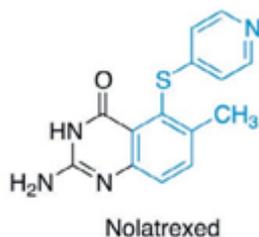
6.3.3 PLEVITREXED

Este compuesto difiere de los anteriores en cuanto a su estructura. Tiene un grupo metilo en el C-7 que mejora la unión a la enzima, mientras que el átomo de fluor, mejora su función. La adición de un γ -carboxipropiltetrazol (isómero del grupo ácido del glutámico), impide la poliglutamación y aumenta la lipofilia. Este fármaco inhibe la TS en su forma no poliglutamada, por lo que frente a las anteriores tiene la ventaja de ser activo en caso de que la FPGS se encontrase inactiva. Su actividad depende únicamente del RFC.



7 NOLATREXED

Estructuralmente es el inhibidor menos parecido a los folatos. Accede a la célula mediante difusión pasiva, no depende del RFC. Requiere infusión prolongada ya que no queda retenido en el interior celular al no ser sustrato de FPGS. De esta manera evita los posibles mecanismos de resistencia que podían limitar la actividad de los fármacos antifolato clásicos. Durante los estudios en fase II mostró actividad en pacientes con carcinoma hepatocelular, y otros tipos de cáncer. A pesar de que la FDA se negó a aprobar su uso, en 2005 la EMA lo aceptó como fármaco huérfano para el tratamiento de carcinoma hepatocelular, uno de los cánceres más comunes a nivel mundial. Suele ser diagnosticado en un estado avanzado, cuando la mayoría de terapias curativas ya no es eficaz. Además es resistente a la quimioterapia convencional, lo que hace que no haya muchas opciones y por lo que el desarrollo de nuevos tratamientos es necesario (19).



7. CONCLUSIONES

La química farmacéutica comprende la búsqueda, el análisis y el estudio de la correlación entre la estructura molecular y los atributos bioactivos de cada molécula. El conocimiento los mecanismos de acción a nivel molecular es fundamental para el diseño de nuevos fármacos. En este trabajo se puede concluir que existen gran cantidad de posibilidades relacionadas con la modificación de las moléculas que inhiben la TS, ya sea directa o indirectamente. Pequeñas variaciones en su estructura química permiten el tratamiento de diversos tipos de cáncer, muy distintos entre ellos.

La TS es una enzima esencial para el proceso de síntesis del ADN y por tanto clave para impedir la multiplicación descontrolada de la célula tumoral. Gran cantidad de fármacos antitumorales realizan esta función mediante dos mecanismos principalmente.

En primer lugar están los inhibidores que se sitúan en el centro activo de la TS, en la zona de unión del sustrato natural (dUMP). En este grupo se encuentra el 5-FU, profármaco considerado cabeza de serie. Su vida media, demasiado corta, afecta a su eficacia y toxicidad, de tal manera que su administración debe realizarse en infusión intravenosa continua. Aun así sigue siendo un fármaco ampliamente usado para muchos tipos de cáncer. En el desarrollo de los antitumorales diseñados a partir del 5-FU, se ha tratado de paliar la toxicidad y de aumentar la eficacia mediante distintas estrategias. Además, algunos de ellos han conseguido ser formulados de tal manera que puedan ser administrados por vía oral, facilitando así la adherencia y por tanto mejorando los resultados de la terapia, como es el caso de la Capecitabina y Tegafur entre otros.

En segundo lugar están los inhibidores análogos al ácido fólico. Se unen a la zona del centro activo donde se sitúa el cofactor, inhibiendo la TS de manera indirecta. Muchos de ellos se encuentran en distintas fases de los ensayos clínicos, mientras que otros como Raltitrexed y Pemetrexed se usan actualmente.

Todos ellos, junto a los que se encuentran en desarrollo son y serán una herramienta fundamental para tratar una enfermedad tan compleja como es el cáncer, ya que interactúan con una enzima esencial para evolución de este.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Sitio web de la OMS. [Online]. [Fecha de consulta: 2020 Abril 04]. Disponible en: <https://www.who.int/cancer/about/facts/es/>.
2. Patrick GL. An Introduction to Medical Chemistry. 5th ed.: Oxford; 2013.
3. LW Hardy. Atomic structure of thymidylate synthase: target for rational drug design. Science. 1987 January; 235.
4. Santi CWCaDV. The catalytic Mechanism and Structure of Thymidylate Synthase. Annual Review Biochemistry. 1995; 64: 721-762.
5. Real Academia de Ingeniería. DEI. [Online]. [Fecha de consulta: 2020 Abril 05]. Disponible en: <http://diccionario.raing.es/es/lema/timidilato-sintasa>.
6. Carmen Avendaño JCM. Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. 2nd ed.: Elsevier Science Ltd;

- 2015.
7. Matthew A. Schaich. Structures of DNA Polymerase Inserting Therapeutic Nucleotide Analogues. *Chemical Research in Toxicology*. 2017 September;(10.1021).
 8. E. FARCZÁDI. Changes in Apoptotic and Mitotic Index, bcl2, and p53 Expression in Rectum Carcinomas after Short-Term Cytostatic Treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006 January.
 9. FRANK GANSAUGE . p53 in Relation to Therapeutic Outcome of Locoregional Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006 February.
 10. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. [Online].; 2018 Feb 2 [Fecha de consulta: 2020 05 08. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548421/.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548421/)]
 11. Everett E. Vokes HMG. *Oncologic Therapies*. second edition ed.: Springer Science & Business Media; 2011.
 12. Division of Hematology-Oncology, Department of Internal Medicine and Department of Surgery, Chang Gung. A Phase II Trial of Tegafur-Uracil Plus Leucovorin (LV) in the Treatment of Advanced Biliary Tract Carcinomas. *Jpn J Clin Oncol*. 2003; 33: 353–356.
 13. AEMPS. CIMA. [Online]. [Fecha de consulta: 2020 05 09. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/70340/FT_70340.html.]
 14. Conroy . FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2011;(364: 1817-1825).
 15. XinGuoa, MaryLerner TS. 5-fluoro-2-pyrimidinone, a liver aldehyde oxidase-activated prodrug of 5-fluorouracil. *Biochemical Pharmacology*. 1995 April; 49(8).
 16. Sociedad Española de Oncología Médica. INFORME SEOM DE EVALUACIÓN DE FÁRMACOS. [Online]. [Fecha de consulta: 2020-05-10. Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/Informes_SEOM/IPT_Trifluridina_Tipiracil.pdf.]
 17. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. CIMA. [Online]. [Fecha de consulta: 2020-05-10. Disponible en: [CIMA https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/81924/FT_81924.html#5-propiedades-farmacologicas.](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/81924/FT_81924.html#5-propiedades-farmacologicas.)]
 18. Villa Luis F, *Medimecum* (2019).
 19. MA Avila. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2006.