



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Tamizado virtual aplicado a la búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos activos en el modelo de 6 Hz***

---

**Tesista: Farm. Sofía Goicoechea**

**Director: Dr. Luis E. Bruno-Blanch**

**Codirectora: Dra. Carolina L. Bellera**

**Año: 2020**



# Trabajo de Tesis Doctoral



Tesista: Farm. Sofía Goicoechea

Director: Dr. Luis E. Bruno-Blanch

Codirectora: Dra. Carolina L. Bellera

Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos (LIDeB)  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Facultad de Ciencias Exactas  
Universidad Nacional de La Plata

2020





## Agradecimientos

A mi director, Luis Bruno Blanch, por sus consejos y por aceptar a que dé inicio en este largo camino.

A mi codirectora, Carolina Bellera, que estuvo inigualablemente en cada momento, con su inmensurable paciencia, para poder lograr cada objetivo de este trabajo de tesis. ¡Gracias!

A mi mentora de inicio, Andrea Enrique, que me demostró lo lindo de trabajar juntas “en la mesada” y, de compartir risas y charlas.

A mis compañeros de LIDeB, aquellos que aún hoy están y aquellos que estuvieron de paso, por hacer de cada momento una enseñanza.

A Alan Talevi, por enseñarme que siempre se puede ir hacia adelante y por su dedicación y confianza.

A Malala Sbaraglini y Sara Chuguransky, por su colaboración con los ensayos animales y por las largas charlas de bioterio.

A Esperanza Ruiz, por su ayuda con el tratamiento estadístico.

A la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP y CONICET, por brindar todos los recursos posibles para mi formación profesional.

A mi familia y amigos que me apoyan incondicionalmente en cada paso que doy.

A mis compañeros de todos los días, Fran y Lolo.



# Índice

## ABREVIATURAS

---

## BREVE INTRODUCCIÓN

---

### **CAPÍTULO 1: EPILEPSIA** **1**

---

<b>1.1. GENERALIDADES</b>	<b>1</b>
1.1.1. CONTEXTO HISTÓRICO	1
1.1.2. DEFINICIÓN	2
1.1.3. CAUSAS	3
<b>1.2. CLASIFICACIÓN DE LA EPILEPSIA</b>	<b>5</b>
<b>1.3. CLASIFICACIÓN DE LAS CRISIS</b>	<b>7</b>
1.3.1. CRISIS FOCALES	8
1.3.2. CRISIS EPILÉPTICAS GENERALIZADAS	9
1.3.3. ESTADO EPILÉPTICO	9
<b>1.4. EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>9</b>
1.4.1. INCIDENCIA Y PREVALENCIA	9
1.4.2. MORTALIDAD Y COMORBILIDAD	10
<b>1.5. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO</b>	<b>12</b>
1.5.1. DIETA CETOGÉNICA (DC)	12
1.5.2. ESTIMULACIÓN DEL NERVIOS VAGO (ENV)	13
1.5.3. ESTIMULACIÓN CEREBRAL PROFUNDA	14
1.5.4. ESTIMULACIÓN MAGNÉTICA TRANSCRANEAL (EMT)	14
1.5.5. CIRUGÍA	14
<b>1.6. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO</b>	<b>15</b>
<b>1.7. REFERENCIAS</b>	<b>16</b>

### **CAPÍTULO 2: FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS** **22**

---

<b>2.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>22</b>
2.1.1. INTRODUCCIÓN DE LOS FAES EN EL MERCADO	22
2.1.2. ESTADO ACTUAL DE LOS FAES	27
<b>2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS FAES</b>	<b>29</b>
2.2.1. FÁRMACOS DE PRIMERA GENERACIÓN	29
2.2.2. FÁRMACOS DE SEGUNDA GENERACIÓN	29
2.2.3. FÁRMACOS DE TERCERA GENERACIÓN	30
<b>2.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS</b>	<b>30</b>
2.3.1. MODULACIÓN DE CANALES IÓNICOS OPERADOS POR VOLTAJE	33
2.3.2. MODULACIÓN DE CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR LIGANDO	36
2.3.3. MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE RECEPTORES ASOCIADOS A PROTEÍNAS G	40
2.3.4. MODULACIÓN DE TRANSPORTADORES/RECAPTACIÓN DE NEUROTRANSMISORES	41
2.3.5. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROTEÍNAS PRESINÁPTICAS	41
2.3.6. MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS PRESINÁPTICAS	44
2.3.7. OTROS MECANISMOS	44

<b>2.4. REFERENCIAS</b>	<b>46</b>
<b><u>CAPÍTULO 3: MODELOS ANIMALES</u></b>	<b><u>55</u></b>
<b>3.1. EVALUACIÓN DE ANTICONVULSIVOS EN MODELOS ANIMALES</b>	<b>55</b>
<b>3.2. BUENAS PRÁCTICAS DE BIENESTAR ANIMAL EN MODELOS ANIMALES</b>	<b>60</b>
<b>3.3. MODELOS DE CONVULSIONES AGUDAS</b>	<b>62</b>
3.3.1. MODELO DE MAXIMAL ELECTROSHOCK SEIZURE (MES)	63
3.3.2. MODELO DE CRISIS PARCIALES DE 6 HZ	64
3.3.3. MODELO DE PENTILENTETRAZOL SUBCUTÁNEO (PTZ SC.)	67
<b>3.4. MODELOS CRÓNICOS DE CRISIS INDUCIDAS</b>	<b>69</b>
<b>3.5. MODELOS CRÓNICOS DE EPILEPSIA</b>	<b>70</b>
<b>3.6. ENSAYO DE ROTOROD</b>	<b>72</b>
<b>3.7. TEST DE CHIMENEA</b>	<b>72</b>
<b>3.8. REFERENCIAS</b>	<b>73</b>
<b><u>CAPÍTULO 4: DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS</u></b>	<b><u>80</u></b>
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>80</b>
4.1.1. DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS ANTIEPILÉPTICOS	81
<b>4.2. CRIBADO VIRTUAL</b>	<b>84</b>
4.2.1. MÉTODOS BASADOS EN EL BLANCO MOLECULAR	86
4.2.2. MÉTODOS BASADOS EN EL LIGANDO	88
4.2.3. METODOLOGÍAS COMBINADAS	96
<b>4.3. REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS</b>	<b>96</b>
4.3.1. GENERALIDADES	96
4.3.2. MÉTODOS DE REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS	97
4.3.3. CASOS EXITOSOS EN ANTIEPILÉPTICOS	102
<b>4.4. ESTRATEGIA UTILIZADA EN ESTE TRABAJO DE TESIS</b>	<b>104</b>
<b>4.5. REFERENCIAS</b>	<b>104</b>
<b><u>CAPÍTULO 5: ESTRATEGIA COMPUTACIONAL Y VALIDACIÓN EXPERIMENTAL: METODOLOGÍA</u></b>	<b><u>112</u></b>
<b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>112</b>
<b>5.2. OBTENCIÓN DE MODELOS QSAR (FUNCIONES DISCRIMINANTES)</b>	<b>113</b>
5.2.1. COMPILADO DE LA BASE DE DATOS	113
5.2.2. PARTICIÓN DE LA BASE DE DATOS	116
5.2.3. CÁLCULO DE DESCRIPTORES MOLECULARES	120
5.2.4. MODELADO	121
<b>5.3. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS INDIVIDUALES</b>	<b>125</b>
5.3.1. VALIDACIÓN INTERNA	125
5.3.2. VALIDACIÓN EXTERNA	127
5.3.3. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MODELOS	127
5.3.4. CAMPAÑAS SIMULADAS DE SV	130
<b>5.4. COMBINACIÓN DE MODELOS</b>	<b>131</b>
<b>5.5. SELECCIÓN DE VALOR DE CORTE</b>	<b>133</b>

<b>5.6. CRIBADO VIRTUAL</b>	<b>134</b>
<b>5.7. DOMINIO DE APLICACIÓN</b>	<b>135</b>
<b>5.8. VALIDACIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>137</b>
5.8.1. ANIMALES	137
5.8.2. DROGAS	138
5.8.3. MODELO DE NEUROTOXICIDAD – ROTOROD	139
5.8.4. MODELO DE MES	139
5.8.5. MODELO DE PTZ	140
5.8.6. MODELO DE CRISIS DE 6 HZ	140
5.8.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS	142
<b>5.9. REFERENCIAS</b>	<b>142</b>

## **CAPÍTULO 6: ESTRATEGIA COMPUTACIONAL Y VALIDACIÓN EXPERIMENTAL: RESULTADOS**

**150**

<b>6.1. COMPILADO DE LA BASE DE DATOS</b>	<b>150</b>
<b>6.2. PARTICIÓN DE LA BASE DE DATOS</b>	<b>151</b>
<b>6.3. OBTENCIÓN DE LOS MODELOS</b>	<b>156</b>
6.3.1. CÁLCULO DE DESCRIPTORES MOLECULARES	156
6.3.2. SUBESPACIOS ALEATORIOS	156
6.3.3. GENERACIÓN DE LOS MODELOS	157
<b>6.4. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS INDIVIDUALES</b>	<b>158</b>
6.4.1. VALIDACIÓN INTERNA	158
6.4.2. VALIDACIÓN EXTERNA	159
6.4.3. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MODELOS	160
<b>6.5. COMBINACIÓN DE MODELOS</b>	<b>163</b>
6.5.1. CRIBADO VIRTUAL RETROSPECTIVO	164
<b>6.6. SELECCIÓN DEL VALOR DE CORTE</b>	<b>166</b>
<b>6.7. CRIBADO VIRTUAL PROSPECTIVO</b>	<b>167</b>
<b>6.8. VALIDACIÓN EXPERIMENTAL</b>	<b>171</b>
6.8.1. ENSAYO DE ROTOROD	171
6.8.2. MODELO DE CRISIS DE 6 HZ	172
6.8.3. ENSAYO MES	193
6.8.4. ENSAYO PTZSC	194
<b>6.9. REFERENCIAS</b>	<b>195</b>

## **CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES**

**202**

## **PUBLICACIONES, CONGRESOS Y BECAS**

**206**

## **MATERIAL SUPLEMENTARIO**

**209**

<b>ANEXO 1</b>	<b>209</b>
1.1. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS QUE CONFORMAN LA BASE DE DATOS.	209
1.2. ESTRUCTURAS DE COMPUESTOS INACTIVOS QUE CONFORMAN LA BASE DE DATOS.	212
<b>ANEXO 2</b>	<b>215</b>
<b>SCRIPTS UTILIZADOS</b>	<b>215</b>

2.1. SCRIPT UTILIZADO PARA EL MUESTREO DE 1.000 SUBESPACIOS ALEATORIOS DE 200 DESCRIPTORES CADA UNO	215
2.2. SCRIPT UTILIZADO PARA LA GENERACIÓN DE 1.000 MODELOS INDIVIDUALES	215
2.3. SCRIPT UTILIZADO PARA LA COMBINACIÓN DE MODELOS POR EL OPERADOR MÍNIMO	216
2.4. SCRIPT UTILIZADO PARA LA COMBINACIÓN DE MODELOS POR EL OPERADOR PROMEDIO	217
2.5. SCRIPT UTILIZADO PARA LA COMBINACIÓN DE MODELOS POR EL OPERADOR RANKING	218
2.6. SCRIPT UTILIZADO PARA LA COMBINACIÓN DE MODELOS POR EL OPERADOR VOTO	219
2.7. SCRIPT UTILIZADO PARA LA VALIDACIÓN CRUZADA (K-FOLD CROSS VALIDATION)	220
<b>ANEXO 3</b>	<b>220</b>
<b>ANEXO 4</b>	<b>226</b>

## Abreviaturas

**AC:** Anhidrasa carbónica  
**AMPA:** ácido  $\alpha$ - amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico  
**ASP:** Proyecto de Detección de Anticonvulsivos  
**BRV:** Brivaracetam  
**BZD:** Benzodiazepinas  
**DC:** Dieta Cetogénica  
**CBZ:** Carbamazepina  
**COX-2:** ciclooxigenasa 2  
**CYP:** citocromo P450  
**CZP:** Clonazepam  
**EEG:** Electroencefalograma  
**EMA:** Agencia Europea de Medicamentos  
**EMT:** Estimulación magnética transcraneal  
**ENV:** Estimulación del nervio vago  
**ESL:** Eslicarbazepina  
**ESM:** Etosuximida  
**ETSP:** Programa de Screening de la Terapia de Epilepsia  
**EZG:** Ezogabina  
**FAEs:** Fármacos Antiepilépticos  
**FBM:** Felbamato  
**FDA:** *Food and Drug Administration*  
**GABA:** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
**GABA<sub>A</sub>:** Receptores de GABA tipo A  
**GABA<sub>B</sub>:** Receptores de GABA tipo B  
**GABA<sub>C</sub>:** Receptores de GABA tipo C  
**GABA-T:** GABA transaminasa  
**GAD:** ácido glutámico descarboxilasa  
**GAT-1:** Transportador de GABA tipo 1  
**GBP:** Gabapentina  
**GLUT-1:** Transportador de glucosa tipo 1  
**ILAE:** *International League Against Epilepsy*  
**i.p.:** intraperitoneal  
**IV:** intravenosa  
**K<sub>Ca</sub>:** Canales de potasio activados por calcio  
**K<sub>V</sub>:** Canales de potasio voltaje-operados  
**LCM:** Lacosamida  
**LEV:** Levetiracetam  
**LTG:** Lamotrigina  
**mGluR:** Receptores metabotrópicos de glutamato

**MES:** *Maximal Electroshock Seizure*  
**NIH:** *National Institute of Health*  
**NMDA:** N-metil-D-aspartato  
**NT:** Neurotransmisores  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**OXC:** Oxcarbazepina  
**PA:** Potencial de acción  
**PB:** Fenobarbital  
**PGB:** Pregabalina  
**Pgp:** Glicoproteína P  
**PHT:** Fenitoína  
**PRM:** Primidona  
**PRP:** Perampanel  
**PTZ:** Pentilentetrazol  
**PTZsc:** Pentilentetrazol subcutáneo  
**RFM:** Rufinamida  
**RTG:** Retigabina  
**SE:** Status epiléptico  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**STP:** Estiripentol  
**SV:** Screening virtual, cribado virtual, tamizado virtual  
**SV2A:** Proteína 2A de la vesícula sináptica  
**TGB:** Tiagabina  
**TPM:** Topiramato  
**UGT:** Uridin-glucuronil transferasa  
**VGB:** Vigabatrina  
**VGSC:** canales de sodio voltaje-operados  
**VPA:** Ácido valproico  
**ZNS:** Zonisamida



## Breve Introducción

*La epilepsia es uno de los desórdenes neurológicos más comunes, afectando a alrededor de 50 millones de personas de todas las edades en todo el mundo. El 80% de los pacientes epilépticos pertenecen a países en vías de desarrollo. Pese a los múltiples esfuerzos por encontrar nuevos tratamientos para esta patología existe un 30% de pacientes que no logra controlar las convulsiones con la farmacoterapia disponible, lo cual se conoce como epilepsia refractaria o intratable (WHO, 2019).*

*A pesar de la introducción en el mercado farmacéutico de numerosos fármacos antiepilépticos (FAEs) de última generación, la proporción de pacientes refractarios no se ha modificado sustancialmente (Chen et al., 2018; Yoo & Panov, 2019) y algunos autores sugieren que incluso, se está incrementando (Lee et al., 2019).*

*La pérdida en la eficacia de dichos fármacos podría deberse a que, en su mayoría, han sido identificados mediante los mismos modelos animales convencionales de crisis epiléptica: el ensayo de Máximo Electroshock (Maximal Electroshock Seizure, MES) y el ensayo de Pentilentetrazol subcutáneo (PTZsc) (Löscher & Schmidt, 2011), ambos desarrollados hace más de 60 años. En los últimos tiempos, se ha incorporado al Programa de Screening de Fármacos Anticonvulsivos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (National Institute of Health, NIH), el modelo animal de crisis epiléptica de 6 Hz para el screening primario de nuevos fármacos antiepilépticos (Löscher, 2011). Esta incorporación no sólo es importante desde el punto de vista que aporta una evaluación adicional de compuestos candidatos a proteger frente a convulsiones psicomotoras similares a las observadas en la epilepsia límbica en humanos (Barton et al., 2001), sino que además es interesante destacar que el fármaco de uso clínico levetiracetam fue seleccionado a través de dicho modelo, pese a no ser eficaz frente a los modelos de MES y PTZsc. Precisamente, el levetiracetam posee un mecanismo de acción particularmente novedoso, ejemplificando de este modo cómo la implementación de nuevos modelos animales de epilepsia y de crisis epiléptica pueden resultar en la identificación de fármacos auténticamente innovadores.*

*Por ese motivo, también se han incorporado al Programa de Screening modelos animales de epilepsia (es decir, animales con predisposición crónica a sufrir crisis recurrentes y espontáneas), entre los cuales se destacan los modelos de encendido ("kindling"), como modelos de screening secundario (Löscher, 2011). En estos modelos, se producen cambios progresivos provocados por aplicación repetida de un estímulo inicial subconvulsivo, que llevan al estado llamado "fully kindled", el cual se caracteriza por la aparición de crisis en respuesta de cada estimulación (Goddard et al., 1969). El proceso de kindling se considera como un modelo relevante de neuroplasticidad que simula la epileptogénesis y la progresión de la enfermedad (Morimoto et al., 2004; Sutula & Kotloski, 2017). Se ha comprobado que la estimulación corneal repetida a 6 Hz en ratones puede conducir a un incremento en la respuesta convulsiva llevando a un*

persistente estado “fully kindled” (Leclercq et al., 2014). Se propone entonces al modelo 6 Hz corneal kindling como un modelo nuevo de convulsiones resistentes a fármacos.

Conforme a lo expuesto anteriormente, el presente trabajo de tesis se basó en el tamizado virtual aplicado a la búsqueda e identificación de nuevos compuestos activos frente al modelo de 6 Hz en ratones. La campaña de tamizado virtual se realizó a partir del desarrollo de modelos computacionales basados en el ligando con capacidad de identificar dichos candidatos en diferentes quimiotecas digitales. En la etapa final de este trabajo, se adquirieron comercialmente los compuestos seleccionados y se validaron experimentalmente frente al modelo en cuestión, el modelo agudo de 6 Hz.

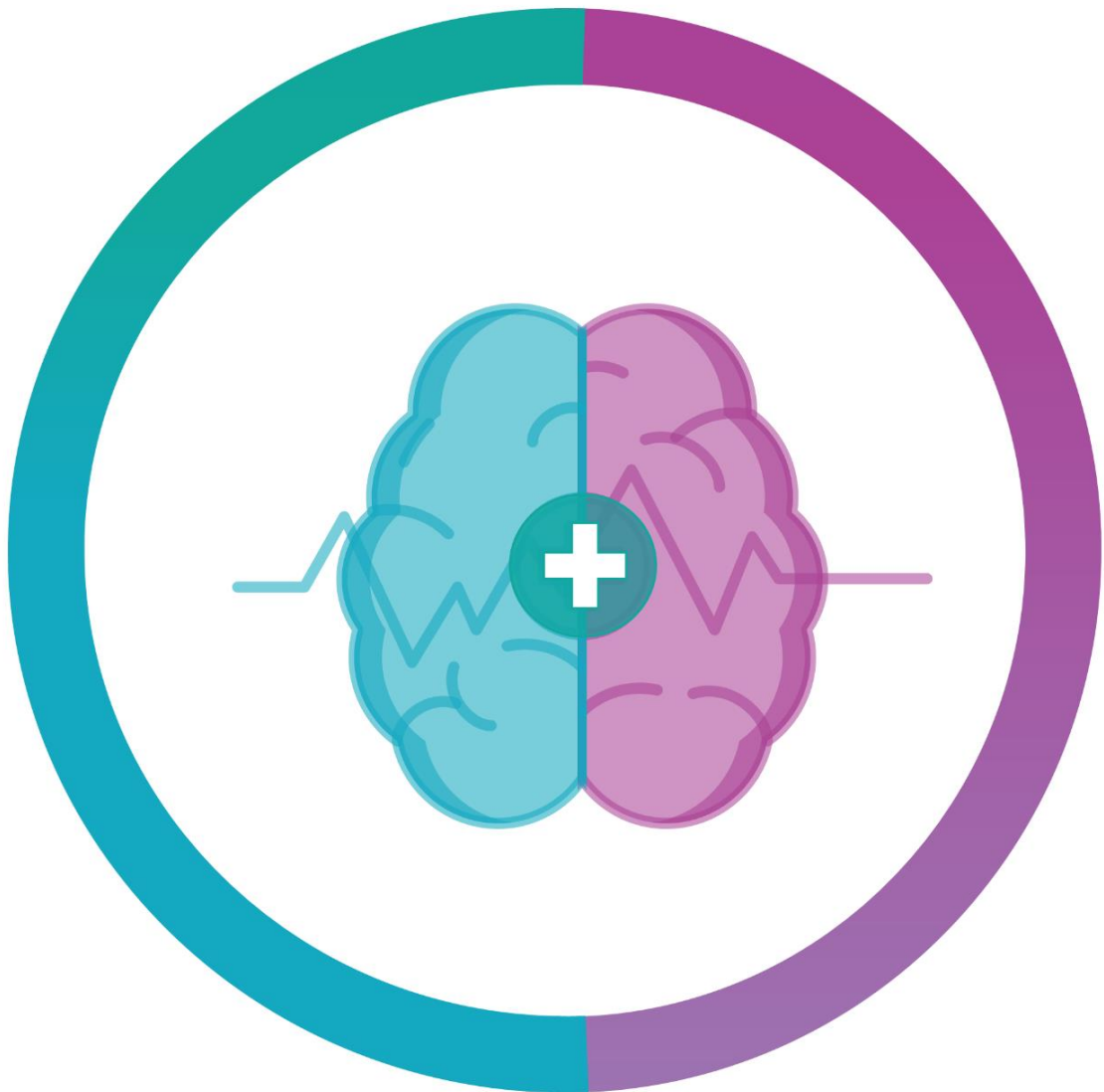
### Referencias:

- Barton, M. E. et al. (2001) ‘Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy’, *Epilepsy Research*, 47(3), pp. 217–227. doi: 10.1016/S0920-1211(01)00302-3.
- Chen, Z. et al. (2018) ‘Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs’, *JAMA Neurology*, 75(3), p. 279. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.3949.
- Goddard, G. V., McIntyre, D. C. and Leech, C. K. (1969) ‘A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation’, *Experimental Neurology*, 25(3), pp. 295–330. doi: 10.1016/0014-4886(69)90128-9.
- Leclercq, K., Matagne, A. and Kaminski, R. M. (2014) ‘Low potency and limited efficacy of antiepileptic drugs in the mouse 6Hz corneal kindling model’, *Epilepsy Research*. Elsevier B.V., 108(4), pp. 675–683. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2014.02.013.
- Lee, B. I. et al. (2019) ‘Clinical opinion: Earlier employment of polytherapy in sequential pharmacotherapy of epilepsy’, *Epilepsy Research*. Elsevier B.V., p. 106165. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2019.106165.
- Löscher, W. (2011) ‘Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs’, *Seizure*. BEA Trading Ltd, 20(5), pp. 359–368. doi: 10.1016/j.seizure.2011.01.003.
- Löscher, W. and Schmidt, D. (2011) ‘Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma’, *Epilepsia*. John Wiley & Sons, Ltd, 52(4), pp. 657–678. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x.
- Morimoto, K., Fahnestock, M. and Racine, R. J. (2004) ‘Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain’, *Progress in Neurobiology*, 73(1), pp. 1–60. doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.03.009.
- Sutula, T. P. and Kotloski, R. J. (2017) ‘Kindling: A Model and Phenomenon of Epilepsy’, in *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition*. Elsevier Inc., pp. 813–825. doi: 10.1016/B978-0-12-804066-9.00055-9.
- WHO (2019) *Fact sheet Epilepsy*. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy> (Accessed: 20 September 2019).
- Yoo, J. Y. and Panov, F. (2019) ‘Identification and Treatment of Drug-Resistant Epilepsy’, *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 25(2), pp. 362–380. doi:10.1212/CON.000000710.



## CAPÍTULO 1

# EPILEPSIA





# Capítulo 1: Epilepsia

## 1.1. Generalidades

### 1.1.1. Contexto Histórico

El término epilepsia (de origen griego “ἐπιλαμβάνειν”, cuyo significado es “ser atacado o tomado por sorpresa”) comprende distintas enfermedades que, aunque caracterizadas por signos y síntomas distintos, poseen en común la predisposición a sufrir crisis espontáneas y recurrentes (**Magiorkinis *et al.*, 2010**).

Si nos remontamos a la transición de la enfermedad desde sus orígenes, en los tiempos de la Antigua Babilonia o el Antiguo Egipto se creía que la epilepsia era producto de una causa sagrada o divina, se pensaba como un castigo enviado por los dioses como resultado de la trasgresión de las leyes (**Panteliadis *et al.*, 2017**). Otras culturas, incluida la judeocristiana, vinculaban las crisis convulsivas con la posesión de los cuerpos por parte del demonio, hecho por el cual se tomaban decisiones tan extremas como condenar a los pacientes a la hoguera o al suplicio simplemente por estar “poseídos” (**Masia & Devinsky, 2000**).

En la Grecia de Pericles, aparecen los primeros escritos de Hipócrates vinculando las crisis epilépticas con la acumulación de líquido en el cráneo. Ya en época del Imperio Romano, Galeno (90 años a.C.) proponía que era en las extremidades donde comenzaban las crisis debido a la acumulación de ciertos fluidos, para luego ascender hacia la cabeza (**Panteliadis *et al.*, 2017**).

Hipócrates, como decíamos, fue el primero, según los registros, en establecer una relación entre las características anatómicas y patológicas, y la generación de las convulsiones tanto en humanos como en animales. Para ello, se basó en estudios de necropsias de ovejas y cabras afectadas y muertas luego de sufrir crisis epilépticas (**Medina Malo, 2004**), determinando mediante la observación del cerebro que ese



órgano era el origen del padecimiento. En su descripción señala: “... el cerebro se encuentra húmedo, lleno de agua y maloliente...” (**Vasconcelos-Dueñas, 2001**).

### 1.1.2. Definición

La epilepsia es un trastorno crónico del sistema nervioso central (SNC) que afecta a personas de todo el mundo, sin diferenciar entre edad, raza, sexo y/o clase social. Su impacto socioeconómico y sobre la calidad de vida del paciente es altamente variable dependiendo del origen y características de las crisis, como así también de su frecuencia, del entorno social de cada paciente epiléptico, de los efectos adversos de los distintos tratamientos, y de las comorbilidades médicas, cognitivas o psiquiátricas. La aparición transitoria de signos y/o síntomas provocados por una actividad neuronal excesiva en el cerebro se denomina “crisis epiléptica” y es por ello, que el término epilepsia se asoció en el campo de la medicina con la predisposición repetitiva a la ocurrencia de al menos dos crisis no provocadas en un lapso de más de 24 horas (**Fisher et al., 2014**).

En 2014, debido a que muchos diagnósticos clínicos quedaban fuera del criterio de dos crisis no provocadas, Fisher y colaboradores propusieron a la Liga Internacional contra la Epilepsia (*International League Against Epilepsy - ILAE*) una modificación de la definición de epilepsia (**Fisher et al., 2014**), siendo actualmente diagnosticada en cualquiera de las siguientes circunstancias:

- (1) Al menos dos crisis no provocadas o reflejas separadas un intervalo de tiempo de más de 24 horas.
- (2) Una crisis no provocada o refleja y una predisposición a presentar nuevas crisis durante los 10 años siguientes.
- (3) Diagnóstico de un síndrome de epilepsia.



Las crisis convulsivas se producen en respuesta a descargas eléctricas excesivas en células neuronales ubicadas en diferentes partes del cerebro. Dependiendo en qué lugar del cerebro comienza esta actividad excesiva y cómo se propaga, dará origen a distintos tipos de crisis con características particulares, desde episodios de ausencia muy breves o contracciones musculares leves hasta movimientos involuntarios prolongados y graves, los cuales pueden afectar a sólo una parte del cuerpo (crisis parciales) o a su totalidad (crisis generalizadas). Las crisis pueden acompañarse de otros signos como la pérdida de la conciencia y control de los esfínteres, así como también presentar alteraciones de los sentidos, el estado de ánimo u otras funciones cognitivas. Su frecuencia también puede variar desde una crisis al año hasta varias al día en casos extremos.

### 1.1.3. Causas

Existen múltiples y variadas causas a las que se pueden atribuir las crisis epilépticas. Cualquier daño cerebral o desarrollo anormal del cerebro perturba el patrón normal de la actividad neuronal por desbalance en las señales entre neuronas (sobre la excitación o la inhibición o la combinación de ambos factores), provocando las convulsiones. La identificación temprana de la causa es importante, ya que puede contribuir a un control primario efectivo de las crisis si se utiliza el tratamiento adecuado.

La ILAE en su último informe de 2017 ha establecido seis grupos etiológicos: estructural, genético, infeccioso, metabólico, inmune e idiopático (**Scheffer *et al.*, 2017**).

La epilepsia con **etiología estructural** se refiere a una lesión o anomalía en la estructura cerebral asociada que da como resultado la generación de las crisis. Se pueden producir convulsiones derivando en epilepsia adquirida luego de un daño neuronal por lesiones prenatales o perinatales, que pueden darse por asfixia o traumatismos durante el parto; daño por traumatismo craneoencefálico grave o; lesión por alguna infección.



Las mutaciones **genéticas** juegan un rol importante en el desarrollo de cierto tipo de epilepsias. En algunos casos, la mutación no se conoce por lo cual puede inferirse a partir de la historia familiar, como en el Síndrome de Epilepsia Neonatal Familiar Benigna que afecta a varios miembros de una misma familia (**Radic, 2019**). En otros casos, las mutaciones pueden ocurrir espontáneamente y contribuir al desarrollo de epilepsia en personas que no reporten antecedentes familiares. Hay reportes que indican que este tipo de mutaciones están presentes en una población significativa de pacientes con Epilepsia Mioclónica Juvenil (**Johannesen et al., 2016**). Diversos tipos de epilepsia han sido relacionadas con mutaciones en genes que codifican para canales iónicos, asociadas a un control defectuoso del flujo de iones y, por ende, una ineficiente regulación de las señales neuronales (**Singhi, 2011**). Un ejemplo, es la mutación en el gen SCN1A que codifica para la subunidad  $\alpha_1$  del canal de sodio neuronal, que afecta a los pacientes con Síndrome de Dravet.

La epilepsia puede ocurrir como resultado de una **infección**, tal como la meningitis (**Vezzani et al., 2016**). Los ejemplos más comunes de infección aguda que resultan en una epilepsia incluyen neurocisticercosis, tuberculosis, HIV, malaria cerebral, panencefalitis esclerosante aguda, toxoplasmosis cerebral e infecciones congénitas dadas por el virus Zika y el citomegalovirus (**Singhi, 2011**).

Una serie de **trastornos metabólicos** se asocian a un desarrollo de epilepsia. Las causas metabólicas de epilepsias obedecen a un defecto metabólico que resulta en manifestaciones o cambios bioquímicos en todo el organismo, tales como porfiria, uremia, aminoacidopatías o convulsiones dependientes de piridoxina. En muchos casos, los trastornos metabólicos que dan origen a una epilepsia estarán asociados a una deficiencia en aquellos sustratos esenciales para el metabolismo celular. En otros, se pueden asociar a una acumulación de sustancias tóxicas o también a una alteración en la osmolaridad intracelular (**Lee et al., 2018**). Trastornos metabólicos como la deficiencia múltiple de carboxilasas (déficit de biotinidasa y de holocarboxilasa sintetasa), la deficiencia de folato cerebral, el déficit cerebral de creatina o la falta del transportador





de glucosa tipo 1 (GLUT-1), son algunos de los trastornos que ILAE reconoce como causante de las epilepsias metabólicas (**Finsterer & Mahjoub, 2013**).

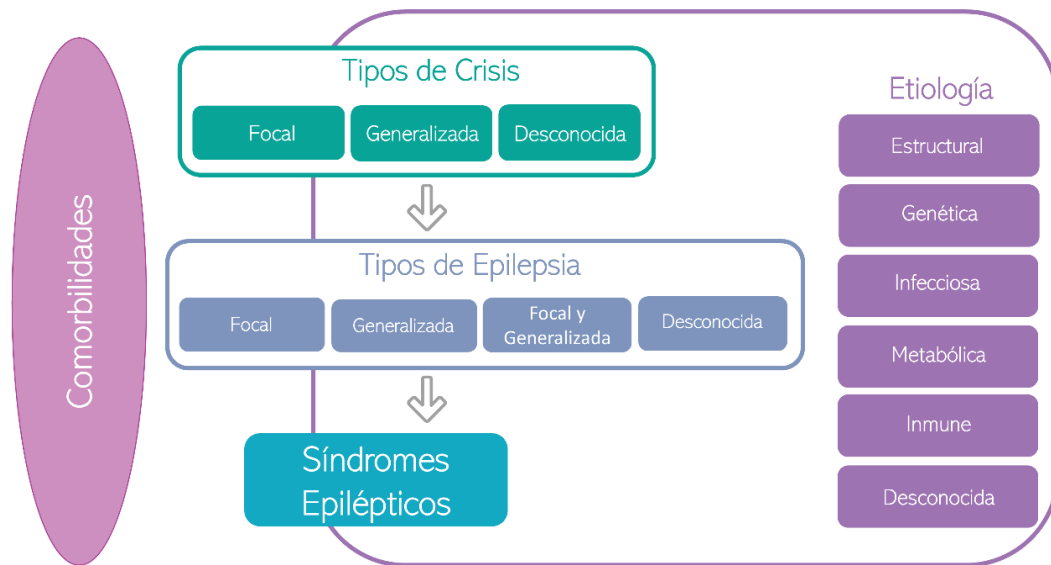
Una amplia gama de epilepsias inmunes con desarrollo característico han sido reconocidas recientemente tanto en adultos como en niños (**Vezzani et al., 2016**). En general, este tipo de epilepsias son resultado de una inflamación autoinmune del SNC. Algunos ejemplos incluyen encefalitis por anticuerpos contra el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) o la encefalitis producida por anticuerpos contra la proteína 1 inactivada del glioma rica en leucina (LGI1, por sus siglas en inglés) (**Lancaster & Dalmau, 2012**).

La **epilepsia idiopática**, cuya causa es desconocida, afecta a un 30% de los pacientes (**Dubey et al., 2017**). Se cree que la causa puede tener una base genética, por ejemplo, una canalopatía, o ser consecuencia de un trastorno estructural o metabólico aún no identificado (**Berg & Scheffer, 2011**). En esta categoría no es posible realizar un diagnóstico específico y encontrar la causa que origina la epilepsia depende de la evaluación de cada paciente por parte del equipo de neurólogos.

## 1.2. Clasificación de la Epilepsia

Como hemos mencionado anteriormente, la epilepsia comprende un grupo de trastornos con distinta etiología, que según sus características requerirán distintos tratamientos. Para poder lograr un diagnóstico certero y seleccionar la terapia adecuada, es importante una correcta clasificación de las crisis epilépticas y de los síndromes epilépticos.

La nueva clasificación de los tipos de crisis y epilepsias propuesta por ILAE en el año 2017 es una clasificación con varios niveles (**Fisher et al., 2017; Scheffer et al., 2018**), diseñada para aplicarse en diferentes ámbitos clínicos (Fig. 1.1). Será posible aplicar cada nivel de clasificación en función de los recursos disponibles en cada escenario clínico particular. De ser posible, se debe buscar un diagnóstico que incluya todos los niveles (*ver sección 1.1.3*).



**Figura 1.1** Clasificación global actualizada de los tipos de crisis y epilepsias propuesta por ILAE. Adaptado de (Scheffer *et al.*, 2018).

Una vez realizada la distinción entre un evento epiléptico y no epiléptico, el punto de partida en la clasificación es el tipo de crisis. Como veremos en la siguiente sección, las crisis se clasifican como de inicio focal, de inicio generalizado o con comienzo desconocido (Scheffer *et al.*, 2018).

El segundo nivel se refiere al tipo de epilepsia, e incluye a las epilepsias focales y a las generalizadas, como también a una combinación de ambas, además de la categoría desconocida o idiopática (Scheffer *et al.*, 2018).

Si bien un paciente puede presentar uno u otro tipo de crisis, focal o generalizada, algunos presentan ambos. Ejemplos comunes de epilepsia en los cuales ocurre la combinación de éstas son el síndrome de Dravet y el síndrome de Lennox-Gastaut.

El diagnóstico de un síndrome epiléptico se encuentra en el último nivel, refiriéndose a un conjunto de características específicas que ocurren juntas, generalmente dependientes de la edad de inicio y de remisión (Fisher *et al.*, 2005; Scheffer *et al.*, 2018). Puede también presentar comorbilidades distintivas, tal como la disfunción psiquiátrica e intelectual, junto con hallazgos específicos en el



electroencefalograma (EEG) correspondiente. Además, puede tener asociadas implicancias etiológicas, de pronóstico y de tratamiento. Existen diferentes síndromes y ya descriptos, como la epilepsia de ausencia infantil, el síndrome de West y el síndrome de Dravet (Cho & Kim, 2019).

### 1.3. Clasificación de las crisis

La clasificación de las crisis podría basarse en la fisiopatología, en la anatomía, en las vías que se activan para originar las crisis o simplemente en la observación de los signos y síntomas. En la figura 1.2 se presenta la más reciente clasificación del tipo de crisis propuesta por ILAE en 2017, en su versión extendida, con la nueva terminología asociada (Fisher *et al.*, 2017).

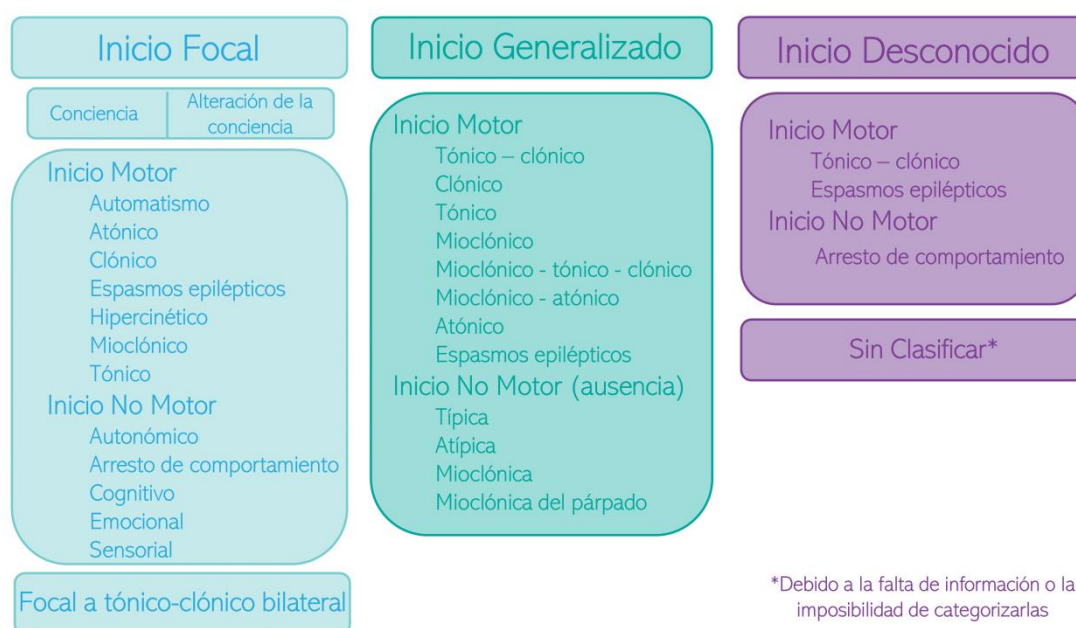


Figura 1.2 Adaptación de la clasificación de tipos de crisis versión expandida ILAE 2017.

Las convulsiones se clasifican según el tipo de inicio: focal, generalizada o de inicio desconocido. Además, se incluyen aquellas crisis denominadas focales con evolución a tónico-clónico bilaterales, antiguamente bajo el término crisis tónico-clónico



secundarias generalizadas, las cuales experimentan un patrón de propagación a ambos hemisferios cerebrales.

### 1.3.1. Crisis focales

Una crisis de inicio focal es aquella que se restringe a un solo hemisferio (**Berg & Scheffer, 2011; Fisher *et al.*, 2014**), y ocurre, por ejemplo, cuando un paciente sufre un derrame cerebral o presenta un tumor confinado a una zona particular del cerebro. Las crisis focales incluyen trastornos unifocales o multifocales, siempre afectando a un hemisferio. Además, puede subclasificarse según el estado de la conciencia, es decir, con alteración de la conciencia o sin afectación del estado de la conciencia (**Fisher *et al.*, 2017**).

Las convulsiones focales de inicio motor incluyen a las crisis atónicas (con pérdida focal del tono), tónicas (rigidez sostenida), clónicas (sacudidas rítmicas), mioclónicas (sacudidas breves e irregulares) o espasmos epilépticos (flexión o extensión de brazos y flexión del tronco) (**Palacios & Clavijo-Prado, 2016**). Las crisis focales con arresto de comportamiento son aquellas que involucran cese de movimiento y los pacientes son no responsivos al entorno. Las convulsiones autonómicas se presentan con sensaciones gastrointestinales determinadas, con sensaciones de frío o calor; algunos pacientes experimentan sofocos, pilo erección, palpitaciones, excitación sexual o cambios respiratorios (**Henkel *et al.*, 2002**). Las crisis cognitivas focales pueden identificarse mediante distintos signos, tal como el déficit en el lenguaje, en el pensamiento o en alguna de las funciones corticales superiores (**Fisher *et al.*, 2017**).

Otro tipo de crisis involucran cambios emocionales (sensaciones de miedo, ansiedad, ira, angustia, etc.), a veces difíciles de identificar como tal por su sintomatología similar a los de enfermedades psiquiátricas. Finalmente, existen también convulsiones focales que producen sensaciones somato sensoriales, olfativas, visuales, auditivas, gustativas, de temperatura o vestibulares.



### 1.3.2. Crisis epilépticas generalizadas

Cuando las convulsiones comienzan con una descarga eléctrica extendida, afectando a ambos hemisferios del cerebro en el mismo momento, hablamos de convulsiones generalizadas (**Fisher *et al.*, 2017**). La clasificación de este tipo de crisis es similar a la adoptada ya en 1981 (**Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1981**), con algunas pocas variaciones.

Los individuos con epilepsias generalizadas usualmente presentan alteración de la conciencia, por lo que en este caso no se tiene en cuenta el nivel de afectación de ésta. Primariamente, se subclasifican en dos grandes tipos, motoras y no motoras (de ausencia) (**Fisher *et al.*, 2017**). Entre aquellas crisis de inicio motor, se encuentran las denominadas tónico-clónico, clónico, tónico, mioclónico, mioclónico-tónico-clónico, mioclónico-atónico, además de incluir a los espasmos epilépticos. En contraparte, el gran grupo de las crisis no motoras comprenden las crisis de ausencia.

### 1.3.3. Estado Epiléptico

En el último reporte de ILAE en 2015 se incorporó la nueva definición de Estado Epiléptico o *Status epilepticus* (SE), proponiendo a éste como una condición dada por convulsiones anormales y prolongadas o repetidas que resultan de la falla de aquellos mecanismos responsables de que esas convulsiones terminen. A largo plazo, el SE puede llevar a la lesión y muerte neuronal dependiendo del tipo de convulsiones y de cuál es su duración (**Trinka *et al.*, 2015**).

## 1.4. Epidemiología

### 1.4.1. Incidencia y prevalencia

La epilepsia afecta alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo, diagnosticándose anualmente unos 2,4 millones de casos cuya causa se desconoce. Se



estima que la población general con epilepsia activa oscila entre 4 y 10 cada 1.000 personas; aproximadamente el 80% de ésta vive en países de bajos y medianos ingresos **(Singh & Sander, 2020)**. En Argentina, la prevalencia de epilepsia idiopática se estima que es de 230 a 280 por cada 100.000 habitantes **(Beghi et al., 2019)**. La prevalencia de epilepsia activa tiende a incrementarse con la edad, reflejando un pico entre los 20 y 29 años, y en adultos con edades por encima de los 60 años, afectando de igual manera tanto a hombres como a mujeres **(Beghi & Giussani, 2018)**.

La mayor incidencia de la enfermedad en países de ingresos bajos y medios tendría varias explicaciones: el mayor riesgo de enfermedades endémicas, tales como el paludismo o la neurocisticercosis; mayor incidencia de accidentes de tránsito que resultan en traumatismos graves; lesiones traumáticas en el momento del parto; y la baja accesibilidad a programas preventivos y de atención de salud **(Beghi & Giussani, 2018; Spiciarich et al., 2019)**.

### 1.4.2. Mortalidad y comorbilidad

Pese a que, en los últimos años, la prevalencia de esta patología ha disminuido, la epilepsia aún es una importante causa de discapacidad y mortalidad. Las convulsiones, en la mayoría de los casos, implican consecuencias neurológicas, cognitivas, psicológicas y sociales, representando una parte importante de la carga mundial de morbilidad **(Beghi et al., 2019)**.

La epilepsia representa un 0,7% de la carga mundial de morbilidad (medida que combina los años de vida perdidos debido a la mortalidad prematura con el tiempo vivido en situaciones en las que la salud no es plena) **(Mbizvo et al., 2019)**. Aproximadamente el 50% de los pacientes adultos que sufren epilepsia, padecen al menos otro problema de salud **(Keezer et al., 2015)**. A menudo, los pacientes suelen presentar mayor predisposición a fracturas y hematomas por lesiones relacionadas con las convulsiones. Asimismo, existe una mayor incidencia de trastornos psiquiátricos, como ansiedad y depresión, que condicionan aún más la calidad de vida del paciente,



provocan un aumento en la necesidad de atención sanitaria y mayor exclusión social (**Rai et al., 2012**).

Las principales causas de muerte en pacientes epilépticos están vinculadas a accidentes, suicidios, status epiléptico, neumonía, alta comorbilidad psiquiátrica y, la causa más común, muerte súbita (**Beghi et al., 2019**). El suicidio se asocia con más del 5% de las muertes en pacientes epilépticos, mientras que los accidentes de tránsito y otro tipo de accidentes se relacionan con aproximadamente el 16% de las muertes (**Fazel et al., 2013**).

Aunque los efectos sociales negativos de la epilepsia varían según el país, la discriminación y la estigmatización social asociados a la enfermedad son a veces más difíciles de vencer que las propias crisis. La Organización Mundial de la Salud (OMS) propone un modelo asistencial escalonado para mejorar la calidad de atención a los pacientes epilépticos, el cual implica desde el diagnóstico inicial hasta los tratamientos no farmacológicos para la epilepsia farmacorresistente (Fig. 1.3), destacando al tratamiento de las afecciones comórbidas como un componente esencial en todos los niveles de atención (**World Health Organization, 2019**).



Figura 1.3 Modelo escalonado para mejorar la calidad de atención a las personas con epilepsia.

## 1.5. Tratamiento no farmacológico

Si bien el tratamiento de elección es la terapia farmacológica, existen tratamientos alternativos que incluyen dietas cetogénicas (DC), estimulación cerebral profunda, estimulación del nervio vago (ENV), estimulación magnética transcraneal (EMT) y cirugía del foco convulsivo. Estos tipos de terapias se emplean cuando las crisis son difíciles de controlar con FAEs.

### 1.5.1. Dieta cetogénica (DC)

La DC es utilizada en el tratamiento de la epilepsia desde 1920 (Rho, 2017; D'Andrea Meira *et al.*, 2019). La evidencia clínica muestra que es una buena alternativa en pacientes farmacorresistentes que no pueden someterse a cirugía. Estudios recientes han demostrado resultados positivos cuando se emplea el tratamiento con DC en pacientes, tanto niños como adultos, con epilepsia refractaria (Rho, 2017).





Esta dieta consiste en la reducción drástica de carbohidratos para sustituirlos por un alto contenido de lípidos (90%), con restricción en el aporte de proteínas, lo cual induce la formación de cuerpos cetónicos. De esta manera, se genera un estado de cetosis producto del metabolismo de los ácidos grasos (**D'Andrea Meira et al., 2019**).

A pesar de su eficacia, muchos pacientes discontinúan la dieta debido a sus restricciones y a sus características organolépticas desagradables. Asimismo, en algunos casos, se presentan diversas manifestaciones, que incluyen síntomas gastrointestinales, anomalías metabólicas (por ejemplo, hiperuricemia, hipocalcemia y acidosis), aparición de cálculos renales, y anormalidades cardíacas (cardiomiopatía e intervalo QT prolongado) (**Liu et al., 2017**).

### 1.5.2. Estimulación del nervio vago (ENV)

Es un tratamiento neuro-modulatorio que consiste en la implantación en la región subclavicular de un generador de pulso programable, que otorga una estimulación eléctrica intermitente del nervio vago izquierdo en el cuello (**Panebianco et al., 2015; Mesraoua et al., 2019**). La ENV representa una alternativa en el tratamiento de epilepsia refractaria para aquellos pacientes que no son candidatos a una cirugía o casos en los que la resección quirúrgica ha sido ineficaz (**Liu et al., 2017**).

El mecanismo de acción continúa siendo estudiado, pero se conoce que implica a las fibras nerviosas vagales aferentes que modulan la actividad de los núcleos del tronco cefálico, como el núcleo del tracto solitario, con aferentes vagales en el locus coeruleus y el núcleo del rafo, entre otros (**Mesraoua et al., 2019**).

Morris y colaboradores reportaron, en 2013, que la ENV está asociada a la reducción en un 50% de las crisis, en el 55% de los pacientes infantiles con epilepsia parcial o generalizada (**Morris et al., 2013**). Además, se asoció a una reducción de más de 50% de las convulsiones en el 55% de los pacientes que padecían el síndrome de Lennox-Gastaut. También se observó un 50% o más de reducción de la frecuencia de las crisis entre 1 a 5 años post implantación.



La ENV es una terapia segura y, en general, bien tolerada. Algunos de los efectos adversos más comunes que pueden presentarse cuando el estimulador libera un pulso son alteración en la voz, ronquera y disnea, y con menor frecuencia, tos, dolores, parestesia, náuseas y dolor de cabeza (**Wheless et al., 2018**).

### 1.5.3. Estimulación cerebral profunda

Las estimulaciones cerebrales profundas son técnicas de neuro estimulación intracraneales invasivas (**Panebianco et al., 2015**), que se emplean cuando la cirugía está contraindicada o es ineficaz. Está indicada en el tratamiento de la epilepsia refractaria, y también se utiliza terapéuticamente en enfermedades relacionadas con desórdenes del movimiento, como la enfermedad de Parkinson, el temblor esencial y la distonía (**Li & Cook, 2018**). En la estimulación cerebral profunda, se implantan electrodos que se encuentran conectados a un generador de pulso en diferentes zonas profundas como el núcleo anterior del tálamo, hipocampo, núcleo centro-medio del tálamo y cerebelo, entre otras (**Li & Cook, 2018**).

### 1.5.4. Estimulación magnética transcraneal (EMT)

Este tipo de terapia utiliza campos magnéticos para estimular células nerviosas repetidamente a baja frecuencia con el objetivo de observar la reducción de la excitabilidad cortical por un lapso de tiempo largo. Sin embargo, a pesar de que existe evidencia que la EMT es segura y bien tolerada, no se ha comprobado aun fehacientemente su eficacia en reducir la frecuencia de las crisis en aquellos pacientes con epilepsia refractaria (**Panebianco et al., 2015**).

### 1.5.5. Cirugía

La resección quirúrgica del foco epiléptico se realiza en aquellos pacientes que, a pesar de recibir una terapia farmacológica adecuada, no lograron suprimir las crisis.



Con cirugía, a menudo, se produce una disminución en la frecuencia de las crisis o se logran controlar de manera efectiva, con aumento de la calidad de vida de los pacientes **(Liu et al., 2017)**.

El tipo de crisis ya sea focal o generalizada, determina qué procedimiento quirúrgico que se empleará. La resección completa del foco epileptogénico permite obtener buenos resultados. Luego de someterse a cirugía, más del 76% de los pacientes logran controlar plenamente sus crisis **(Jette et al., 2014; Jobst & Cascino, 2015)**.

Como consecuencia de este procedimiento, los pacientes pueden presentar varios efectos secundarios, tales como déficits cognitivos, los cuales dependen del sitio de resección. Por ejemplo, la resección del lóbulo temporal izquierdo está asociada con déficits en la memoria verbal. Otros efectos adversos se relacionan con complicaciones de la cirugía, como la infección intracerebral u otras infecciones bacterianas no cerebrales **(Jobst & Cascino, 2015; Liu et al., 2017)**.

## 1.6. Tratamiento farmacológico

Un tratamiento efectivo frente a la actividad eléctrica anormal típica de la epilepsia se basa generalmente en aumentar el proceso inhibitorio o disminuir la excitación. La farmacoterapia es el tratamiento más comúnmente utilizado, siendo eficaz en la reducción de la frecuencia y severidad de las crisis. Alrededor del 70% de los pacientes logran controlar las crisis con este tipo de tratamiento.

En el siguiente capítulo se abordarán los diferentes mecanismos de acción de los fármacos disponibles, actualmente se disponen de más de 45 fármacos para el tratamiento de la epilepsia, principalmente actuando sobre canales iónicos voltaje-operados, activando las vías GABAérgicas o inhibiendo el sistema excitatorio dependiente de glutamato. Por lo general, si bien la terapia a utilizar dependerá del trastorno convulsivo y de la respuesta de cada paciente en particular, se comienza con la elección de un solo FAE (monoterapia). Si el paciente no logra controlar las crisis, se



adiciona un nuevo FAE sin retirar el primero. En algunos casos, es necesario la utilización de tres FAEs diferentes para poder controlar las convulsiones.

En particular, destacaremos al levetiracetam, que es el fármaco activo en el modelo de 6 Hz, modelo animal que ha dado origen a este trabajo de tesis. Este fármaco puede considerarse multi-blanco (**Klitgaard et al., 2016**) y posee un mecanismo de acción novedoso, ya que reduce la liberación de calcio hacia el espacio sináptico por unión a la proteína SV2A de las vesículas sinápticas.

## 1.7. Referencias

Beghi, E. *et al.* (2019) 'Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016', *The Lancet Neurology*, 18(4), pp. 357–375. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30454-X.

Beghi, E. and Giussani, G. (2018) 'Aging and the Epidemiology of Epilepsy', *Neuroepidemiology*, 51(3–4), pp. 216–223. doi: 10.1159/000493484.

Berg, A. T. and Scheffer, I. E. (2011) 'New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century', *Epilepsia*, 52(6), pp. 1058–1062. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03101.x.

Cho, Y. W. and Kim, K. T. (2019) 'The Latest Classification of Epilepsy and Clinical Significance of Electroencephalography', *Journal of Neurointensive Care*, 2(1), pp. 1–3. doi: 10.32587/jnic.2019.00094.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1981) 'Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures.', *Epilepsia*, 22(4), pp. 489–501. doi: 10.1111/j.1528-1157.1981.tb06159.x.

D'Andrea Meira, I. *et al.* (2019) 'Ketogenic diet and epilepsy: What we know so far', *Frontiers in Neuroscience*, 13(JAN), pp. 1–8. doi: 10.3389/fnins.2019.00005.

Dubey, D. *et al.* (2017) 'Neurological autoantibody prevalence in epilepsy of unknown etiology', *JAMA Neurology*, 74(4), pp. 397–402. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.5429.

Fazel, S. *et al.* (2013) 'Premature mortality in epilepsy and the role of psychiatric comorbidity: a total population study', *The Lancet*, 382(9905), pp. 1646–1654. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60899-5.

Finsterer, J. and Mahjoub, S. Z. (2013) 'Presentation of adult mitochondrial epilepsy', *Seizure*. BEA Trading Ltd, 22(2), pp. 119–123. doi: 10.1016/j.seizure.2012.11.005.

Fisher, R. S. *et al.* (2005) 'Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)', *Epilepsia*, 46(4), pp. 470–472. doi: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x.



- Fisher, R. S. *et al.* (2014) 'ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy', *Epilepsia*, 55(4), pp. 475–482. doi: 10.1111/epi.12550.
- Fisher, R. S. *et al.* (2017) 'Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types', *Epilepsia*, 58(4), pp. 531–542. doi: 10.1111/epi.13671.
- Henkel, A. *et al.* (2002) 'The localizing value of the abdominal aura and its evolution', *Neurology*, 58(2), pp. 271–276. doi: 10.1212/WNL.58.2.271.
- Jette, N., Reid, A. Y. and Wiebe, S. (2014) 'Surgical management of epilepsy', *Canadian Medical Association Journal*, 186(13), pp. 997–1004. doi: 10.1503/cmaj.121291.
- Jobst, B. C. and Cascino, G. D. (2015) 'Resective Epilepsy Surgery for Drug-Resistant Focal Epilepsy', *JAMA*, 313(3), p. 285. doi: 10.1001/jama.2014.17426.
- Johannesen, K. *et al.* (2016) 'Phenotypic spectrum of GABRA1', *Neurology*, 87(11), pp. 1140–1151. doi: 10.1212/WNL.0000000000003087.
- Keezer, M. R., Sisodiya, S. M. and Sander, J. W. (2015) 'Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives', *The Lancet Global Health*. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00225-2.
- Klitgaard, H. *et al.* (2016) 'Brivaracetam: Rationale for discovery and preclinical profile of a selective SV2A ligand for epilepsy treatment', *Epilepsia*, 57(4), pp. 538–548. doi: 10.1111/epi.13340.
- Lancaster, E. and Dalmau, J. (2012) 'Neuronal autoantigens-pathogenesis, associated disorders and antibody testing', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, 8(7), pp. 380–390. doi: 10.1038/nrneurol.2012.99.
- Lee, V. L. L. *et al.* (2018) 'Treatment, therapy and management of metabolic epilepsy: A systematic review', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), pp. 1–20. doi: 10.3390/ijms19030871.
- Li, M. C. H. and Cook, M. J. (2018) 'Deep brain stimulation for drug-resistant epilepsy', *Epilepsia*, 59(2), pp. 273–290. doi: 10.1111/epi.13964.
- Liu, G. *et al.* (2017) *Epilepsy: Treatment Options*. Available at: [www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician87](http://www.aafp.org/afpAmericanFamilyPhysician87) (Accessed: 5 April 2020).
- Magiorkinis, E., Sidiropoulou, K. and Diamantis, A. (2010) 'Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity', *Epilepsy and Behavior*. Academic Press, 17(1), pp. 103–108. doi: 10.1016/j.yebeh.2009.10.023.
- Masia, S. L. and Devinsky, O. (2000) 'Epilepsy and Behavior: A Brief History', *Epilepsy and Behavior*, pp. 27–36. doi: 10.1006/ebch.1999.0021.
- Mbizvo, G. K. *et al.* (2019) 'Epilepsy-related and other causes of mortality in people with epilepsy: A systematic review of systematic reviews', *Epilepsy Research*. Elsevier B.V., 157, p. 106192. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2019.106192.
- Medina Malo, C. (2004) 'Generalidades. Historia de la epilepsia.', in *Epilepsia, aspectos clínicos y psicosociales*. Bogotá: Editorial Médica Internacional, pp. 30–39. Available at: <https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=ocSNI4uMiRYC&oi=fnd&pg=PA109&dq=epilepsia:+aspectos+clínicos+y+psicosociales&ots=0ful21f6YR&sig=emZRBnp3w2mRaolOmRPQWeInyA0#v=onepage&q=epilepsia%3A+aspectos+clínicos+y+psicosociales&f=false>.



- Mesraoua, B. *et al.* (2019) 'Novel therapies for epilepsy in the pipeline', *Epilepsy & Behavior*, 97, pp. 282–290. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.04.042.
- Morris, G. L. *et al.* (2013) 'Evidence-based guideline update: Vagus nerve stimulation for the treatment of epilepsy: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology', *Neurology*, 81(16), pp. 1453–1459. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a393d1.
- Palacios, E. and Clavijo-Prado, C. (2016) 'Semiología de la crisis epiléptica: un reto clínico', *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 25(4), pp. 203–209. doi: 10.1016/j.reper.2016.10.007.
- Panebianco, M. *et al.* (2015) 'Vagus nerve stimulation for partial seizures', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi: 10.1002/14651858.CD002896.pub2.
- Panteliadis, C. P. *et al.* (2017) 'Historical documents on epilepsy: From antiquity through the 20th century', *Brain and Development*, 39(6), pp. 457–463. doi: 10.1016/j.braindev.2017.02.002.
- Radic, J. *et al.* (2019) 'Benign Familial Neonatal Epilepsy (BFNE)', in *The Causes of Epilepsy*. Cambridge University Press, pp. 143–153. doi: 10.1017/9781108355209.018.
- Rai, D. *et al.* (2012) 'Epilepsy and psychiatric comorbidity: A nationally representative population-based study', *Epilepsia*, 53(6), pp. 1095–1103. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03500.x.
- Rho, J. M. (2017) 'How does the ketogenic diet induce anti-seizure effects?', *Neuroscience Letters*, 637, pp. 4–10. doi: 10.1016/j.neulet.2015.07.034.
- Scheffer, I. E. *et al.* (2017) 'ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology', *Epilepsia*, 58(4), pp. 512–521. doi: 10.1111/epi.13709.
- Scheffer, I. E. *et al.* (2018) 'ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology', *Zeitschrift für Epileptologie*, 31(4), pp. 296–306. doi: 10.1007/s10309-018-0218-6.
- Singh, G. and Sander, J. W. (2020) 'The global burden of epilepsy report: Implications for low- and middle-income countries', *Epilepsy & Behavior*, 105, p. 106949. doi: 10.1016/j.yebeh.2020.106949.
- SINGHI, P. (2011) 'Infectious causes of seizures and epilepsy in the developing world', *Developmental Medicine & Child Neurology*, 53(7), pp. 600–609. doi: 10.1111/j.1469-8749.2011.03928.x.
- Spicciarich, M. C. *et al.* (2019) 'Global Health and Epilepsy: Update and Future Directions', *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 19(6), p. 30. doi: 10.1007/s11910-019-0947-6.
- Vasconcelos-Dueñas, D. (2001) 'Epilepsia: ¿enfermedad discapacitante?. Tema propiciatorio para EPI-G', *Gaceta Médica de México*, 137(1), pp. 73–78.
- Vezzani, A. *et al.* (2016) 'Infections, inflammation and epilepsy', *Acta Neuropathologica*, 131(2), pp. 211–234. doi: 10.1007/s00401-015-1481-5.
- Wheless, J. W., Gienapp, A. J. and Ryvlin, P. (2018) 'Vagus nerve stimulation (VNS) therapy update', *Epilepsy & Behavior*, 88, pp. 2–10. doi: 10.1016/j.yebeh.2018.06.032.



World Health Organization (2019) *WHO | Epilepsy: a public health imperative, Who*. Available at: [https://www.who.int/mental\\_health/neurology/epilepsy/report\\_2019/en/](https://www.who.int/mental_health/neurology/epilepsy/report_2019/en/).





# CAPÍTULO 2

# FÁRMACOS

# ANTIEPILEPTICOS





## Capítulo 2: Fármacos Antiepilépticos

### 2.1. Introducción

El tratamiento de un paciente epiléptico comienza, como se ha mencionado anteriormente, con un diagnóstico preciso del tipo de convulsiones, epilepsia y/o síndrome epiléptico. Una vez obtenido el diagnóstico, se realizan ensayos farmacológicos secuenciales y ordenados, a partir de los cuales se eligen los FAEs destinados a tratar a cada paciente particular (**Lee *et al.*, 2019**).

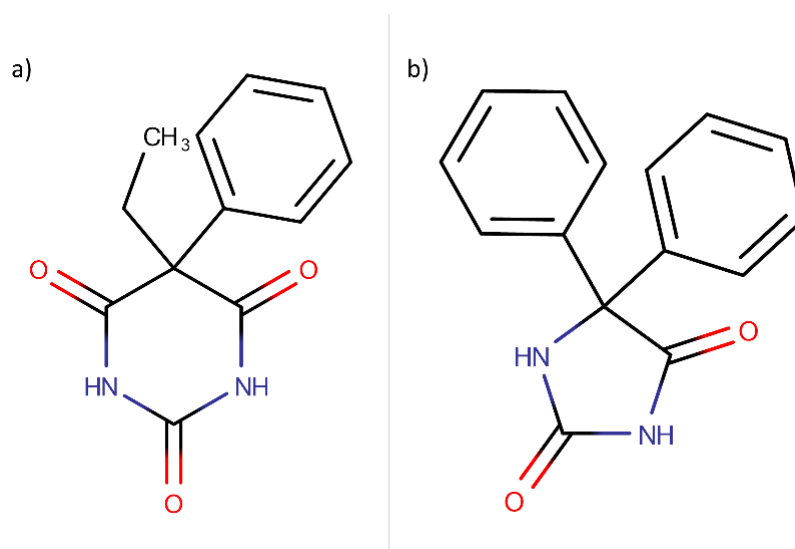
En este capítulo se discutirán distintos aspectos concernientes a la farmacoterapia de las epilepsias, incluyendo una breve revisión histórica desde la introducción del primer agente antiepiléptico hasta las últimas innovaciones en este campo.

#### 2.1.1. Introducción de los FAEs en el mercado

En 1857, Charles Locock introdujo el primer tratamiento moderno contra la epilepsia, el bromuro, que fue la única opción terapéutica disponible hasta la incorporación de fenobarbital en 1912, obteniéndose una remisión inicial de más del 50% de los casos (**Korinthenberg *et al.*, 2007**). Epileptólogos como Turner y Gowers se habían dado cuenta en ese entonces de que las sales de bromuro de sodio y potasio eran más eficaces que las de litio o estroncio (**Mercadé Cerdá *et al.*, 2015**). Si la sal de bromuro fallaba, se recomendaba adicionar al tratamiento sustancias como bórax (introducido por Gowers como antiespasmódico) (**Jensen, 2006**) o belladona (**Sankey, 1861**), o bien se consideraba la utilización complementaria de dietas principalmente para disminuir las altas dosis de bromuro, a las que se atribuía la alta frecuencia de efectos tóxicos a nivel del SNC, la piel y el tracto gastrointestinal. Más tarde, Sieveking negó la eficacia de estos últimos, junto a otras terapias tales como opiáceos y narcóticos, hioscina y digitalis, entre otros (**Sieveking, 1858**).



El ácido barbitúrico fue sintetizado por primera vez en 1864 por Adolf von Baeyer, un investigador asistente de Kekulé, a través de la condensación de la urea y del ácido malónico (**Shorvon, 2009a**). En 1904, se obtuvieron derivados de este compuesto, entre los cuales se hallaba el ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico, más comúnmente conocido como fenobarbital (PB) (Fig. 2.1.a), el cual se incorporó al mercado como hipnótico y ansiolítico. En 1912, demostró ser más eficaz que los bromuros en la supresión de las crisis epilépticas (**Sands, 1921**). A fines de 1950, el PB se había establecido ya como fármaco de primera línea para el tratamiento de las convulsiones neonatales, las crisis febriles y el SE. Al mismo tiempo, la OMS recomendaba su uso como primera línea para tratar las convulsiones tónico-clónicas generalizadas y parciales (**World Health Organization, 1990**). A pesar de presentar diversos efectos adversos, tales como alteraciones en el estado de ánimo y en las funciones cognitivas, el PB es muy utilizado incluso en la actualidad, sobre todo por su bajo costo (**Ilangaratne et al., 2012**).



**Figura 2.1** Estructuras químicas de fenobarbital (a) y de fenitoína (b).

En 1938, Merritt y Putnam utilizando un modelo agudo de crisis epilépticas en gatos, reportaron el efecto anticonvulsivante de la difenilhidantoína, más conocida como fenitoína (PHT) (**Merritt, 1938; Perucca, 2019**). El hecho de que mediante la utilización de modelos animales se pudieran identificar compuestos con eficacia clínica



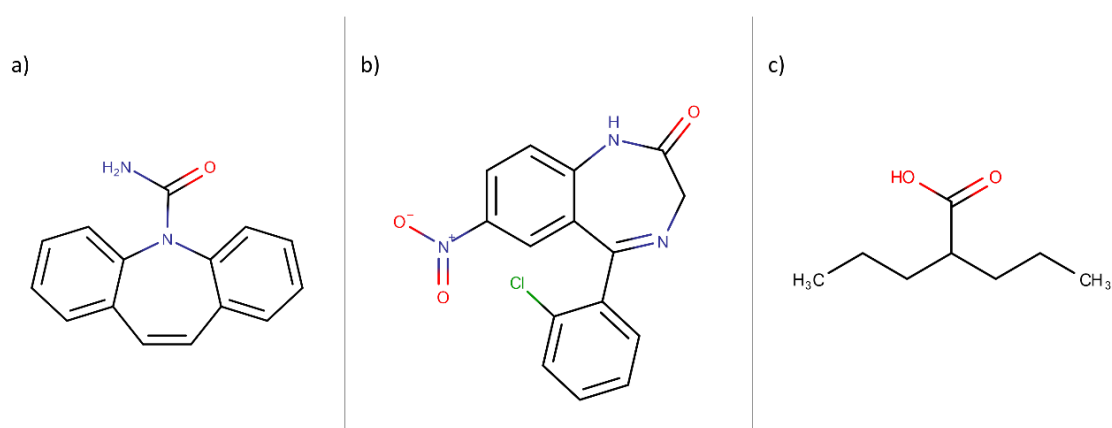
representó un gran avance en el campo, como veremos en el capítulo 3, permitiendo optimizar tiempos y costos descartando aquellos compuestos que no habían sido prometedores en dichos modelos (**Arzimanoglou et al., 2010**). La PHT demostraba poseer mayor efectividad en aquellos pacientes en los cuales tanto los barbitúricos como los bromuros no habían sido efectivos. Asimismo, a pesar de presentar una estructura similar al PB (Fig. 2.1.b), presentaba menor incidencia de efectos sedantes y cutáneos a las dosis utilizadas en la práctica clínica (**Shorvon, 2009a**). El descubrimiento de la PHT fue seguido por el hallazgo e introducción de otras nuevas drogas obtenidas principalmente por la modificación estructural de hidantoínas y barbitúricos.

Entre 1945 y 1958, se introdujeron la acetazolamida (**Staley, 2002**), la beclamida (benzclorpropamida) (**Livingston, 1953**) y la mesantoína (mefenitoína o metilhidantoína), asociada a efectos secundarios graves como anemia aplásica, pancitopenia y falla hepática (**Kozol, 1946; Troupin et al., 1976**). En 1953 se reportó la actividad anticonvulsiva de la fensuximida (análogo de trimetadiona), aunque con serios efectos negativos sobre la función renal, hepática y hematológica (**Chen et al., 1963; Shorvon, 2009a**). Ese mismo año, luego de muchos intentos por conseguir una droga con mayor efectividad, se introducía en el mercado la primidona, un compuesto generado a partir del metabolismo del PB, pero con menos efectos adversos que éste (**Sciarra, 1954**).

Alrededor de 1960 se producen algunos hitos relevantes tanto en el ámbito de la farmacología general como en el de la farmacología de las epilepsias: se incorporó el concepto de farmacocinética en la práctica clínica, se instaló la tendencia al empleo de un único fármaco antiepiléptico (monoterapia) y se implementó el monitoreo de los niveles plasmáticos de cada FAE, paradigmas y prácticas aún vigentes (**Shorvon, 2009b**). En 1969 se produjeron avances importantes hacia la estandarización de las herramientas de screening de FAEs, ya que inauguró el Programa de Desarrollo de Fármacos Antiepilépticos junto con la creación de una comisión destinada a diseñar los protocolos de los ensayos clínicos según las normas establecidas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*). Con



ello se logró que seis medicamentos con licencia en Europa se evaluaran en una serie de ensayos clínicos controlados; tres de los cuales fueron aprobados por la FDA: la carbamazepina (CBZ) en 1974 (Fig. 2.2.a), el clonazepam (CZP) en 1975 (Fig. 2.2.b) y el ácido valproico (VPA) en 1978 (Fig. 2.2.c). El lanzamiento en 1975 del Proyecto de Detección de Anticonvulsivos (ASP, *Anticonvulsant Screening Project*) significó otro notable avance para estimular la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos (**Krall et al., 1978**).



**Figura 2.2** Estructuras químicas de carbamazepina (a), clonazepam (b) y ácido valproico (c).

Entretanto se producían aquellos grandes cambios, el número de fármacos introducidos en el mercado comenzó a aumentar considerablemente (Fig. 2.3). En 1958 se lanzó al mercado la etosuximida (ESM) utilizada principalmente en la terapia de las crisis de ausencia, y la metosuximida, de estructura análoga del anterior y con efectos protectores frente a las crisis psicomotoras y de ausencia (**Weinstein, 1966**). Hacia los 1970s, se comenzó a comercializar el VPA utilizado en el tratamiento de los mismos tipos de crisis, y la CBZ que, si bien en un principio se aprobó como terapia de la neuralgia, luego se aceptó para su uso como anticonvulsivo. Las benzodiazepinas (BZD), por su parte, supusieron un gran impacto en aquellos años no sólo por su uso como ansiolítico e hipnótico, sino también por sus efectos antiepilépticos. Entre las más destacadas se encuentran el clonazepam, diazepam, lorazepam, midazolam y clobazam (**Riss et al., 2008**). Entre los años 1989 y 1994, se introdujeron al mercado cinco de las hoy en día



principales drogas antiepilepticas: vigabatrina (VGB), oxcarbazepina (OXC), lamotrigina (LTG), felbamato (FBM) y gabapentina (GBP).

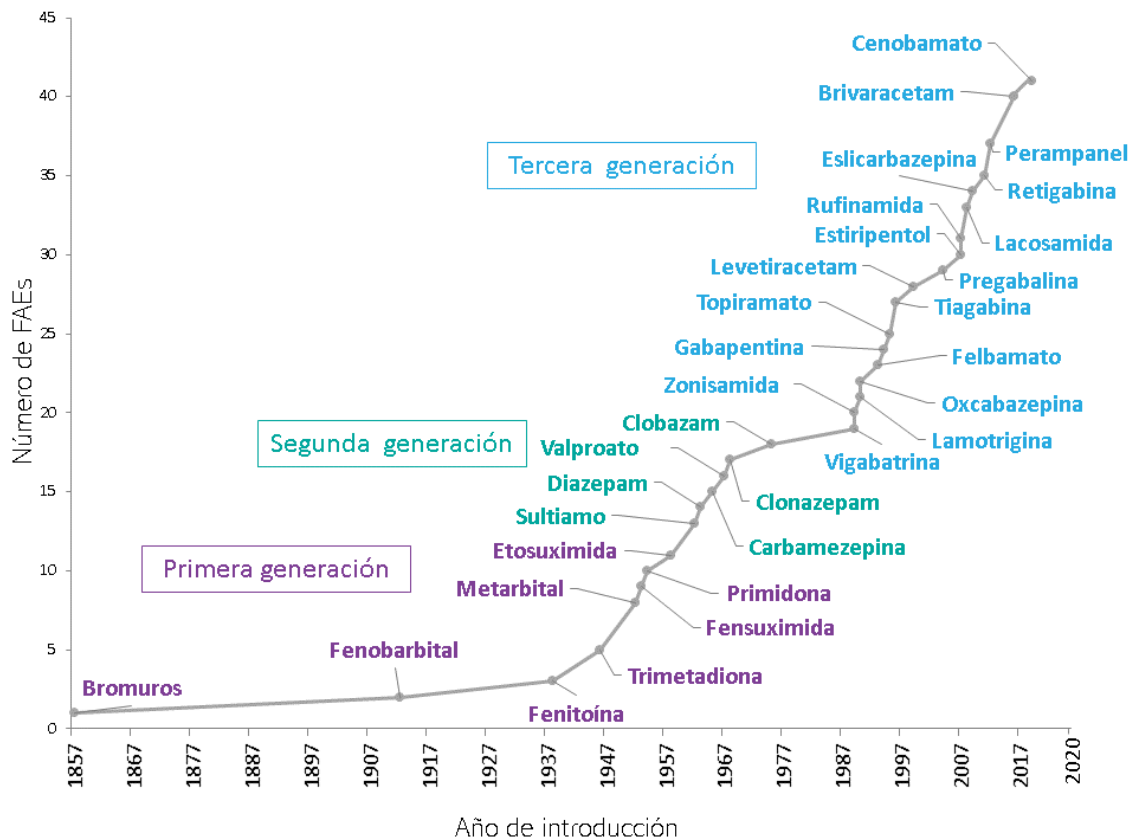


Figura 2.3 Introducción de los FAEs en el mercado.

Hoy en día, mucho ha cambiado el paradigma en el tratamiento de la epilepsia respecto de aquel concepto de priorizar la monoterapia, habiendo resurgido la combinación de distintos FAEs a dosis menores a las utilizadas individualmente, con el objetivo de encontrar un efecto sinérgico (Jaime, 2013), principalmente en aquellos pacientes farmacorresistentes. En los últimos años se han introducido en el mercado 17 nuevas drogas antiepilepticas, por lo que, junto con los fármacos convencionales, actualmente existen al menos 25 FAEs para utilizar en la clínica (Shorvon, 2009b; Lee et al., 2019). Entre ellos se encuentran el topiramato (TPM), tiagabina (TGB), levetiracetam (LEV), pregabalina (PGB), estiripentol (STP), rufinamida (RFM), lacosamida (LCM), eslicarbazepina (ESL), ezogabina (EZG o retigabina, RTG), perampanel (PRP), brivaracetam (BRV) y cenobamato, recientemente introducido.



### 2.1.2. Estado actual de los FAEs

Como hemos visto en la sección anterior, desde la introducción del bromuro de potasio, el arsenal de fármacos disponibles para tratar la epilepsia se ha diversificado considerablemente y se han demostrado mejoras con respecto a su disponibilidad y su eficacia, además de favorecer la calidad de vida del paciente y disminuir los efectos adversos (**Lee et al., 2019**). Sin embargo, muchos de ellos han caído en desuso debido a los efectos adversos que se presentan con su administración o, en algunos casos, a la falta de eficacia (**Shorvon, 2009a, 2009b**). Asimismo, los tratamientos que se emplean sólo intentan suprimir las crisis y, a pesar de que los FAEs actuales presentan diversos mecanismos de acción (*ver sección 2.3*), ninguno de ellos ha logrado prevenir el desarrollo de la epilepsia (**Chen et al., 2018**). Se puede diferenciar a los FAEs en aquellos de amplio espectro, efectivos frente a crisis focales y varios tipos de convulsiones generalizadas primarias, y aquellos de eficacia más acotada, los cuales sólo pueden utilizarse frente a determinados tipos de crisis (Fig. 2.4) (**Perucca, 2015**).

Hoy en día, cuando se diagnostica la epilepsia, se prefiere comenzar con monoterapia, y si el tratamiento falla, muy comúnmente se adicionan uno o dos fármacos que serán utilizados en conjunto con el primero (de hecho, es habitual que los nuevos FAEs se aprueben en principio únicamente como terapia adicional / complementaria, “*add on therapy*”). La elección de los fármacos de primera y segunda generación que se administran en conjunto, a menudo se basa en la experiencia clínica empírica o en las observaciones anecdóticas o en estudios clínicos pequeños (**Santulli et al., 2016**). Aproximadamente el 50% de los pacientes epilépticos logran controlar las crisis con la administración de un solo FAE, en tanto que un 20% a 25% consiguen controlarlas con la adición de un segundo o tercer fármaco, respectivamente. El restante 25% a 30% de los pacientes presentan epilepsia refractaria o intratable, es decir que no responden eficazmente a los FAEs (**Mercadé Cerdá et al., 2015**).



**Figura 2.4** Efectividad relativa de los diferentes FAEs disponibles frente a las distintas clases de convulsiones. <sup>a</sup>No efectivo frente a crisis de ausencia. <sup>b</sup>Ocasionalmente exacerbaban las crisis tónicas, particularmente en pacientes con el síndrome de Lennox-Gastaut y el síndrome de West. <sup>c</sup>Puede agravar la epilepsia mioclónica en pacientes con síndrome de Dravet, o las crisis mioclónicas en otros síndromes. <sup>d</sup>No hay evidencia de efectividad frente a crisis tónicas y atónicas, y además en el caso de PRP, frente a crisis de ausencia y mioclónicas. <sup>e</sup>Efectivo frente a crisis focales, crisis tónico-clónico bilaterales y caídas acinélicas asociadas al síndrome de Lennox-Gastaut. <sup>f</sup>Efectivo frente a crisis focales, crisis tónico-clónico bilaterales, crisis tónico-clónico generalizadas y caídas acinélicas asociadas al síndrome de Lennox-Gastaut. <sup>g</sup>Efectivo frente a crisis focales y crisis tónico-clónico bilaterales. <sup>h</sup>No hay evidencia de efectividad frente a crisis de ausencia y crisis mioclónicas. <sup>i</sup>CBZ, PHT, TGB, OXC y ESL pueden precipitar o agravar las crisis de ausencia y mioclónicas. <sup>j</sup>GBP y PGB pueden precipitar o agravar las crisis mioclónicas. <sup>k</sup>Puede ser también eficaz frente a las crisis mioclónicas. <sup>l</sup>Puede ser también eficaz frente a crisis focales, aunque podría precipitar o agravar las crisis mioclónicas. <sup>m</sup>Aprobado por FDA para la terapia de las crisis tónico-clónico generalizadas refractarias en pacientes con síndrome de Dravet, administrado en forma conjunta con CLB y VPA.

Actualmente existe una importante necesidad de descubrir nuevos agentes terapéuticos para aquellos casos de epilepsia que no logran controlar sus síntomas con la terapia existente; particularmente en epilepsia se necesitan nuevas terapias para aquel 30% de pacientes que no responde a los FAEs disponibles, es decir, para aquellos pacientes farmacorresistentes.





## 2.2. Clasificación de los FAEs

Históricamente, los FAEs se han clasificado en tres generaciones de acuerdo con la estrategia utilizada para su desarrollo.

### 2.2.1. Fármacos de primera generación

Los fármacos de primera generación entraron al mercado entre 1857 y 1958, período en el cual no existía un enfoque sistemático para el descubrimiento de fármacos. Se disponía de modelos animales no validados cuyos resultados no siempre se trasladaban a la clínica, y ocasionalmente algunos compuestos activos podían surgir de algún evento fortuito. Este grupo incluye el bromuro de potasio, PB y otros compuestos derivados del ácido barbitúrico, como PHT, PRM, trimetadona y ESM (Löschner & Schmidt, 2011).

La mayoría de los FAEs de esta generación presentan dos importantes desventajas. Son potentes inductores de las isoenzimas del citocromo P450 (CYP), tal como el PB (Chu *et al.*, 2009), de la uridin-glucuronil transferasa (UGT) y de la epoxi hidrolasa, lo que resulta en interacciones medicamentosas con otros FAEs y con fármacos de otras categorías. La segunda desventaja es que producen reacciones de hipersensibilidad (Santulli *et al.*, 2016; Jacob *et al.*, 2019).

### 2.2.2. Fármacos de segunda generación

Esta generación de FAEs comprenden las BZD, CBZ y VPA, introducidos en el mercado entre 1960 y 1975. Esta generación se diferenció del PB y sus análogos, siendo estructuralmente novedosa. Con ello, se intentaba mejorar la eficacia clínica, con posible reducción de los efectos adversos y/o mejoras en el perfil farmacocinético (Gerlach & Krajewski, 2010).

Esta segunda generación tampoco estaba exenta de potenciales interacciones medicamentosas. El VPA puede considerarse un inhibidor de la actividad de las enzimas



UGT y de la CYP2C9 (**Zaccara & Perucca, 2014**), además de ser teratogénico y producir falla hepática en individuos predispuestos. La CBZ, por su parte, es un potente inductor de CYP3A4 (**Chu *et al.*, 2009**).

### 2.2.3. Fármacos de tercera generación

La era de los FAEs de tercera generación comenzó en 1980, de la mano del paradigma de descubrimiento racional de fármacos. Según este paradigma, definir tempranamente un blanco molecular (o *target*) asociado a la fisiopatología de la enfermedad y con el cual se espera que un nuevo fármaco interactúe, permite optimizar más eficientemente la potencia y selectividad de los candidatos por el blanco. Esta generación incluye LTG, VGB, GBP, OXC, TPM, FBM, TGB, LEV, STP, ESL, RTG, PRP y BRV, entre otros, aunque no todos fueron identificados siguiendo el paradigma de diseño racional.

Si bien estos FAEs, no logran mejorar la eficacia de los de las anteriores generaciones, tienen otras ventajas tales como menor frecuencia de interacciones medicamentosas y mejor perfil de seguridad (**Elger & Schmidt, 2008; Johannessen *et al.*, 2010**). En su mayoría, estos fármacos generan menor teratogenicidad y los efectos sobre la secreción hormonal, el metabolismo de los huesos y de los lípidos, son más leves (**Hanaya & Arita, 2016**).

## 2.3. Mecanismo de acción de fármacos antiepilépticos

Como hemos mencionado en secciones anteriores, los FAEs en general presentan diversos mecanismos mediante los cuales ejercen su acción, vinculada al objetivo de contrarrestar el desbalance excitatorio- inhibitorio en las células neuronales. En su mayoría, los FAEs son compuestos de farmacología compleja, interactuando simultáneamente con múltiples blancos moleculares a nivel central.

En esta sección, describiremos los mecanismos de acción dilucidados hasta el momento (los mecanismos de acción de los FAEs más relevantes se encuentran



resumidos en la tabla 2.1), los cuales pueden agruparse, según su blanco molecular, en diferentes categorías (**Meldrum & Rogawski, 2007**):

- (1) Aquellos que actúan sobre canales iónicos operados por voltaje;
- (2) Aquellos que modifican la actividad de canales iónicos activados por un ligando;
- (3) Aquellos que actúan sobre receptores asociados a proteína G;
- (4) Aquellos que ejercen acción sobre transportadores de neurotransmisores (NT);
- (5) Aquellos que modulan la función de proteínas presinápticas que influyen la formación y función de la vesícula sináptica;
- (6) Aquellos que intervienen en la actividad de enzimas;
- (7) Otros mecanismos.



**Tabla 2.1** Principales mecanismos de acción de los FAEs disponibles. (✓) *Principal sitio de acción*; (✗) *Mecanismo secundario*. SV2A: glicoproteína 2A de la vesícula sináptica; GABA: ácido  $\gamma$ -aminobutírico; KCNQ2-5: canal de potasio voltaje-operado Kv7.2-7.5.

Fármacos Antiepilépticos	Corrientes excitatorias				Corrientes inhibitorias		
	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	SV2A	Glutamato	GABA	KCNQ2-5	Inhibición de Anhidrasa Carbónica
PHT	✓						
CBZ, OXC, ESL	✓	✗					
LTG	✓	✗			✗		
ZNS	✓	✗			✗		✗
LCM	✓						
RFM	✓						
FBM	✗	✗		✓	✗		
TPM	✗	✗		✓	✗		✗
PRP				✓			
ESM		✓					
GBP, PBG		✓			✗		
Piracetam, LEV, BRV		✗	✓		✗		
PB, PRM		✗		✗	✓		
VPA	✗	✗			✓		
VGB					✓		
TGB					✓		
BZD					✓		
RTG						✓	
STP	✗				✓		
Sultiamo							✓



### 2.3.1. Modulación de canales iónicos operados por voltaje

La excitabilidad neuronal está determinada por las propiedades de los canales iónicos presentes en la membrana neuronal. El aumento de la excitabilidad de las neuronas asociada a una descarga epiléptica podría estar mediado por los canales iónicos voltaje-operados o bien por aquellos activados por un ligando, como veremos más adelante (Elger & Schmidt, 2008). Por tanto, el mecanismo de acción de muchos FAEs comprende la modulación de la actividad de estos canales para lograr reducir la excitabilidad neuronal. La distribución de los canales de sodio, calcio y potasio en los tejidos es muy amplia y la selectividad preferencial de los fármacos hacia isoformas presentes en el cerebro respecto de otros tejidos es necesaria, aunque hoy en día relativamente poco explorada en el campo de la epilepsia.

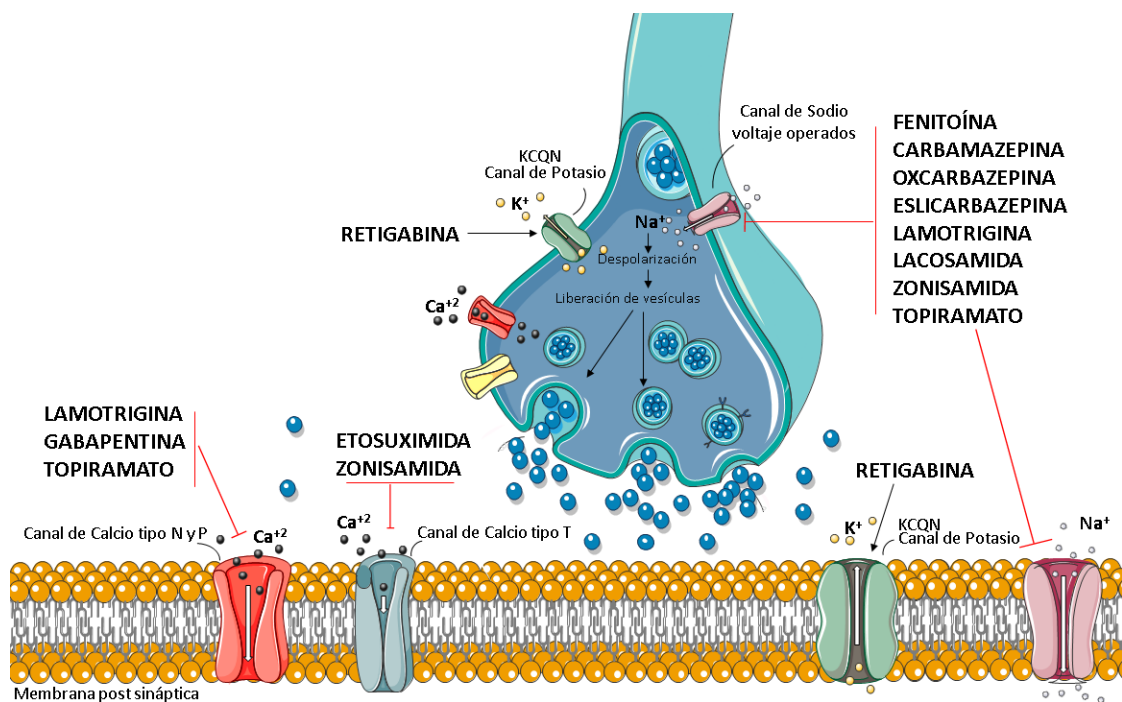


Figura 2.5 Principales FAEs con mecanismos de acción sobre los canales iónicos.

#### 2.3.1.1. Canales de sodio

Los canales de sodio voltaje-operados (*voltage-gated sodium channels, VGSC*) poseen ciertas propiedades, como un valor determinado de potencial umbral, que



definen la iniciación y propagación de los potenciales de acción (PA) de las células nerviosas. La exacerbación de la actividad de los VGSCs conlleva a la generación de PAs descontrolados, clave en el desarrollo de las crisis (**Denac et al., 2000**).

Existen nueve isoformas distintas de los VGSCs, de las cuales sólo cuatro se localizan de manera predominante en el SNC –  $Na_v 1.1$ ,  $Na_v 1.2$ ,  $Na_v 1.3$  y  $Na_v 1.6$  – y dos en el sistema nervioso periférico y en la raíz del ganglio dorsal -  $Na_v 1.7$  y  $Na_v 1.8$ . Además, la isoforma  $Na_v 1.9$  está ampliamente expresada en cerebro y cordón espinal (**Meldrum & Rogawski, 2007**). En mamíferos, las corrientes rápidas de sodio que provocan PAs están mediadas por las isoformas  $Na_v 1.1$ ,  $Na_v 1.2$  y  $Na_v 1.6$ , los cuales también median las corrientes de sodio tardías y están involucrados en el desarrollo de las crisis en epilepsia (**Meldrum & Rogawski, 2007; Palestro et al., 2018**). Algunos tipos de epilepsia resultan de las mutaciones, principalmente, en la isoforma  $Na_v 1.1$  (**Li & Chen, 2018**).

Un número importante de FAEs actúan bloqueando las corrientes de sodio por inactivación de los VGSCs. Entre estos fármacos se encuentran la PHT, VPA, TPM, OXC, CBZ, FBM, ZNS y LTG (Fig. 2.5), que reducen la severidad de las crisis y aumentan el umbral posdescarga (**Brodie et al., 2011; Stephen & Brodie, 2011; Behere et al., 2019**).

#### 2.3.1.2. Canales de calcio

Además de los VGSCs, los canales de calcio voltaje-operados también pueden contribuir al balance en el PA de las neuronas, siendo particularmente importantes en la generación de un impulso rítmico y en la propagación de éste mediando la excitosis de NTs (**Meldrum & Rogawski, 2007**).

De acuerdo con sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, estos canales pueden clasificarse en aquellos activados mediante bajo voltaje, también denominados tipo T, y aquellos que se activan por alto voltaje, que comprenden los subtipos L, N, P/Q y R (**Simms & Zamponi, 2014**). Los canales tipo T están ampliamente distribuidos en el tálamo y generan corrientes transitorias que resultan afectadas en las crisis de ausencia generalizadas. Los canales de alto voltaje generan corrientes sostenidas, importantes en la duración y la frecuencia de las espigas epilépticas.



Particularmente, los canales tipo L se relacionan con la generación de crisis febriles, mientras que la pérdida de la función de canales tipo P/Q puede generar distonía y ataxia, agravando las crisis (**Zhang et al., 2019**). Los canales tipo N se encuentran distribuidos ampliamente en los núcleos de diferentes neuronas y en células de la glía, donde se puede observar una expresión aumentada luego del SE (**Xu et al., 2010**).

Como se muestra en la figura 2.5, la ESM y ZNS son capaces de bloquear selectivamente a los canales tipo T. Ciertos FAEs inhiben, como parte de un mecanismo secundario, estas corrientes de calcio, pero presentan otro mecanismo principal de acción, tal como el PB que actúa con los receptores de GABA tipo A (GABA<sub>A</sub>). Similarmente, tal como se muestra en la tabla 2.1, el VPA posee múltiples mecanismos por los cuales ejerce su actividad anticonvulsiva, entre los cuales se destaca la unión a la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) que aumenta la síntesis de GABA, pero subyace también el bloqueo de los canales de sodio y de los canales de calcio tipo T (**Abou-Khalil, 2019**).

#### *2.3.1.3. Canales de potasio*

La presencia de los canales de potasio en las células nerviosas es importante para limitar la excitabilidad de aquellas, contrarrestando el aumento del potencial de membrana provocado principalmente por la entrada de iones sodio (**Zhang et al., 2019**). En particular, estas células nerviosas expresan canales de potasio voltaje-operados (K<sub>v</sub>) y canales de potasio activados por calcio (K<sub>Ca</sub>), ambos implicados en el desarrollo de la epilepsia (**Wei et al., 2017; Zhang et al., 2019**). Existen 40 subtipos dentro de la familia K<sub>v</sub> que incluyen a los canales generadores de la corriente rectificadora de potasio, responsables de la fase de repolarización de los PAs, así como también otros tipos de canales (K<sub>v</sub>1, K<sub>v</sub>3, K<sub>v</sub>4 y KCNQ) que generan corrientes que juegan un importante rol en la regulación de la excitabilidad de neuronas presentes en regiones del cerebro (neocórtex e hipocampo) asociadas a la epilepsia (**Meldrum & Rogawski, 2007**).

Variantes mutacionales del gen KCNA1 codifica canales K<sub>v</sub> 1.1 defectuosos que dan origen a crisis parciales complejas, o mutaciones en el gen KCNQ2 presentes en



pacientes con convulsiones neonatales familiares benignas (**Wei et al., 2017**). Sin embargo, a pesar de que este tipo de canales están bien estudiados, aún no se han explorado lo suficiente desde el punto de vista farmacológico y sólo se conoce la RTG como fármaco capaz de activar a los canales de potasio tipo KCNQ (Fig. 2.5), además de modular la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub>. En algunos países, sin embargo, se retiró del mercado recientemente, ya que su uso prolongado se asoció a la aparición de una pigmentación azulada en la piel, uñas y retina (**Málaga et al., 2019**).

### 2.3.2. Modulación de canales iónicos activados por ligando

Los canales iónicos asociados a ligandos se abren en respuesta a la unión de diversos NT u otras moléculas, para poder continuar la transmisión del impulso nervioso. Esa unión se produce en un receptor estrechamente asociado al canal (receptor ionotrópico). Existen dos grandes superfamilias: los receptores *cys-loop* y los receptores ionotrópicos de glutamato. Los primeros incluyen el receptor GABA<sub>A</sub>, el receptor nicotínico, el receptor colinérgico, el receptor de glicina y el receptor de serotonina 3 (5-HT<sub>3</sub>), entre otros. Entre los receptores de glutamato más estudiados se encuentran los receptores del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y de N-metil-D-aspartato (NMDA) (**Meldrum & Rogawski, 2007**). Gran parte de los FAEs conocidos ejercen su acción a través de estos canales activados por ligando y, particularmente, la mayoría actúa sobre los receptores GABA<sub>A</sub> o sobre otras funciones GABAérgicas, y en menor medida, sobre los receptores de glutamato.

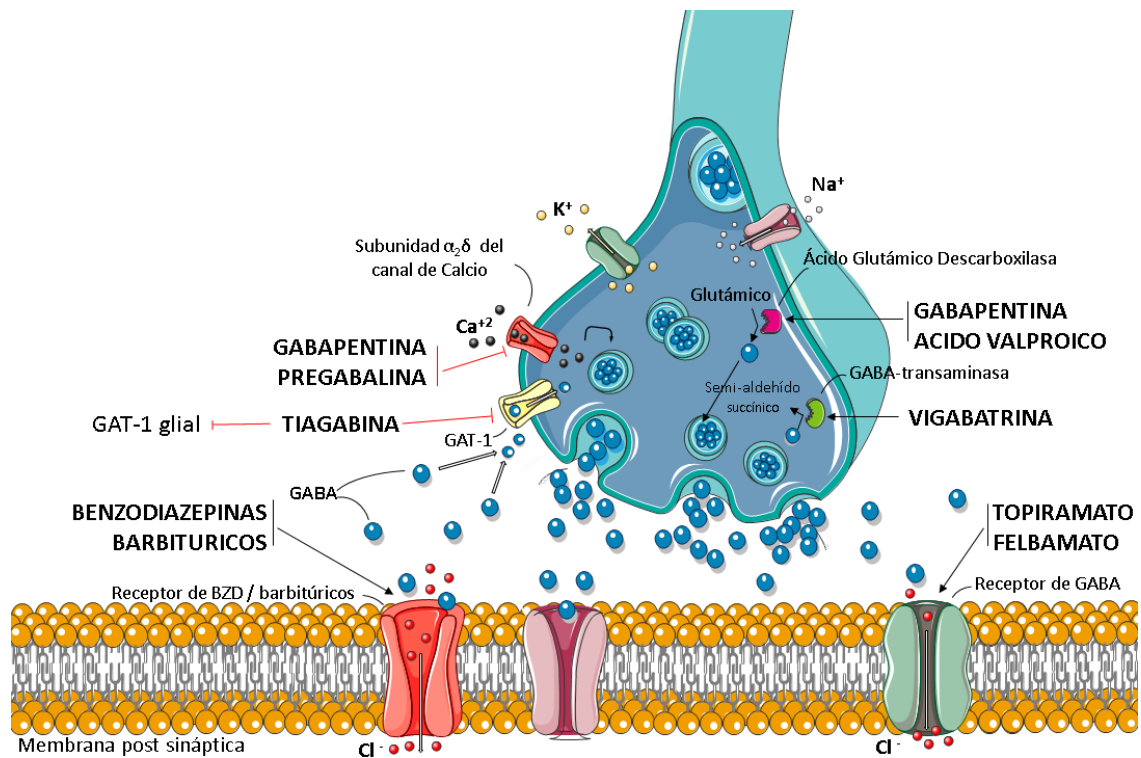
#### 2.3.2.1. Receptores de GABA<sub>A</sub>

En general, las sinapsis inhibitorias se rigen principalmente por los receptores de GABA<sub>A</sub>, los receptores de GABA tipo C (GABA<sub>C</sub>) y de glicina, los cuales están ampliamente expresados en el SNC e involucrados en distintas funciones fisiológicas, tales como el aprendizaje, la memoria y el control motor (**Maleeva et al., 2019**). El GABA se une a los receptores de GABA<sub>A</sub>, provocando la apertura de los canales de iones cloruro asociados





a ellos y generando una hiperpolarización de las neuronas postsinápticas por aumento de la corriente de estos iones (potencial postsináptico inhibitorio). La pérdida de la función de estos receptores conduce a importantes desórdenes, entre ellos la epilepsia. Diversas mutaciones en los genes que codifican el receptor de GABA<sub>A</sub> dan inicio a crisis febriles y diferentes tipos de epilepsia (Amundarain *et al.*, 2019).



**Figura 2.6** Mecanismos de acción de los FAEs que actúan sobre los distintos puntos clave de la neurotransmisión GABAérgica.

La actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> puede ser satisfactoriamente regulada por distintos moduladores alostéricos como, por ejemplo, las BZD y barbitúricos (Fig. 2.6) que actúan de manera directa sobre el receptor y, FBM y TPM que potencian la acción del GABA (Cotterman-Hart, 2015). Estos fármacos potencian la funcionalidad de estos receptores a través de diferentes sitios, resultando en un aumento de la inhibición frente a la propagación del impulso nervioso (Sieghart, 2015).



### 2.3.2.2. Receptores ionotrópicos de glutamato

Estos receptores, a diferencia de los anteriores, pertenecen a la superfamilia de canales catiónicos asociados a ligandos, la cual comprende los receptores postsinápticos AMPA y NMDA, además de los receptores de kainato. Todos los receptores ionotrópicos de glutamato son permeables tanto a sodio como a potasio, pero difieren en cuanto a su permeabilidad frente al calcio. En particular, los receptores NMDA son altamente permeables respecto al calcio, en cambio los receptores de kainato y de AMPA son permeables al sodio e impermeables al calcio (**Gaidin et al., 2019**).

La principal función de estos es mediar las sinapsis excitatorias en el SNC, por lo que estas vías se ven involucradas en la gran mayoría de las funciones del cerebro, pudiendo desencadenar tanto eventos presinápticos como postsinápticos (**Meldrum & Rogawski, 2007**). La liberación presináptica de glutamato da origen a una rápida despolarización de la membrana postsináptica y a diferentes procesos de señalización vinculados a características tales como la plasticidad relativa a la memoria y el aprendizaje (**Greger & Mayer, 2019**).

Si bien el glutamato es el NT predominante en las sinapsis excitatorias, su contribución a la epilepsia se debe al aumento de sus concentraciones extracelulares en especial luego de las crisis, lo que aumenta el daño neuronal asociado a las crisis y altera la expresión neuronal de los receptores de glutamato y de los recaptadores de este NT en las células de la glía (**Barker-Haliski & White, 2015**). Se ha demostrado que los receptores de NMDA y AMPA sufren cambios rápidos de sus actividades en respuesta a la hiperexcitación neuronal. Todavía más, se demostró que la actividad de los receptores de NMDA incrementa, mientras que la actividad de los receptores de AMPA disminuye luego de inducir la hiperexcitación (**Kosenkov et al., 2018**). Estos cambios contribuyen a la desestabilización neuronal y resultan a largo plazo en un estado de hiperexcitabilidad.

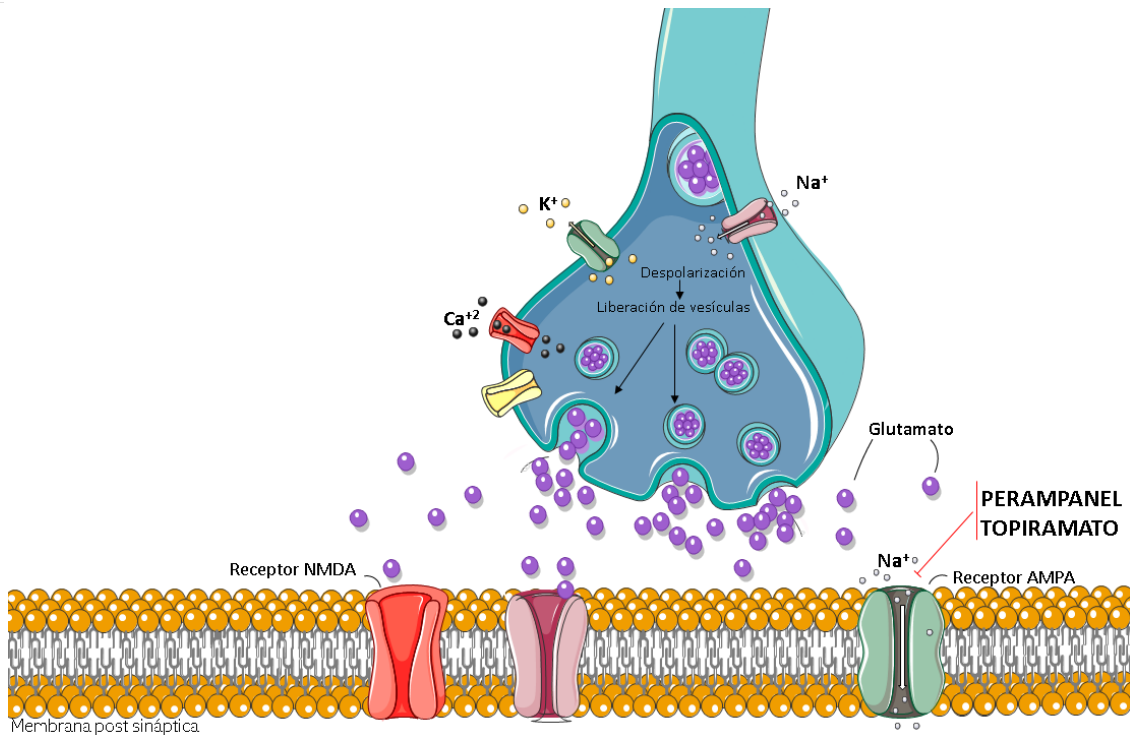


Figura 2.7 Mecanismo de acción sobre receptores de glutamato postsinápticos.

Pues bien, teniendo en cuenta el rol del glutamato sobre el desarrollo de las crisis y los efectos protectores de los antagonistas glutamatérgicos frente a los diferentes modelos animales, es de destacar la importancia de esta vía al momento de plantear el descubrimiento de fármacos. En 2012 la FDA aprobó la comercialización de PRP, un antagonista no competitivo del receptor AMPA, que ha demostrado actividad frente a los test de Máximo Electroshock (*Maximal Electroshock Seizure – MES*), de pentilentetrazol subcutáneo (PTZsc) y de 6 Hz (Rogawski & Hanada, 2013). Este fármaco se emplea como terapia adicional en el tratamiento de crisis de inicio parcial. De igual forma, el TPM se comporta también como antagonista de los receptores AMPA y de kainato, entre sus variados mecanismos de acción (Fig. 2.7).



### 2.3.3. Modificación de la actividad de receptores asociados a proteínas G

Otra manera de provocar la apertura de los canales iónicos es por interacción, mediante proteína G, con receptores que no se encuentran estrechamente asociados a éstos y que responden a la unión de ciertos NT. Particularmente en epilepsia, los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y los receptores de GABA tipo B (GABA<sub>B</sub>) juegan un papel importante en el control de la excitabilidad en las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas, respectivamente (**Meldrum & Rogawski, 2007**). Ambos se encuentran abundantemente expresados en las membranas presinápticas de neuronas de hipocampo, de amígdala y del circuito tálamo-cortical, induciendo su activación una disminución de la liberación de NT mediante la inhibición de las corrientes de calcio (**Girard et al., 2019**); aunque también se pueden encontrar en la membrana postsináptica.

Si bien estas vías están pobremente exploradas desde el punto de vista farmacológico en el campo de la epilepsia, se han reportado cambios acentuados en la expresión y función de los mGluR. Un ejemplo se representa mediante ratones *knock out* que no expresan el subtipo mGluR7 con ubicación presináptica y que presentan mayor susceptibilidad a las crisis y mayor excitabilidad cortical (**Sansig et al., 2001**). De acuerdo con el receptor sobre el cual actúan y la ubicación de estos, se han presentado distintos compuestos agonistas y antagonistas, pero sin embargo su acción anticonvulsiva sólo se ha limitado a ser demostrada en modelos animales (**Meldrum & Rogawski, 2007**).

Los receptores GABA<sub>B</sub> se localizan tanto en la membrana presináptica como postsináptica, y aunque su rol en la epilepsia aún no está claro, se cree que están involucrados en la epileptogénesis. A pesar de que distintos compuestos (anticonvulsivos y proconvulsivos) han demostrado tener diferentes efectos sobre estos receptores, no existen actualmente en la clínica fármacos que actúen sobre ellos (**Werner & Covenas, 2011**).



### 2.3.4. Modulación de transportadores/recaptación de neurotransmisores

Si hablamos de transportadores de NT, existen tres grandes grupos. Los transportadores vesiculares sirven para transportar específicamente NT dentro de las vesículas sinápticas con el fin de ser exocitados. Comprenden los transportadores de glutamato, GABA, glicina, acetilcolina y otras aminas. El segundo grupo lo conforman los transportadores de membrana, que regulan la actividad de los NT, tal como aquellos transportadores que secuestran GABA a partir de la hendidura sináptica hacia el interior de la célula. Estos generalmente están asociados a un transportador de iones que le provee la energía para el transporte. El último grupo está formado por aquellas proteínas que transportan glutamato y sustancias relacionadas a través de la membrana plasmática por acoplamiento con el gradiente de sodio (**Meldrum & Rogawski, 2007**).

De los transportadores anteriormente mencionados, importa destacar a un subtipo de transportador de GABA, comúnmente conocido como GAT-1, ubicado en las terminales nerviosas y en astrocitos, cuya función es recaptar aquel NT y limitar o finalizar con su actividad inhibitoria. TGB es un antagonista único altamente selectivo para GAT-1 (Fig. 2.6), que muestra gran actividad en los distintos modelos animales de convulsión y está indicado como terapia adicional de las crisis de inicio parcial. Muy pocos compuestos han sido reportados por su actividad como análogos de TGB debido a que presentan como principal efecto adverso la sedación e insomnio (**Xu et al., 2014**). Trabajos recientes han propuesto al fármaco liotironina, utilizado en terapias de reemplazo hormonal, como inhibidor de GAT-1 (**Jurik et al., 2015**).

### 2.3.5. Modulación de la actividad de proteínas presinápticas

La modulación de la actividad de las distintas proteínas presentes en las terminales presinápticas es relevante para el correcto funcionamiento de la transmisión sináptica. Particularmente, la proteína SV2A se encuentra en abundancia en las vesículas de las terminales nerviosas y a pesar de no ser indispensable para la liberación de NT,



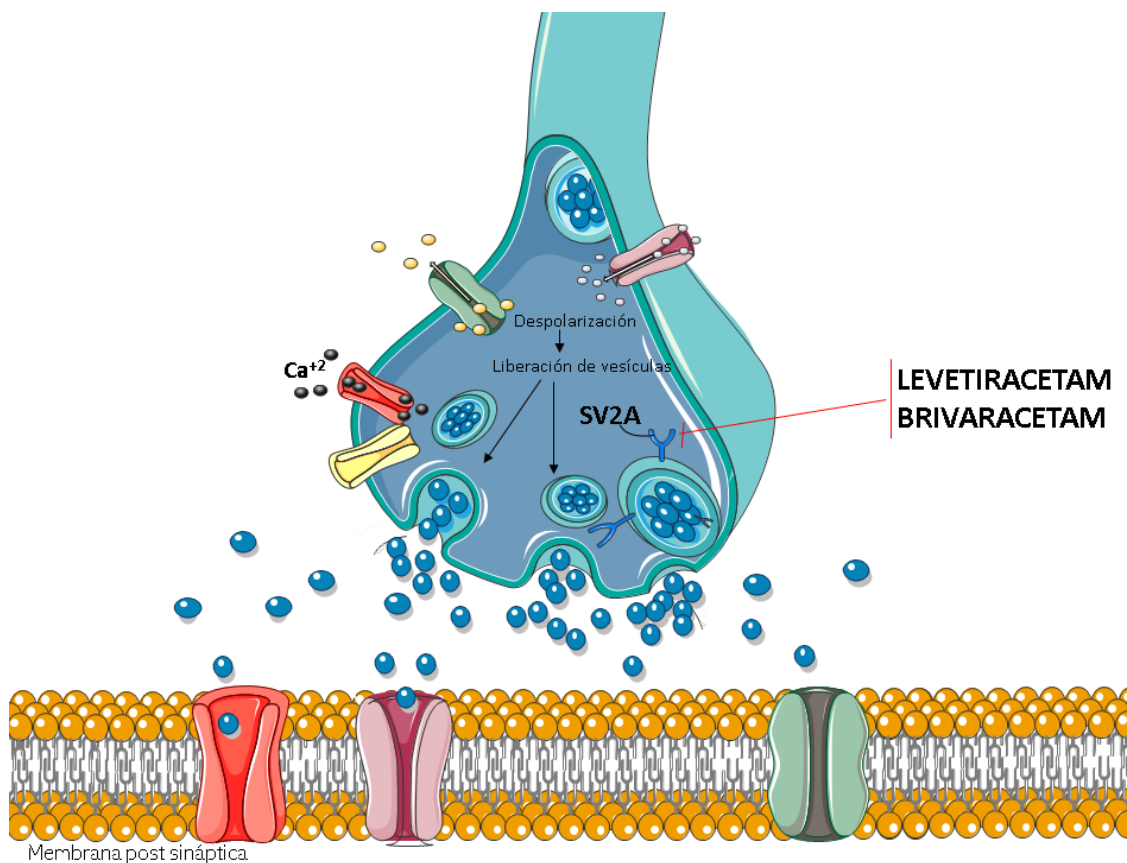
su presencia es fundamental para que la transmisión del impulso nervioso continúe su curso con normalidad (**Mendoza-Torreblanca et al., 2019**). Aunque aún las bases moleculares de la actividad de esta proteína no están completamente dilucidadas, algunas evidencias sugieren que tiene múltiples efectos reguladores en diferentes puntos del ciclo vesicular, pareciendo actuar durante la exocitosis por aumento de la cantidad de vesículas y durante la endocitosis modulando la internalización de la proteína sinaptotagmina 1 del sensor de calcio (**Ohno & Tokudome, 2017**). El PA implicado en la neurotransmisión GABAérgica se ve reducido por ausencia de SV2A, mientras que hay una marcada disminución de esta proteína durante la epileptogénesis y en pacientes con epilepsia crónica (**Hanaya et al., 2012**).

SV2A es el sitio de unión para los fármacos pertenecientes a la familia de los racetam: LEV, BRV y seletracetam. La eficacia de LEV como FAE fue corroborada por la FDA en 1999, cuando se aprobó para el tratamiento de las crisis de inicio parcial en adultos. Este fármaco se une a la isoforma de la proteína integral de membrana SV2A y, aunque Stout y colaboradores han descrito recientemente las funciones que lleva a cabo SV2A, nada se sabe aún sobre el rol específico que esta juega en la epilepsia (**Stout et al., 2019**). Además, se ha demostrado que LEV actúa sobre los canales de calcio tipo L (**Vogl et al., 2015**). En modelos animales de epilepsia espontánea e inducida, tal como ocurre en el modelo de 6 Hz, el LEV y sus análogos suprimen las crisis, pero a diferencia de otros FAEs no exhiben actividad protectora frente a las crisis inducidas por el ensayo de MES o PTZsc. En modelos animales, SV2A se distribuye de distinta manera dependiendo el estado de la epilepsia, ya sea agudo o crónico. En ratas epilépticas con epilepsia intratable, hay una menor distribución de SV2A en cerebro (**Hanaya et al., 2012**). Asimismo, en pacientes con epilepsia la expresión de SV2A se encuentra comúnmente reducida.

LEV se utiliza en formulaciones orales e intravenosas (IV) como antiepiléptico de amplio espectro, demostrando amplia eficacia como terapia complementaria para crisis focales, crisis tónico-clónicas generalizadas y crisis mioclónicas (**Cotterman-Hart, 2015; Abou-Khalil, 2019**). LEV en formulaciones IV se ha empleado como agente de segunda



línea en el tratamiento del SE. Por otra parte, su análogo BRV es de 15 a 30 veces más potente y selectivo, con mayor permeabilidad demostrada frente a la barrera hematoencefálica debido a su mayor carácter lipofílico (**Milovanović et al., 2017; Stephen & Brodie, 2018**). Además de actuar sobre SV2A, este fármaco presenta actividad sobre los VGSC. Somnolencia, mareos y fatiga son los efectos adversos más comunes que se presentan con la administración de esta familia de fármacos, aunque también pueden aparecer irritabilidad y depresión.



**Figura 2.8** Mecanismo de acción de Levetiracetam y Brivaracetam: Inhibición sobre la proteína vesicular sináptica 2A (SV2A).

Como ya se mencionó, las evidencias estudiadas hasta el momento indican que se requiere una expresión y función de SV2A normales para mantener la transmisión de señales a través de las neuronas, y que la falta de esta misma proteína o la pérdida de su función resulta en un aumento en la susceptibilidad de las crisis (**Stout et al., 2019**). Por ello, podemos considerar a SV2A como un blanco novedoso poco explorado para el desarrollo de nuevas drogas anticonvulsivas.





### 2.3.6. Modulación de la actividad de enzimas presinápticas

Las enzimas presentes en las terminales nerviosas están involucradas en diferentes mecanismos que regulan la transmisión del impulso nervioso. Luego de numerosos estudios, dos importantes enzimas se han reconocido como blanco de algunos FAEs: la enzima GABA transaminasa (GABA-T) y la anhidrasa carbónica (AC).

La GABA-T participa del catabolismo de GABA, dando como producto el ácido succínico (Fig. 2.6), luego de ser removido del espacio sináptico de manera de finalizar con su acción inhibitoria. La VGB se identificó como inhibidor irreversible de esta enzima, dando como resultado una potenciación de GABA respecto de la inhibición y, por ende, una prolongada actividad anticonvulsiva (**Abou-Khalil, 2019**). Este fármaco se utiliza como tratamiento de primera línea en espasmos infantiles y como terapia adicional en otros trastornos convulsivos, incluidas las crisis focales complejas reflexivas, epilepsia resistente al tratamiento y crisis generalizadas, entre otros (**Walters et al., 2019**).

La AC está presente en la sangre y en el cerebro, cumpliendo como función importante la regulación del pH intra y extracelular a través de la hidratación de  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCO}_3^-$  (**Villalba et al., 2016**). El desbalance en el pH produce cambios en la excitabilidad neuronal por despolarización de la membrana y alteración en la neurotransmisión GABAérgica (**Ruusuvuori & Kaila, 2014**). Los inhibidores de esta enzima se emplean como fármacos diuréticos y antiglaucomatosos, pero en los últimos años se ha estudiado su posible aplicación en el campo de la epilepsia (**Supuran, 2013**). Acetazolamida, TPM y ZNS entre sus tantos otros mecanismos, inhiben la AC.

### 2.3.7. Otros mecanismos

Año tras año, nuevos mecanismos se reportan como puntos clave de intervención en la fisiopatología de la epilepsia, llevando a una mayor comprensión de





aqueños procesos que dan origen a las crisis y permitiendo abordar este desorden neurológico multifactorial desde diversas perspectivas. Así, por ejemplo, se ha identificado que una variedad de procesos inflamatorios produce daño e inflamación del tejido neuronal, generando mayor susceptibilidad a las crisis (**Kambli *et al.*, 2017**). En estos procesos participan diferentes mediadores, tales como citoquinas, interleuquinas y prostaglandinas, que son posibles blancos terapéuticos de nuevas drogas anticonvulsivas (**Shimada *et al.*, 2014**). Los corticoesteroides, tales como la dexametasona, se han utilizado en el tratamiento de determinados tipos de epilepsia en pacientes pediátricos, ya que también están implicados en los procesos inflamatorios (**Herrera-Vázquez *et al.*, 2016**).

Otro blanco molecular interesante es la glicoproteína P (Pgp) y su relación en el desarrollo de la epilepsia. Particularmente, la sobreexpresión de este transportador de eflujo contribuye a la farmacorresistencia asociada a la epilepsia. Tratamientos complementarios con fármacos que prevengan esa sobreexpresión o inhiban la función de la Pgp, podrían ser útiles para ser empleados en pacientes con epilepsia refractaria (**Enrique *et al.*, 2019**). La inhibición de la Pgp puede realizarse de manera directa o bien, vía modulación del receptor de NMDA y mediante la acción de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (**Kambli *et al.*, 2017**).

Además de los anteriores, existen otros cuantos mecanismos implicados en el origen de las crisis y su progresión a la epilepsia, que podrían explorarse aún con mayor detalle con el propósito de descubrir nuevos agentes terapéuticos. Estos comprenden la modulación a través de nucleótidos cíclicos de canales activados por hiperpolarización, responsable de la generación de crisis focales y generalizadas (**Shah *et al.*, 2013**); la modulación de canales de potasio voltaje-operados  $K_v7$ , que contribuyen a la hiperexcitabilidad neuronal (**Seefeld *et al.*, 2018**); regulación de los procesos implicados en el stress oxidativo, específicamente a través del factor de transcripción Nrf2 (**Carmona-Aparicio *et al.*, 2015**); la modulación del cotransporte de Na-K-2Cl (NKCC1) y de K-Cl (KCC2), que parecen contribuir a la generación de las crisis mediante una despolarización mediada por GABA (**Löscher *et al.*, 2013**); la modulación de los



receptores purinérgicos, los cuales modulan a su vez la respuesta inflamatoria (Cieślak *et al.*, 2017); y la modulación de la diana de rapamicina en células de mamíferos mTOR (mammalian target of rapamycin en inglés), cuya activación excesiva se relaciona estrechamente a diferentes condiciones epileptogénicas (Citraro *et al.*, 2016).

## 2.4. Referencias

Abou-Khalil, B. W. (2019) 'Update on Antiepileptic Drugs 2019', *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 25(2), pp. 508–536. doi: 10.1212/CON.0000000000000715.

Amundarain, M. J. *et al.* (2019) 'GABA A receptor family: overview on structural characterization', *Future Medicinal Chemistry*, 11(3), pp. 229–245. doi: 10.4155/fmc-2018-0336.

Arzimanoglou, A. *et al.* (2010) 'The evolution of antiepileptic drug development and regulation', *Epileptic Disorders*, 12(1), pp. 3–15. doi: 10.1684/epd.2010.0303.

Barker-Haliski, M. and Steve White, H. (2015) 'Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 5(8), pp. 1–15. doi: 10.1101/cshperspect.a022863.

Behere, P. B., Das, A. and Behere, A. P. (2019) 'Antiepileptics', in *Clinical Psychopharmacology*. Singapore: Springer Singapore, pp. 117–130. doi: 10.1007/978-981-13-2092-7\_5.

Brodie, M. J. *et al.* (2011) 'Antiepileptic drug therapy: Does mechanism of action matter?', *Epilepsy and Behavior*. Elsevier Inc., 21(4), pp. 331–341. doi: 10.1016/j.yebeh.2011.05.025.

Carmona-Aparicio, L. *et al.* (2015) 'Overview of Nrf2 as Therapeutic Target in Epilepsy', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), pp. 18348–18367. doi: 10.3390/ijms160818348.

CHEN, G., WESTON, J. K. and BRATTON, A. C. (1963) 'Anticonvulsant Activity and Toxicity of Phensuximide, Methsuximide and Ethosuximide', *Epilepsia*, 4(1–4), pp. 66–76. doi: 10.1111/j.1528-1157.1963.tb05209.x.

Chen, Z. *et al.* (2018) 'Treatment Outcomes in Patients With Newly Diagnosed Epilepsy Treated With Established and New Antiepileptic Drugs', *JAMA Neurology*, 75(3), p. 279. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.3949.

Chu, V. *et al.* (2009) 'In Vitro and in Vivo Induction of Cytochrome P450: A Survey of the Current Practices and Recommendations: A Pharmaceutical Research and Manufacturers of America Perspective', *Drug Metabolism and Disposition*, 37(7), pp. 1339–1354. doi: 10.1124/dmd.109.027029.

Cieślak, M., Wojtczak, A. and Komoszyński, M. (2017) 'Role of the purinergic signaling in epilepsy', *Pharmacological Reports*, 69(1), pp. 130–138. doi: 10.1016/j.pharep.2016.09.018.



- Citraro, R. *et al.* (2016) 'mTOR pathway inhibition as a new therapeutic strategy in epilepsy and epileptogenesis', *Pharmacological Research*, 107, pp. 333–343. doi: 10.1016/j.phrs.2016.03.039.
- Cotterman-Hart, S. (2015) 'Antiepileptic Drugs', in *Epilepsy and Brain Tumors*. Elsevier, pp. 171–193. doi: 10.1016/B978-0-12-417043-8.00012-2.
- Denac, H., Mevissen, M. and Scholtysik, G. (2000) 'Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(6), pp. 453–479. doi: 10.1007/s002100000319.
- Elger, C. E. and Schmidt, D. (2008) 'Modern management of epilepsy: A practical approach', *Epilepsy & Behavior*, 12(4), pp. 501–539. doi: 10.1016/j.yebeh.2008.01.003.
- Enrique, A. V. *et al.* (2019) 'New anticonvulsant candidates prevent P-glycoprotein (P-gp) overexpression in a pharmaco-resistant seizure model in mice', *Epilepsy & Behavior*, p. 106451. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.106451.
- Gaidin, S. G. *et al.* (2019) 'Epileptiform activity promotes decreasing of Ca<sup>2+</sup> conductivity of NMDARs, AMPARs, KARs, and voltage-gated calcium channels in Mg<sup>2+</sup>-free model', *Epilepsy Research*, 158, p. 106224. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2019.106224.
- Gerlach, A. C. and Krajewski, J. L. (2010) 'Antiepileptic Drug Discovery and Development: What Have We Learned and Where Are We Going?', *Pharmaceuticals*, 3(9), pp. 2884–2899. doi: 10.3390/ph3092884.
- Girard, B. *et al.* (2019) 'The mGlu7 receptor provides protective effects against epileptogenesis and epileptic seizures', *Neurobiology of Disease*, 129, pp. 13–28. doi: 10.1016/j.nbd.2019.04.016.
- Greger, I. H. and Mayer, M. L. (2019) 'Structural biology of glutamate receptor ion channels: towards an understanding of mechanism', *Current Opinion in Structural Biology*, 57, pp. 185–195. doi: 10.1016/j.sbi.2019.05.004.
- Hanaya, R. *et al.* (2012) 'Low distribution of synaptic vesicle protein 2A and synaptotagmin-1 in the cerebral cortex and hippocampus of spontaneously epileptic rats exhibiting both tonic convulsion and absence seizure', *Neuroscience*, 221, pp. 12–20. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.058.
- Hanaya, R. and Arita, K. (2016) 'The New Antiepileptic Drugs: Their Neuropharmacology and Clinical Indications', *Neurologia medico-chirurgica*, 56(5), pp. 205–220. doi: 10.2176/nmc.ra.2015-0344.
- Herrera-Vázquez, O., Rojas, A. T. and Fleury, A. (2016) 'NEUROINFLAMACIÓN Y EPILEPSIA', *TIP*, 19(1), pp. 24–31. doi: 10.1016/j.recqb.2016.02.003.
- Ilangaratne, N. B. *et al.* (2012) 'Phenobarbital: missing in action', *Bulletin of the World Health Organization*, 90(12), pp. 871-871A. doi: 10.2471/BLT.12.113183.
- Jacob, S., Nair, A. B. and Shah, J. (2019) 'Revisiting clinical practice in therapeutic drug monitoring



of first-generation antiepileptic drugs', *Drugs & Therapy Perspectives*, 35(10), pp. 500–517. doi: 10.1007/s40267-019-00662-4.

Jaime, P. (2013) '¿Qué aportan los nuevos fármacos antiepilépticos?', *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(6), pp. 995–1003. doi: 10.1016/S0716-8640(13)70254-2.

Jensen, J. P. A. (2006) 'The Rise and Fall of Borax as an Antiepileptic Drug', *Archives of Neurology*, 63(4), p. 621. doi: 10.1001/archneur.63.4.621.

Jurik, A. *et al.* (2015) 'A Binding Mode Hypothesis of Tiagabine Confirms Liothyronine Effect on  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Transporter 1 (GAT1)', *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(5), pp. 2149–2158. doi: 10.1021/jm5015428.

Kambli, L. *et al.* (2017) 'Novel therapeutic targets for epilepsy intervention', *Seizure*, 51, pp. 27–34. doi: 10.1016/j.seizure.2017.07.014.

Korinthenberg, R. *et al.* (2007) 'Pharmacology, Efficacy, and Tolerability of Potassium Bromide in Childhood Epilepsy', *Journal of Child Neurology*, 22(4), pp. 414–418. doi: 10.1177/0883073807302758.

Kosenkov, A. M. *et al.* (2018) 'Fast changes of NMDA and AMPA receptor activity under acute hyperammonemia in vitro', *Neuroscience Letters*, 686, pp. 80–86. doi: 10.1016/j.neulet.2018.08.054.

KOZOL, H. L. (1946) 'Epilepsy; Treatment with new drug: 3-methyl 5,5-phenyl-ethyl-hydantoin', *American Journal of Psychiatry*, 103(2), pp. 154–158. doi: 10.1176/ajp.103.2.154.

Krall, R. L. *et al.* (1978) 'Antiepileptic Drug Development: II. Anticonvulsant Drug Screening', *Epilepsia*, 19(4), pp. 409–428. doi: 10.1111/j.1528-1157.1978.tb04507.x.

Lee, B. I. *et al.* (2019) 'Clinical opinion: Earlier employment of polytherapy in sequential pharmacotherapy of epilepsy', *Epilepsy Research*. Elsevier B.V., p. 106165. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2019.106165.

Li, T. and Chen, J. (2018) 'Voltage-Gated Sodium Channels in Drug Discovery', in *Ion Channels in Health and Sickness*. InTech. doi: 10.5772/intechopen.78256.

Livingston, S. (1953) 'The use of hibicon in the treatment of epilepsy', *The Journal of Pediatrics*, 43(6), pp. 673–674. doi: 10.1016/S0022-3476(53)80310-0.

Löscher, W., Puskarjov, M. and Kaila, K. (2013) 'Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments', *Neuropharmacology*, 69, pp. 62–74. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.05.045.

Löscher, W. and Schmidt, D. (2011) 'Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma', *Epilepsia*. John Wiley & Sons, Ltd, 52(4), pp. 657–678. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03024.x.

Málaga, I. *et al.* (2019) 'Nuevos fármacos antiepilépticos en Pediatría', *Anales de Pediatría*, 91(6), pp. 415.e1-415.e10. doi: 10.1016/j.anpedi.2019.09.008.



- Maleeva, G. *et al.* (2019) 'A photoswitchable GABA receptor channel blocker', *British Journal of Pharmacology*, 176(15), pp. 2661–2677. doi: 10.1111/bph.14689.
- Meldrum, B. S. and Rogawski, M. A. (2007) 'Molecular targets for antiepileptic drug development', *Neurotherapeutics*, 4(1), pp. 18–61. doi: 10.1016/j.nurt.2006.11.010.
- Mendoza-Torreblanca, J. G. *et al.* (2019) 'Analysis of Differential Expression of Synaptic Vesicle Protein 2A in the Adult Rat Brain', *Neuroscience*. Elsevier Ltd, 419, pp. 108–120. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.09.004.
- Mercadé Cerdá, J. M. *et al.* (2015) 'Pronóstico de la epilepsia. Inicio del tratamiento crónico farmacológico', *Neurología*, 30(6), pp. 367–374. doi: 10.1016/j.nrl.2014.03.003.
- Merritt, H. H. (1938) 'Sodium Diphenyl Hydantoinate in the Treatment of Convulsive Disorders', *Journal of the American Medical Association*, 111(12), p. 1068. doi: 10.1001/jama.1938.02790380010004.
- Milovanović, J. R. *et al.* (2017) 'Evaluation of brivaracetam: a new drug to treat epilepsy', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(13), pp. 1381–1389. doi: 10.1080/14656566.2017.1359260.
- Ohno, Y. and Tokudome, K. (2017) 'Therapeutic Role of Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) in Modulating Epileptogenesis', *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 16(4). doi: 10.2174/1871527316666170404115027.
- Palestro, P. H. *et al.* (2018) 'Searching for New Leads To Treat Epilepsy: Target-Based Virtual Screening for the Discovery of Anticonvulsant Agents', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(7), pp. 1331–1342. doi: 10.1021/acs.jcim.7b00721.
- Perucca, E. (2015) 'Introduction to the Choice of Antiepileptic Drugs', in *The Treatment of Epilepsy*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 365–375. doi: 10.1002/9781118936979.ch27.
- Perucca, E. (2019) 'Antiepileptic drugs: evolution of our knowledge and changes in drug trials', *Epileptic Disorders*. John Libbey, 21(4), pp. 319–329. doi: 10.1684/epd.2019.1083.
- Riss, J. *et al.* (2008) 'Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics', *Acta Neurologica Scandinavica*, 118(2), pp. 69–86. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01004.x.
- Rogawski, M. A. and Hanada, T. (2013) 'Preclinical pharmacology of perampanel, a selective non-competitive AMPA receptor antagonist', *Acta Neurologica Scandinavica*, 127, pp. 19–24. doi: 10.1111/ane.12100.
- Ruusuvuori, E. and Kaila, K. (2014) 'Carbonic Anhydrases and Brain pH in the Control of Neuronal Excitability', in pp. 271–290. doi: 10.1007/978-94-007-7359-2\_14.
- SANDS, I. J. (1921) 'LUMINAL THERAPY IN THE CONTROL OF EPILEPTIC SEIZURES', *Archives of Neurology And Psychiatry*, 5(3), p. 305. doi: 10.1001/archneurpsyc.1921.02180270081005.
- Sankey, W. (1861) 'Beneficial Effects of Belladonna as a Sedative in Epilepsy', *BMJ*, 1(12), pp. 302–303. doi: 10.1136/bmj.1.12.302.
- Sansig, G. *et al.* (2001) 'Increased Seizure Susceptibility in Mice Lacking Metabotropic Glutamate



Receptor 7', *The Journal of Neuroscience*, 21(22), pp. 8734–8745. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-22-08734.2001.

Santulli, L. *et al.* (2016) 'The challenges of treating epilepsy with 25 antiepileptic drugs', *Pharmacological Research*, 107, pp. 211–219. doi: 10.1016/j.phrs.2016.03.016.

Sciarra, D. (1954) 'CLINICAL EVALUATION OF PRIMIDONE (MYSOLINE), NEW ANTICONVULSANT DRUG', *Journal of the American Medical Association*, 154(10), p. 827. doi: 10.1001/jama.1954.02940440025007.

Seefeld, M. A. *et al.* (2018) 'Novel KV7 ion channel openers for the treatment of epilepsy and implications for detrusor tissue contraction', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(23–24), pp. 3793–3797. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.09.036.

Shah, M. M., Huang, Z. and Martinello, K. (2013) 'HCN and KV7 (M-) channels as targets for epilepsy treatment', *Neuropharmacology*, 69, pp. 75–81. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.03.005.

Shimada, T. *et al.* (2014) 'Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Epilepsy', *Mediators of Inflammation*, 2014, pp. 1–8. doi: 10.1155/2014/901902.

Shorvon, S. D. (2009a) 'Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The first 50 years, 1909-1958', *Epilepsia*, 50, pp. 69–92. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02041.x.

Shorvon, S. D. (2009b) 'Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The second 50 years, 1959-2009', *Epilepsia*, 50, pp. 93–130. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02042.x.

Sieghart, W. (2015) 'Allosteric Modulation of GABAA Receptors via Multiple Drug-Binding Sites', in, pp. 53–96. doi: 10.1016/bs.apha.2014.10.002.

Sieveking, E. (1858) 'On epilepsy and epileptiform seizures: their causes, pathology, and treatment', *Journal of Psychological Medicine and Mental Pathology*, 11(12), pp. 631–635.

Simms, B. A. and Zamponi, G. W. (2014) 'Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction', *Neuron*, 82(1), pp. 24–45. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.016.

Staley, K. J. (2002) 'Diuretics as Antiepileptic Drugs: Should We Go with the Flow?', *Epilepsy Currents*, 2(2), pp. 35–38. doi: 10.1046/j.1535-7597.2002.00018.x.

Stephen, L. J. and Brodie, M. J. (2011) 'Pharmacotherapy of Epilepsy', *CNS Drugs*, 25(2), pp. 89–107. doi: 10.2165/11584860-000000000-00000.

Stephen, L. J. and Brodie, M. J. (2018) 'Brivaracetam: a novel antiepileptic drug for focal-onset seizures', *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, p. 175628561774208. doi: 10.1177/1756285617742081.

Stout, K. A. *et al.* (2019) 'The Synaptic Vesicle Glycoprotein 2: Structure, Function, and Disease Relevance', *ACS Chemical Neuroscience*, 10(9), pp. 3927–3938. doi: 10.1021/acscemneuro.9b00351.

Supuran, C. T. (2013) 'Carbonic anhydrases: from biomedical applications of the inhibitors and





activators to biotechnological use for CO<sub>2</sub> capture', *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(2), pp. 229–230. doi: 10.3109/14756366.2013.761876.

Troupin, A. S., Ojemann, L. M. and Dodrill, C. B. (1976) 'Mephenytoin: A Reappraisal', *Epilepsia*, 17(4), pp. 403–414. doi: 10.1111/j.1528-1157.1976.tb04452.x.

Villalba, M. L. *et al.* (2016) 'Sulfamide derivatives with selective carbonic anhydrase VII inhibitory action', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(4), pp. 894–901. doi: 10.1016/j.bmc.2016.01.012.

Vogl, C. *et al.* (2015) 'Synaptic vesicle glycoprotein 2A modulates vesicular release and calcium channel function at peripheral sympathetic synapses', *European Journal of Neuroscience*, 41(4), pp. 398–409. doi: 10.1111/ejn.12799.

Walters, D. C. *et al.* (2019) 'Metabolomic analyses of vigabatrin (VGB)-treated mice: GABA-transaminase inhibition significantly alters amino acid profiles in murine neural and non-neural tissues', *Neurochemistry International*, 125, pp. 151–162. doi: 10.1016/j.neuint.2019.02.015.

Wei, F. *et al.* (2017) 'Ion Channel Genes and Epilepsy: Functional Alteration, Pathogenic Potential, and Mechanism of Epilepsy', *Neuroscience Bulletin*, 33(4), pp. 455–477. doi: 10.1007/s12264-017-0134-1.

Weinstein, A. W. (1966) 'Ethosuximide Treatment of Petit Mal Seizures', *American Journal of Diseases of Children*, 111(1), p. 63. doi: 10.1001/archpedi.1966.02090040099011.

Werner, F.-M. and Covenas, R. (2011) 'Classical Neurotransmitters and Neuropeptides Involved in Generalized Epilepsy: A Focus on Antiepileptic Drugs', *Current Medicinal Chemistry*, 18(32), pp. 4933–4948. doi: 10.2174/092986711797535191.

World Health Organization (1990) 'Initiative of support to people with epilepsy'. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/61822>.

Xu, J. H. *et al.* (2010) 'Nuclear localization of Ca<sub>v</sub> 2.2 and its distribution in the mouse central nervous system, and changes in the hippocampus during and after pilocarpine-induced status epilepticus', *Neuropathology and Applied Neurobiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 36(1), pp. 71–85. doi: 10.1111/j.1365-2990.2009.01044.x.

Xu, X.-H. *et al.* (2014) 'GABA transporter-1 inhibitor NO-711 alters the EEG power spectra and enhances non-rapid eye movement sleep during the active phase in mice', *European Neuropsychopharmacology*, 24(4), pp. 585–594. doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.09.002.

Zaccara, G. and Perucca, E. (2014) 'Interactions between antiepileptic drugs, and between antiepileptic drugs and other drugs', *Epileptic Disorders*, 16(4), pp. 409–431. doi: 10.1684/epd.2014.0714.

Zhang, S. *et al.* (2019) 'Ion Channels in Epilepsy: Blasting Fuse for Neuronal Hyperexcitability', in *Epilepsy - Advances in Diagnosis and Therapy*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.83698.







# CAPÍTULO 3

## MODELOS ANIMALES





## Capítulo 3: Modelos Animales

### 3.1. Evaluación de Anticonvulsivos en Modelos Animales

Un modelo animal intenta describir algún fenómeno biológico estudiado en una especie que, idealmente, resulte cómoda para la manipulación y que represente con la mayor similitud posible a aquella otra especie objetivo que se quiere estudiar (**van der Staay, 2006**). Los modelos animales no sólo permiten un manejo más cómodo durante el estudio, sino también un mejor control de las variables que podrían llegar a condicionar el resultado. Dichos modelos se pueden agrupar en diferentes categorías, entre las cuales están los modelos inducidos, los modelos espontáneos (que surgen de mutaciones espontáneas) y los modelos genéticamente modificados (**Hau, 2008**). Tal como veremos más adelante, durante el desarrollo de este trabajo de tesis hemos optado por un modelo inducido para poder validar experimentalmente nuestra selección asistida por computadora de candidatos anticonvulsivos.

Un requisito esencial para mejorar el éxito durante la búsqueda de fármacos es la disponibilidad de modelos animales con alta capacidad predictiva. Para la evaluación de un compuesto promisorio, los modelos animales se seleccionan, diseñan y conducen cuidadosamente, siendo una de las etapas más importante y crítica de cualquier proyecto de descubrimiento de fármacos (**Ericsson et al., 2013; Löscher, 2017**). Se consideran modelos animales válidos aquellos que son capaces de reproducir total o parcialmente las características clínicas de la enfermedad, para luego intentar trasladar los resultados y conclusiones obtenidos a un sistema más complejo como el ser humano o a otras especies animales. Particularmente en epilepsia, existen modelos de crisis epiléptica con alta capacidad predictiva y un exitoso historial clínico derivado de esos modelos (**Denayer et al., 2014**). Los distintos modelos se emplean con diferentes propósitos, entre ellos no sólo para identificar novedosos compuestos anticonvulsivos y evaluar la eficacia específica frente a uno o varios tipos de crisis o epilepsias, sino también para conocer si el nuevo fármaco presenta ventajas respecto a aquellos FAEs que se encuentran ya en el mercado (**Löscher, 2011**).



A pesar de que los avances bioquímicos y neurofisiológicos a nivel celular han permitido la identificación de blancos moleculares para los FAEs, no es aún posible que las evaluaciones *in vitro* reemplacen los ensayos de screening en modelos animales. Los sistemas *in vitro* no pueden modelar en su totalidad el proceso fisiopatológico subyacente ni los procesos farmacodinámicos específicos requeridos para la protección de las crisis, los cuales además del blanco molecular incluyen distintas biomoléculas que podrían causar efectos colaterales o más bien interferir con la actividad deseada. Además, nada dicen los ensayos *in vitro* sobre la biodisponibilidad, que en este caso impone el pasaje de las moléculas de fármaco a través de la barrera hematoencefálica, entre otras características (**Castel-Branco et al., 2009**).

Estos modelos incluyen cortes de tejido cerebral de roedores, cultivos de células provenientes del SNC de diferentes especies y preparaciones de tejidos cerebrales intactos. La actividad epileptiforme en este tipo de modelos puede ser provocada por alguna alteración iónica o farmacológica en preparaciones de animales no tratados previamente; o utilizando tejidos de animales que han sufrido un ataque epileptogénico; o bien, mediante el empleo de modelos genéticos de epilepsia con un fenotipo *in vitro* (**Raimondo et al., 2017**). En general, los cortes de cerebro poseen la ventaja de retener la arquitectura del tejido, con la presencia de receptores y sistemas celulares relevantes y, no menos importante, la conectividad entre las áreas. Si bien en éstos se pueden controlar las condiciones externas y manipular cuidadosamente los cortes de tejido, los mecanismos involucrados en la inducción de los eventos tipo crisis son altamente variables (**Grainger et al., 2018**). Algunas de las desventajas asociadas, la dificultad de extrapolación a otras especies que reduce la utilidad de los modelos *ex vivo*, como así también los altos costos que insume el mantenimiento de los cortes. En contraste con este tipo de modelos, se presentan los cultivos de corte organotípicos, los cuales son mantenidos *in vitro* por un tiempo prolongado en condiciones adecuadas. De esta manera, requieren de un medio de cultivo provisto de factores de crecimiento esenciales, hormonas y metabolitos. En general, los cultivos incluyen células de diferentes regiones del cerebro incluyendo el hipocampo, córtex, cerebelo y estructuras del tronco encefálico, para las cuales se retienen las propiedades intrínsecas de



conectividad en el tejido. Se recuperan ampliamente luego de un insulto y son particularmente utilizados para evaluar efectos a largo plazo. Sin embargo, estos cultivos son muy sensibles a la variabilidad de las condiciones de cultivo y al tiempo que lleva mantenido *in vitro* (**Raimondo et al., 2017**).

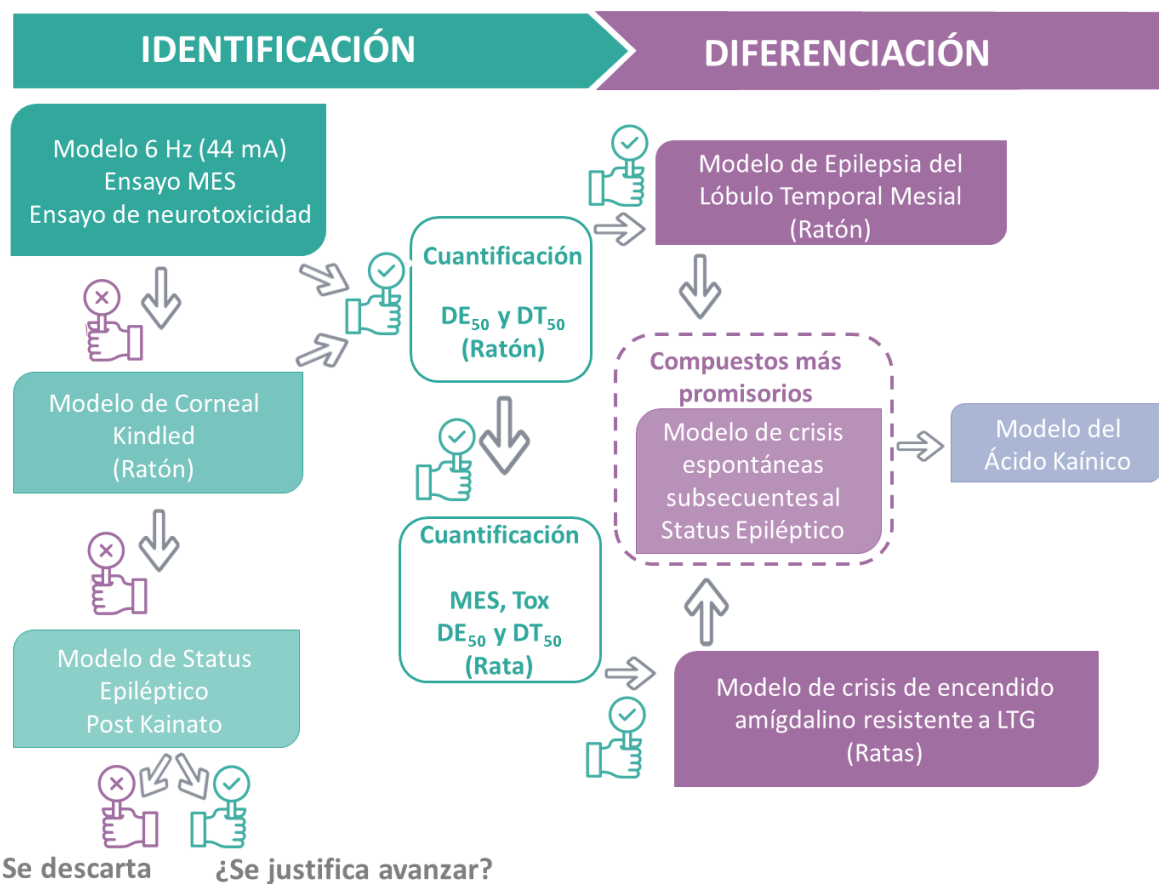
Algunos modelos *in vitro* involucran el hipocampo o cerebro entero, los cuales se emplean en estudios electrofisiológicos o de imagen. En estos se preserva la integridad celular, así como también la conectividad en todo el tejido completo (**Raimondo et al., 2017**). La principal limitación es la oxigenación del tejido, para lo cual se necesitan cámaras de perfusión especiales para llegar a oxigenar las partes profundas. Por otra parte, consideraciones y consentimientos éticos limitan la utilización de tejido cerebral humano, por lo que cultivos de células madre humanas representan una alternativa viable, que permite a los investigadores generar redes neuronales funcionales para evaluación de drogas con alto rendimiento (**Grainger et al., 2018**).

En los últimos 80 años, los modelos animales han sido muy útiles para identificar nuevos agentes terapéuticos candidatos a ser utilizados en el tratamiento de la epilepsia (**Löscher, 2017**). Diferentes fármacos anticonvulsivantes que se introdujeron en el mercado farmacéutico fueron identificados mediante la evaluación en modelos animales convencionales de crisis aguda, las pruebas de MES y de PTZsc (**Wang & Chen, 2019**). La evidencia clínica sugiere, sin embargo, que mediante los mencionados modelos se dificulta la identificación de terapias eficaces en pacientes farmacorresistentes; por ello, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (*National Institute of Health, NIH*) ha propuesto en los últimos años un nuevo protocolo en el marco del Programa de Screening de la Terapia de Epilepsia (ETSP, por sus siglas en inglés) para fomentar y facilitar la identificación de compuestos con perfiles farmacológicos novedosos, ayudando por otro lado a comprender cuáles son los mecanismos básicos fisiopatológicos desencadenantes de las crisis (<https://panache.ninds.nih.gov/>, último acceso septiembre 2019; **Kehne et al., 2017**). Este Programa pone el foco en la detección de nuevos fármacos que aborden las



necesidades médicas insatisfechas en epilepsia, específicamente la epilepsia farmacorresistente, la epileptogénesis y la progresión de la enfermedad (**Wilcox et al., 2019**).

Tal como se esquematiza en la figura 3.1, el protocolo comprende una fase inicial de identificación, seguida de una fase de diferenciación. La evaluación de los nuevos candidatos en etapas tempranas del Programa permite seleccionar aquellos compuestos que resultan promisorios, mientras se descartan aquellos que poseen poca o nula actividad (**White et al., 2006**).



**Figura 3.1** Diagrama de flujo sobre la evaluación de compuestos candidatos a anticonvulsivos en modelos animales. Adaptado de <https://panache.ninds.nih.gov/CurrentModels.aspx>. DE<sub>50</sub>: dosis efectiva 50; DT<sub>50</sub>: dosis tóxica 50; MES: Maximal Electroshock Seizure Test; Tox: Test de Toxicidad; LTG: Lamotrigina. El ensayo PTZsc sólo se lleva a cabo si se justifica.

En la fase I se realiza una evaluación cualitativa de la actividad anticonvulsivante: los candidatos son evaluados en dos modelos de crisis aguda en ratones normales, con



el fin de clasificarlos según el nivel de actividad anticonvulsiva y establecer la posible neurotoxicidad. Para ello, se realizan el ensayo MES y el modelo de 6 Hz a 44 mA para crisis parciales, y el test de Rotorod (**Deacon, 2013**) o el test de la chimenea (**Fréchu et al., 2019**). Siempre que se justifique también se evalúan los compuestos frente al modelo de crisis provocadas por PTZsc. Los compuestos promisorios se administran por vía intraperitoneal (i.p.) a las dosis propuestas de 30, 100 y 300 mg/kg, y se evalúan a diferentes tiempos, 30 minutos y 2 horas, pudiendo ajustarse estos valores según otros datos de bibliografía. Asimismo, la neurotoxicidad de los compuestos se pone en manifiesto en los ensayos del Rotorod y la chimenea mediante signos de ataxia y sedación. Luego de evaluar un compuesto en los modelos mencionados, usualmente se ensaya en el modelo MES en ratas. Para evitar descartar compuestos con mecanismos de acción novedosos, que no sean efectivos frente a las pruebas de MES o de 6 Hz, el programa propone ensayos adicionales a la fase de identificación como el modelo de encendido corneal en ratones y un ensayo *in vitro*, en el cual se evalúa la actividad del compuesto en un corte cerebral de hipocampo aislado de ratas epilépticas encendidas con kainato (**Rho & White, 2018**). De acuerdo con los resultados de la fase I, los compuestos se clasifican en distintas categorías, como se muestra en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Clasificación de los compuestos en cuatro categorías en la fase I. De acuerdo con la dosis a la cual muestran actividad y a su neurotoxicidad, se prosigue a la siguiente etapa de evaluación.

Categoría	Actividad - Dosis	Neurotoxicidad	Evaluación en fase II
I	≤ 100 mg/kg	No	Si
II	300 mg/kg	No	Si justifica
III	≥ 300 mg/kg	No	No
IV	≤ 100 mg/kg	Si	No

En la fase II se determina cuantitativamente la actividad anticonvulsiva en ratones a través de diferentes parámetros. Se determina la dosis efectiva 50% (DE<sub>50</sub>), el tiempo de efecto máximo (TEM), el tiempo de toxicidad máxima (TTM) y la dosis tóxica



50% (DT<sub>50</sub>) en el test de Rotorod. Las DE<sub>50</sub> y DT<sub>50</sub> se utilizan para estimar del Índice de Protección ( $IP = DE_{50}/DT_{50}$ ). Las fases siguientes del Programa comprenden la determinación del perfil de toxicidad por vía oral, la elucidación del mecanismo de acción, el efecto de la administración prolongada de los fármacos, entre otros estudios avanzados (**Enrique, 2016; Kehne *et al.*, 2017**).

Como hemos mencionado, los anteriores ensayos se realizan en animales sanos. Si bien la sensibilidad de los ratones normales frente a los anticonvulsivos puede ser diferente a la de los animales epilépticos, los modelos agudos ofrecen ciertas ventajas: (1) Son adecuados para la detección rutinaria de un gran número de posibles anticonvulsivos; (2) Los modelos inducidos son menos costosos que los modelos genéticos; (3) Los ratones con epilepsia genética están asociados a una mayor tasa de falsos positivos cuando se utilizan para el screening de fármacos; (4) La base de datos histórica de evaluaciones farmacológicas en animales normales es extremadamente grande y permite comparaciones a gran escala (**Stables & Kupferberg, 2005**).

En este capítulo se describen los modelos animales más frecuentemente utilizados en el marco del protocolo del NIH y empleados en nuestro laboratorio, y una pequeña reseña general de los restantes modelos que recomienda el ETSP. Finalmente, con mayor detalle, se explica el modelo que atañe a este trabajo de tesis, el modelo de crisis aguda de 6 Hz.

## 3.2. Buenas prácticas de bienestar animal en modelos animales

La utilización de animales para la práctica de investigación debe estar correctamente fundamentada, de acuerdo con los objetivos que se persigan y los beneficios que se prevean a partir de esa investigación. Es allí donde se deben tener en cuenta las buenas prácticas de uso y bienestar animal, de manera de poder identificar posibles daños al animal de experimentación, minimizando aquellos inevitables y eliminando aquellos evitables (**Jefferys, 2017**). En modelos de crisis agudas y de





epilepsia donde el daño producido por la inducción de las crisis es inevitable, la relación costo-beneficio debe evaluarse cuidadosamente.

En 2011, el NIH en su sección de Ética y Uso Animal publicó la Guía del Consejo Nacional de Recursos para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (*National Resources Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*), donde propone:

*“La utilización de animales en investigación requiere de un pensamiento crítico (...) El uso de animales de experimentación es un privilegio otorgado por la sociedad a la comunidad científica con la expectativa de que dicho uso proporcionará nuevos conocimientos significativos o conducirá a una mejora en el bienestar humano y/o animal...” (National Resources Council, 2011).*

En 1959, Russell y Burch generaron un hito en la investigación sobre el uso de animales de experimentación imponiendo el concepto de las 3Rs: **reemplazo, refinamiento y reducción** de los animales en investigación (**Russell & Burch, 1959**).

El principio de reemplazo constituye un gran avance con respecto al cribado de nuevas drogas estudiadas para una determinada patología y a los estudios de toxicidad. Muchos de los ensayos que se realizaban y realizan en animales, pueden ser reemplazados por estudios *in vitro* adecuadamente validados, obteniendo la información deseada en un sistema más sencillo, por ejemplo un cultivo celular, y evitando el sufrimiento animal innecesario (**Burch, 2009**). Por otra parte, el reemplazo también puede realizarse, en alguna medida, mediante el uso de modelos computacionales estrictamente validados (**Jefferys, 2017**). En lo que refiere a la investigación en epilepsia, un ejemplo de reemplazo es el uso creciente de células madre pluripotenciales inducibles extraídas de personas con epilepsia de origen genético, para investigar los fenotipos (**Muotri, 2009; Grainger et al., 2018**).

Cuando se habla de reducción, nos referimos a la minimización del número de animales de experimentación que se utilizan en cada experimento, cuidando que el



número reducido sea, sin embargo, lo suficientemente grande para obtener conclusiones confiables desde el punto de vista estadístico (**Jefferys, 2017**).

Por último, el principio de refinamiento supone el diseño de protocolos que minimicen el sufrimiento experimentado por los animales que forman parte del estudio. El sufrimiento está definido bajo los conceptos de dolor, angustia, sufrimiento y/o daño duradero (**Jefferys, 2017**). Para ello se ha definido el punto final humanitario teniendo en cuenta las características del modelo y del daño o sufrimiento que experimenta.

Existen diferentes comités de ética a nivel internacional, cuyo propósito es establecer ciertas reglas y recomendaciones para llevar a cabo protocolos de buenas prácticas para el uso y bienestar de los animales de experimentación (**Tannenbaum, 2017**). Por ejemplo, en modelos de epilepsia en roedores, recomendaciones sobre el refinamiento y bienestar fueron detalladas por el Centro para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Investigación (NC3Rs), la cual es una organización científica fundada por el gobierno de Reino Unido (**Lidster et al., 2016**).

En relación con nuestro trabajo, los ensayos en animales fueron realizados bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP (*ver Anexo 4 del Material Suplementario*).

### 3.3. Modelos de convulsiones agudas

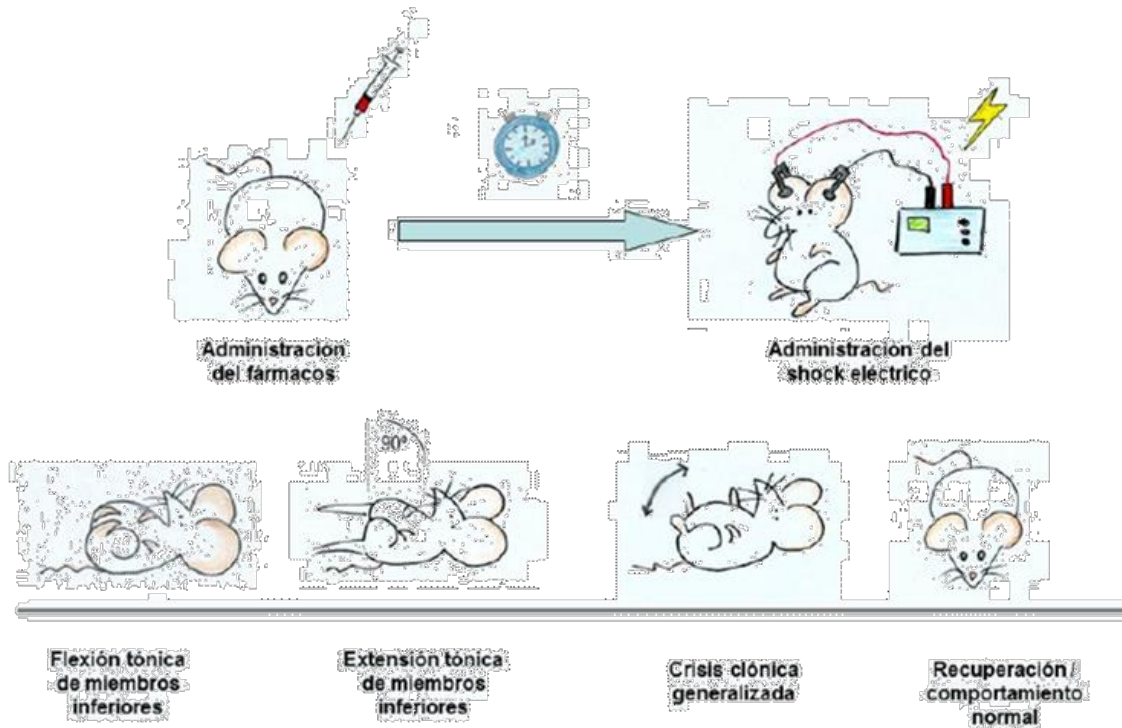
Los modelos de crisis agudas se utilizan para identificar la actividad farmacológica de un compuesto promisorio. Son los ensayos más simples donde se induce una crisis en animales sanos no epilépticos, ya sea mediante la aplicación de un estímulo físico o un estímulo de naturaleza química (**Giardina & Gasior, 2009**).



### 3.3.1. Modelo de Maximal Electroshock Seizure (MES)

El modelo MES es un modelo bien caracterizado y estandarizado, desarrollado por Toman y colaboradores hace más de 70 años, a través del cual se predicen aquellos fármacos efectivos frente a crisis tónico-clónico generalizadas (**Toman *et al.*, 1946**). A pesar de que habitualmente se describe que este ensayo detecta compuestos anticonvulsivos que actúan sobre canales de sodio operados por voltaje, la mayoría de los fármacos identificados mediante este ensayo interactúan además con otros blancos moleculares implicados en la generación de las crisis, tales como los canales activados por potasio o los receptores NMDA o AMPA (**Bialer & White, 2010**). Se ha establecido que la mayoría de los FAEs aprobados presentan una farmacología compleja, pudiendo caracterizárselos como agentes con múltiples blancos moleculares y mecanismos de acción (**Bianchi *et al.*, 2009**).

En el modelo de MES, las crisis se inducen en animales sanos mediante la aplicación de un estímulo eléctrico a través de electrodos de oreja. El estímulo aplicado es entre 5 y 10 veces mayor al umbral convulsivo, evitando así que durante la inducción de convulsiones tónico-clónicas se produzcan sesgos debido a las fluctuaciones inter- e intraindividuales en dicho umbral. Utilizando un generador de pulsos, un estímulo eléctrico de 60 Hz (frecuencia de pulso) y 50 mA (intensidad de corriente en ratones; en ratas se utilizan 150 mA), seteado en un ancho de pulso de 0,6 ms, se entrega mediante electrodos corneales o auriculares al animal durante 0,2 segundos (Fig. 3.2). En animales sin tratamiento anticonvulsivante, esta estimulación es suficiente para generar una flexión seguida de extensión tónica característica de los miembros posteriores, que perdura 3 segundos. Se considera protección cuando el animal, luego de ser estimulado, no presenta dicha extensión tónica del miembro posterior (**Castel-Branco *et al.*, 2009**).



**Figura 3.2** Modelo de Maximal Electroshock Seizure (MES). Arriba: Protocolo resumido de ensayo. Abajo: Caracterización de las crisis. (Tomado de **Enrique, 2016**).

Como ventajas, este modelo ofrece un punto final claro, y está demostrada la alta correlación entre la capacidad de un fármaco de inhibir el MES en roedores y su efectividad respecto de las crisis tónico-clónico generalizadas en humanos. Esto es, las crisis evaluadas en este modelo son altamente reproducibles y electrofisiológicamente consistentes con las crisis en humanos (**Kandratavicius et al., 2014**).

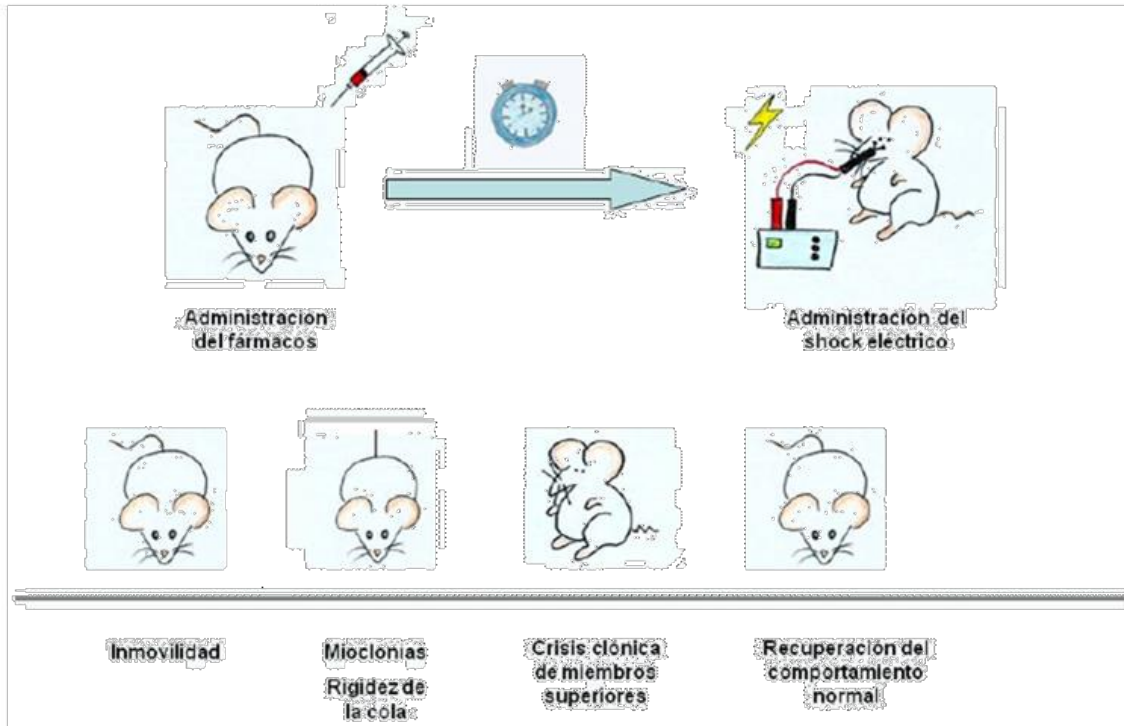
### 3.3.2. Modelo de crisis parciales de 6 Hz

El modelo de 6 Hz en ratón fue originalmente descrito por Toman en 1951 como un modelo de crisis psicomotoras. Sin embargo, entró en desuso debido a que fármacos como PHT y LTG, no demostraban actividad frente a este modelo, lo cual se consideraba inconsistente con la eficacia clínica de dichos fármacos (**Brown et al., 1953**). Varios años más tarde, el modelo fue reconsiderado por su sensibilidad frente a LEV (**Barton et al., 2001**), el cual no mostraba actividad frente a los modelos de MES y PTZsc. Este fármaco



posee mecanismos de acción novedosos y diferentes de los otros antiepilépticos convencionales, interactuando con la proteína SV2A y canales de calcio presinápticos **(Alrabiah, 2019)**. Es por ello que recientemente se incorporó el modelo 6 Hz a las fases tempranas del programa ETSP del NIH para la evaluación de nuevos fármacos anticonvulsivos con potencial actividad frente a la epilepsia refractaria **(Löscher, 2011)**.

El modelo de 6 Hz se describe como un modelo agudo en el que se aplica una estimulación a baja frecuencia (6 Hz) y larga duración (3 segundos) con el fin de inducir en los animales crisis parciales que son similares a las crisis psicomotoras observadas en pacientes con epilepsia parcial (Fig. 3.3), como la epilepsia del lóbulo temporal **(Barton et al., 2001)**. A baja intensidad se generan crisis en el 97% de los animales ( $CC_{97} = 22$  mA), pero el modelo no es capaz de discriminar entre las diferentes clases de FAEs. Incrementando la intensidad de corriente en al menos un 50% (por ejemplo, a 32 mA) disminuye la sensibilidad de las crisis a PHT y LTG. Al duplicar la intensidad respecto de la  $CC_{97}$  (44 mA), sólo algunos FAEs como LEV y VPA, demuestran protección completa frente a crisis inducidas. Basándose en estas observaciones, se sugiere que la estimulación de 6 Hz a 44 mA debiera ser resistente a moduladores del canal de sodio, tales como PHT y LTG, mientras que drogas con otros mecanismos, particularmente compuestos que actúen sobre las vías GABAérgicas, son menos efectivos **(Löscher, 2016)**. Algunos de los FAEs utilizados en la clínica, incluyendo LEV, RTG, BRV y carisbamato, suprimen potencialmente las crisis inducidas a 44 mA, pero no hay evidencia clínica que presenten una eficacia superior en pacientes con crisis parciales refractarias. Con esto, muchos autores proponen que este modelo animal probablemente no sea efectivo para identificar fármacos eficaces contra crisis refractarias, sino como aquel que nos ayude a discriminar los fármacos basados en su mecanismo de acción **(Kehne et al., 2017)**.



**Figura 3.3** Modelo de crisis aguda de 6 Hz. Arriba: Protocolo resumido de ensayo. Abajo: Caracterización de las crisis. (Tomado de **Enrique, 2016**).

Existen dos enfoques o estrategias empleadas en el modelo de crisis aguda de 6 Hz. El primer enfoque involucra el procedimiento de “escalera” o método de “*up and down*” (**Barton et al., 2001; Thomas et al., 2012; Nieoczym et al., 2013**), los distintos animales reciben corrientes eléctricas de intensidad variable, aumentando la misma cuando un ratón evaluado previamente no presentó crisis al ser estimulado, o estimulando al animal con una intensidad menor cuando el ratón evaluado anteriormente presenta crisis. Los resultados son expresados como intensidad de corriente crítica necesaria para inducir crisis en el 50% (CC<sub>50</sub>) y 97% (CC<sub>97</sub>) de la población. La desventaja de este método es que se utiliza una cantidad considerable de animales, siendo necesario evaluar al menos seis intensidades de corriente, empleando al menos seis animales para cada una de ellas. El otro procedimiento involucra la estimulación de los animales a una intensidad de corriente fija, la cual induce crisis en el 100% de los animales sanos (**Barton et al., 2003; Shimshoni et al., 2008; Wojda et al., 2009; Florek-Luszczki et al., 2014**). En nuestro trabajo de tesis, utilizamos este último a



una intensidad de corriente fija de 44 mA para evaluar la potencia anticonvulsiva de los compuestos seleccionados a través del tamizado virtual.

Las crisis se caracterizan mediante la presencia de diferentes signos en el animal, como por ejemplo inmovilidad, clonías de miembros anteriores y cola erecta, más conocido como “*straub tail*”. Algunos autores toman como parámetro la presencia o ausencia de clonus de extremidades anteriores para determinar si el animal desarrolló o no crisis luego de la estimulación y la puntúan según la siguiente escala: (0) ausencia de clonus de miembros anteriores; (1) leve, clonus de un solo miembro anterior; (2) grave, clonus de ambos miembros anteriores (**Esneault et al., 2017**). Otros proponen determinar la duración del intervalo de tiempo en el cual el animal presenta crisis, caracterizadas como se menciona previamente, estado que dura alrededor de 60 a 120 segundos luego de la estimulación, dependiendo del animal. Si el compuesto protege al ratón de la crisis, la duración de esta es menor a 10 segundos inmediatos a aplicar la corriente. Esto entonces genera una desventaja ya que, en la práctica, se requiere un ojo entrenado para determinar con precisión la duración de la convulsión, mientras simultáneamente se caracteriza la crisis.

Leclercq y Kaminski señalan la importancia de conocer la especie que se utiliza cuando se emplea este modelo en particular, ya que estudiaron cómo la carga genética afecta la respuesta frente a las distintas intensidades luego de administrar diferentes fármacos (**Leclercq & Kaminski, 2015**). Por ejemplo, los ratones de la cepa NMRI son mucho más responsivos a LEV respecto de la cepa CF-1 y no son resistentes a PHT.

### 3.3.3. Modelo de pentilentetrazol subcutáneo (PTZsc.)

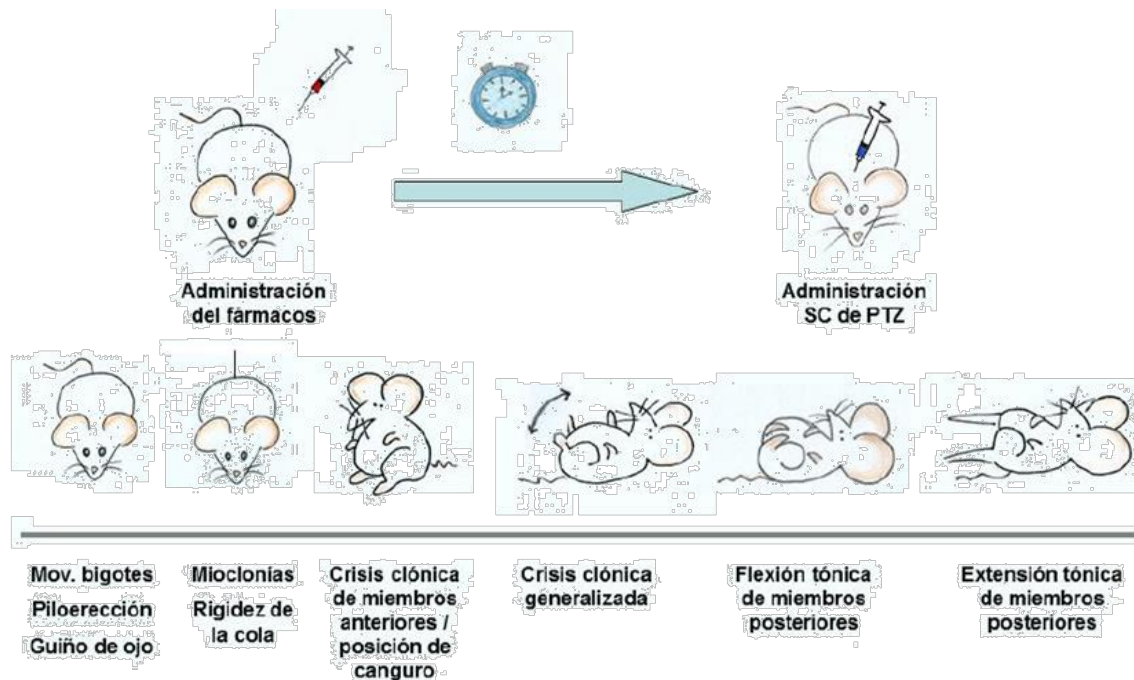
Otro modelo utilizado en nuestro laboratorio es el modelo de PTZsc. El PTZ o metrazol fue sintetizado en 1924 y luego de reporte de su acción convulsivante se utilizó en diversos laboratorios para evaluar drogas con actividad anticonvulsiva (**Hildebrandt, 1937**). Unos años más tarde, Everett y Richards describieron definitivamente el modelo y demostraron que las crisis inducidas por PTZ podían ser bloqueadas por trimetadiona



y PB, pero no por PHT (Everett & Richards, 1944). Esto llevó a pensar que este modelo era sensible frente a aquellos FAEs de primera línea utilizados en el tratamiento de crisis de ausencia generalizadas, tal como ESM, trimetadona, VPA y BZD (Krall *et al.*, 1978; Löscher, 2017). Sin embargo, al igual que sucede con los otros modelos animales, algunos fármacos inactivos en el mismo, como por ejemplo LTG, se utilizan de manera efectiva en el tratamiento de las crisis de ausencia (White, 2003).

El PTZ es un antagonista no competitivo que actúa en el sitio de unión de picrotoxina de los receptores GABA<sub>A</sub> (Huang *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2002). El modelo implica la administración subcutánea del mismo, generalmente a una dosis fija de 85 mg/kg y 90 mg/kg en ratones y ratas normales, respectivamente. Tales dosis son suficientes para inducir crisis clónicas con una duración de al menos 5 segundos en el 97% de los animales evaluados (Löscher, 2011) (Fig. 3.4). Se monitorea, pues, la duración y severidad de las crisis inducidas, y también puede estudiarse la latencia de éstas. Las crisis están caracterizadas de acuerdo con una escala descrita por Mandhane y colaboradores (Mandhane *et al.*, 2007): (Fase 1) piloerección, movimientos de bigotes, guiño de ojos, movimiento de cabeza o *nodding*; (Fase 2) sacudidas mioclónicas; (Fase 3) clonus de extremidades anteriores; (Fase 4) posición de canguro; (Fase 5) crisis clónica generalizada con pérdida de la postura; (Fase 6) crisis tónica generalizada. Los animales se observan durante los 30 minutos inmediatos a la administración de la droga (Löscher, 2011). El criterio de protección para un compuesto evaluado frente a este modelo suele ser la ausencia de crisis clónica, ya sea parcial o generalizada (Mandhane *et al.*, 2007; Yuen & Trocóniz, 2015). Dependiendo de la dosis, el PTZ puede generar mioclonías, convulsiones clónicas y/o extensiones tónicas de los miembros anteriores y posteriores (Mandhane *et al.*, 2007).





**Figura 3.4** Modelo de inducción química por PTZ. *Arriba:* Protocolo resumido del ensayo. *Abajo:* Caracterización de las crisis (Tomado de **Enrique, 2016**).

### 3.4. Modelos crónicos de crisis inducidas

Los modelos crónicos de crisis inducidas comprenden animales que muestran una persistente disminución en el umbral de las crisis, pero para los que, sin embargo, no se ha reportado evidencia de crisis que se generen de manera espontánea. Tales modelos pueden ser inducidos, como los modelos de encendido o *kindling*, o genéticos (**Simonato et al., 2014**).

Los modelos de *kindling* han sido empleados principalmente para estudiar el proceso de epileptogénesis. El *kindling* es el reflejo de un proceso de plasticidad inducida a través de la administración de sucesivos estímulos que conllevan a diferentes grados de crisis con disminución progresiva del umbral convulsivo y aumento de la severidad de las convulsiones (**Coppola & Moshé, 2012**). Los modelos más comúnmente utilizados son modelos de epilepsia de lóbulo temporal, en los cuales se entregan al animal estímulos eléctricos reiterados a través de la córnea, o de manera directa en la región hipocampal o amigdalina, o estímulos químicos, tal como el PTZ (**Simonato et al.,**



2014; Lidster *et al.*, 2016). En lo que respecta a modelos genéticos, se presentan dos modelos inducidos, a saber, el modelo de ratones *knockout* para el receptor de dopamina D2 (D2R *knockout* o D2R  $-/-$ ) y el *En2 knockout*, en el cual se presentan alteraciones en proteínas *Engrailed Homeobox-2* que juegan un rol importante en el desarrollo del tubo neural. Ambos presentan mayor susceptibilidad a las crisis inducidas por el ácido kaínico (Dunleavy *et al.*, 2013; Tripathi & Bozzi, 2015).

Entre las ventajas de estos modelos se pueden incluir que la evaluación es moderadamente rápida, insumiendo entre algunos días o pocas semanas; además, ofrecen alternativas para identificar aquellos tratamientos que podrían prevenir o reducir la epileptogénesis. Las crisis inducidas pero no espontáneas pueden representar una desventaja, ya que, como en el caso de los modelos agudos, no representan un estado epiléptico (Simonato *et al.*, 2014).

### 3.5. Modelos crónicos de epilepsia

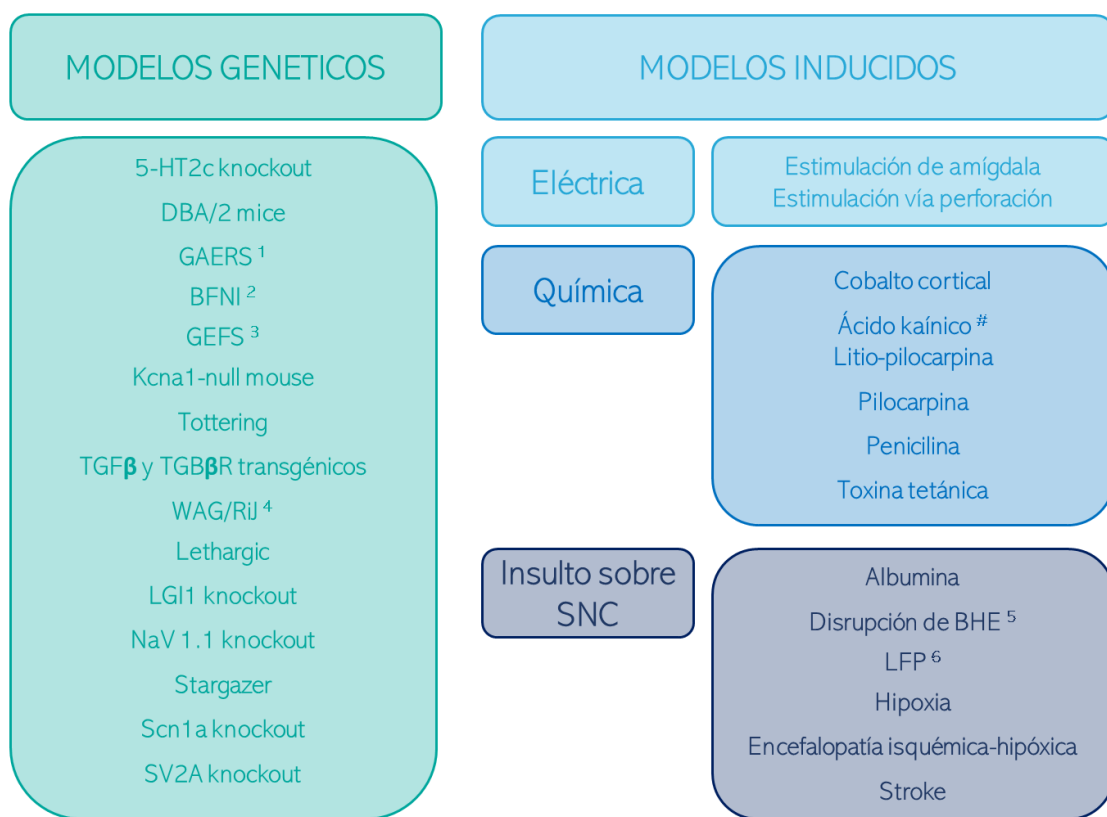
El uso de auténticos modelos animales de epilepsia es esencial para poder comprender de manera inequívoca aquellos mecanismos complejos que subyacen las crisis convulsivas y que conllevan, conforme pasa el tiempo, al proceso de epileptogénesis y a la progresión de la enfermedad, más aún cuando se trata de la forma más común de epilepsia parcial en adultos, la epilepsia del lóbulo temporal, y otras formas de epilepsia con pobre respuesta a los FAEs (Nagao *et al.*, 2013; Kandratavicius *et al.*, 2014).

A diferencia de los modelos de convulsiones agudas o de crisis inducidas, los modelos de epilepsia crónica son de uso relativamente poco frecuentes de uso debido al mayor requerimiento de tiempo y a los elevados costos. Sin embargo, nos permiten obtener una mejor comprensión respecto a aquellos mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad (Garcia Garcia *et al.*, 2010; Pitkänen *et al.*, 2017). Comprenden todos aquellos modelos donde ocurre epileptogénesis y, además, se ha documentado la generación de crisis espontáneas a través de vídeos de EEG (Simonato



*et al.*, 2014). La epilepsia puede ser inducida, tal como en los modelos de epilepsia consecuentes al SE, o de origen genético, como es el caso de los ratones *knockout* que codifican para el canal  $Na_v$  1.1.

La figura 3.5 sintetiza los modelos animales de epilepsia que han sido reportados hasta la fecha. Puede observarse que en los últimos años se han desarrollado un gran número de modelos que tienen como foco principal la farmacoresistencia, entre ellos el modelo en ratones de kainato intrahipocampal (Löscher, 2017).



**Figura 3.5** Distintos modelos de epilepsia, de origen genético o inducidos. (Adaptado Lidster *et al.*, 2016). <sup>1</sup>GAERS: Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg; <sup>2</sup>BFNI: Benign Familial Neonatal-infantile seizures; <sup>3</sup>GEFS: Generalised epilepsy with febrile seizures; <sup>4</sup>WAG/Rij: Wistar Albino Glaxo Rats from Rijswijk; <sup>5</sup>BHE: Barrera Hemato-Encefálica; <sup>6</sup>LFP: Lateral Fluido Percusión (traumatic brain injury). #La inducción por ácido kaínico puede realizarse intraamígdala, intrahipocampal, intraperitoneal o subcutánea.



### 3.6. Ensayo de Rotorod

El ensayo de Rotorod permite evaluar, en una primera instancia, el efecto del compuesto promisorio sobre la función motora (**Dunham *et al.*, 1957**). El procedimiento para evaluar de manera preliminar si el candidato testado afecta la función neurológica o motor al administrar el compuesto implica un cilindro con compartimentos separados donde se ubica al animal, el cual gira sobre su eje axial. A pesar de que existe versiones aceleradas del Rotorod (**Jones & Roberts, 1968**), en el ensayo clásico el cilindro rota a una velocidad de 6 rpm. Para sobrepasar la prueba con éxito, el animal debe mantener su equilibrio sin caídas durante un período de 1 minuto. De lo contrario, si el animal no puede mantenerse girando sobre el rodillo, al cabo de tres caídas se considera que el compuesto ensayado presenta rasgos de toxicidad (**Deacon, 2013**).

Para realizar el ensayo, se administran los animales con dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg, y se los evalúa a dos tiempos diferentes, 30 minutos y 4 horas, de acuerdo con el protocolo de NIH, si presentan o no daño motor (**Kehne *et al.*, 2017**).

### 3.7. Test de chimenea

Mediante el test de chimenea, se puede evaluar cuantitativamente el daño motor, para inferir sobre la neurotoxicidad del compuesto evaluado. Fue descrito por primera vez por Boissier y colaboradores en 1960 (**Vogel, 2008**), donde evaluaron la incapacidad de un animal de retroceder en un tubo vertical dentro de un período determinado de tiempo.

Durante este test se coloca el animal en la entrada de un tubo de vidrio, el cual mide aproximadamente 30 mm de diámetro y 20 cm de largo (dependiendo de las dimensiones del animal). Se deja caminar al animal hacia el otro extremo y cuando éste llega al final del tubo, éste se coloca en posición vertical de manera que la única posibilidad de salida es la parte superior (**Fréchou *et al.*, 2019**). Se mide entonces el tiempo que tarda en recorrer el tubo en sentido hacia atrás, y además se puede calcular



la dosis a la cual el 50% de los animales no pueden salir del tubo caminando en retroceso dentro de los 30 segundos (Vogel, 2008).

### 3.8. Referencias

- Arabiah, H. (2019) 'Levetiracetam', in, pp. 167–204. doi: 10.1016/bs.podrm.2019.02.003.
- Barton, M. E. *et al.* (2001) 'Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy', *Epilepsy Research*, 47(3), pp. 217–227. doi: 10.1016/S0920-1211(01)00302-3.
- Barton, M. E., Peters, S. C. and Shannon, H. E. (2003) 'Comparison of the effect of glutamate receptor modulators in the 6 Hz and maximal electroshock seizure models', *Epilepsy Research*. Elsevier, 56(1), pp. 17–26. doi: 10.1016/j.eplesyres.2003.08.001.
- Bialer, M. and White, H. S. (2010) 'Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 9(1), pp. 68–82. doi: 10.1038/nrd2997.
- Bianchi, M. T., Pathmanathan, J. and Cash, S. S. (2009) 'From ion channels to complex networks: Magic bullet versus magic shotgun approaches to anticonvulsant pharmacotherapy', *Medical Hypotheses*, 72(3), pp. 297–305. doi: 10.1016/j.mehy.2008.09.049.
- Brown, W. C. *et al.* (1953) 'COMPARATIVE ASSAY OF ANTIEPILEPTIC DRUGS BY "PSYCHOMOTOR" SEIZURE TEST AND MINIMAL ELECTROSHOCK THRESHOLD TEST', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 107(3).
- Burch, R. L. (2009) 'The progress of humane experimental technique since 1959: a personal view.', *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, 37(3), pp. 269–75. doi: 10.1177/026119290903700308.
- Castel-Branco, M. M. *et al.* (2009) 'The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs', *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 31(2), p. 101. doi: 10.1358/mf.2009.31.2.1338414.
- Coppola, A. and Moshé, S. L. (2012) 'Animal models', in *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., pp. 63–98. doi: 10.1016/B978-0-444-52898-8.00004-5.
- Deacon, R. M. J. (2013) 'Measuring motor coordination in mice.', *Journal of visualized experiments : JoVE*, (75). doi: 10.3791/2609.
- Denayer, T., Stöhr, T. and Roy, M. Van (2014) 'Animal models in translational medicine: Validation and prediction', *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 2(1), p. 5. doi: 10.1016/j.nhtm.2014.08.001.
- Dunleavy, M. *et al.* (2013) 'Kainic acid-induced seizures modulate Akt (SER473) phosphorylation in the hippocampus of dopamine D2 receptor knockout mice', *Journal of Molecular Neuroscience*, 49(1), pp. 202–210. doi: 10.1007/s12031-012-9927-x.
- Enrique, A. V. (2016) 'Desarrollo de un modelo de convulsiones farmacorresistentes en ratones



. Evaluación de nuevos fármacos para el control de la farmacoresistencia .’

Ericsson, A. C., Crim, M. J. and Franklin, C. L. (2013) ‘A brief history of animal modeling.’, *Missouri medicine*, 110(3), pp. 201–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829102>.

Esneault, E., Peyon, G. and Castagné, V. (2017) ‘Efficacy of anticonvulsant substances in the 6 Hz seizure test: Comparison of two rodent species’, *Epilepsy Research*, 134(March), pp. 9–15. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2017.05.002.

EVERETT, G. M. and RICHARDS, R. K. (1944) ‘COMPARATIVE ANTICONVULSIVE ACTION OF 3,5,5-TRIMETHYLOXAZOLIDINE-2,4-DIONE (TRIDIONE), DILANTIN AND PHENOBARBITAL’, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 81(4).

Florek-Luszczki, M., Wlaz, A. and Luszczki, J. J. (2014) ‘Interactions of levetiracetam with carbamazepine, phenytoin, topiramate and vigabatrin in the mouse 6 Hz psychomotor seizure model - A type II isobolographic analysis’, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 723(1), pp. 410–418. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.063.

Fréchou, M. *et al.* (2019) ‘Behavioral tests that reveal long-term deficits after permanent focal cerebral ischemia in mouse’, *Behavioural Brain Research*. Elsevier B.V., 360, pp. 69–80. doi: 10.1016/j.bbr.2018.11.040.

Garcia Garcia, M. E., Garcia Morales, I. and Matías Guiu, J. (2010) ‘Modelos experimentales en epilepsia’, *Neurologia*, pp. 181–188. doi: 10.1016/S0213-4853(10)70007-4.

Giardina, W. J. and Gasior, M. (2009) *Acute seizure tests in epilepsy research: Electroshock- and chemical-induced convulsions in the mouse*, *Current Protocols in Pharmacology*. doi: 10.1002/0471141755.ph0522s45.

Grainger, A. I. *et al.* (2018) ‘In vitro models for seizure-liability testing using induced pluripotent stem cells’, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fnins.2018.00590.

Hau, J. (2008) ‘Animal Models for Human Diseases’, in *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 3–8. doi: 10.1007/978-1-59745-285-4\_1.

Hildebrandt, F. (1937) ‘Pentamethylentetrazol (Cardiazol)’, in *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie — Ergänzungswerk*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 151–183. doi: 10.1007/978-3-642-47714-0\_3.

Huang, R. Q. *et al.* (2001) ‘Pentylene-tetrazole-induced inhibition of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: Mechanism and site of action’, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), pp. 986–995.

Jefferys, J. G. R. (2017) ‘Good Welfare Practice in Modeling Seizures and Epilepsy’, in *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition*. Elsevier Inc., pp. 39–46. doi: 10.1016/B978-0-12-804066-9.00004-3.

Jung, M. E., Lal, H. and Gatch, M. B. (2002) ‘The discriminative stimulus effects of pentylene-tetrazol as a model of anxiety : recent as a model of anxiety : recent developments’, 26(JULY 2002). doi: 10.1016/S0149-7634(02)00010-6.

Kandratavicius, L. *et al.* (2014) ‘Animal models of epilepsy: use and limitations’, pp. 1693–1705. doi: 10.2147/NDT.S50371.

Kehne, J. H. *et al.* (2017) ‘The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP)’, *Neurochemical Research*. Springer US, 42(7), pp.



1894–1903. doi: 10.1007/s11064-017-2275-z.

Krall, R. L. *et al.* (1978) 'Antiepileptic Drug Development: II. Anticonvulsant Drug Screening', *Epilepsia*, 19(4), pp. 409–428. doi: 10.1111/j.1528-1157.1978.tb04507.x.

Leclercq, K. and Kaminski, R. M. (2015) 'Genetic background of mice strongly influences treatment resistance in the 6 Hz seizure model', *Epilepsia*, 56(2), pp. 310–318. doi: 10.1111/epi.12893.

Lidster, K. *et al.* (2016) 'Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures', *Journal of Neuroscience Methods*. Elsevier B.V., pp. 2–25. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.09.007.

Löscher, W. (2011) 'Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs', *Seizure*. BEA Trading Ltd, 20(5), pp. 359–368. doi: 10.1016/j.seizure.2011.01.003.

Löscher, W. (2016) 'Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies', *Epilepsy Research*. Elsevier B.V., pp. 157–184. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2016.05.016.

Löscher, W. (2017) 'Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs', *Neurochemical Research*. Springer US, 42(7), pp. 1873–1888. doi: 10.1007/s11064-017-2222-z.

Mandhane, S. N., Aavula, K. and Rajamannar, T. (2007) 'Timed pentylenetetrazol infusion test: A comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice', *Seizure*, 16(7), pp. 636–644. doi: 10.1016/j.seizure.2007.05.005.

Muotri, A. R. (2009) 'Modeling epilepsy with pluripotent human cells', *Epilepsy & Behavior*, 14(1), pp. 81–85. doi: 10.1016/j.yebeh.2008.09.021.

Nagao, Y. *et al.* (2013) 'Expressional analysis of the astrocytic Kir4.1 channel in a pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy model', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(JUNE). doi: 10.3389/fncel.2013.00104.

Nieoczym, D. *et al.* (2013) 'Effect of sildenafil, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor, on the anticonvulsant action of some antiepileptic drugs in the mouse 6-Hz psychomotor seizure model', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 47, pp. 104–110. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.08.009.

NRC (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academies Press. doi: 10.17226/12910.

Pitkänen, A. *et al.* (2017) 'What Can We Model?', in *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition*. Elsevier Inc., pp. 1–3. doi: 10.1016/B978-0-12-804066-9.00001-8.

Raimondo, J. V. *et al.* (2017) 'Methodological standards for in vitro models of epilepsy and epileptic seizures. A TASK1-WG4 report of the AES/ILAE Translational Task Force of the ILAE', *Epilepsia*, 58, pp. 40–52. doi: 10.1111/epi.13901.

Rho, J. M. and White, H. S. (2018) 'Brief history of anti-seizure drug development', *Epilepsia Open*, 3, pp. 114–119. doi: 10.1002/epi4.12268.

Russell, Wms; Burch, R. (1959) *The principles of humane experimental technique*.





- Shimshoni, J. A. *et al.* (2008) 'Anticonvulsant profile and teratogenicity of 3,3-dimethylbutanoylurea: A potential for a second generation drug to valproic acid', *Epilepsia*, 49(7), pp. 1202–1212. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01624.x.
- Simonato, M. *et al.* (2014) 'The challenge and promise of anti-epileptic therapy development in animal models', *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group, pp. 949–960. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70076-6.
- van der Staay, F. J. (2006) 'Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy', *Brain Research Reviews*, 52(1), pp. 131–159. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.01.006.
- Stables, J. and Kupferberg, H. (2005) 'The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project'.
- Tannenbaum, J. (2017) 'Ethics in the Use of Animal Models of Seizures and Epilepsy', in *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition*. Elsevier Inc., pp. 47–68. doi: 10.1016/B978-0-12-804066-9.00005-5.
- Thomas, N. K. *et al.* (2012) 'Triheptanoin in acute mouse seizure models', *Epilepsy Research*. Elsevier B.V., 99(3), pp. 312–317. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2011.12.013.
- TOMAN, J. E. P., SWINYARD, E. A. and GOODMAN, L. S. (1946) 'Properties of maximal seizures, and their alteration by anticonvulsant drugs and other agents', *Journal of neurophysiology*, 9, pp. 231–239. doi: 10.1152/jn.1946.9.3.231.
- Tripathi, P. P. and Bozzi, Y. (2015) 'The role of dopaminergic and serotonergic systems in neurodevelopmental disorders: A focus on epilepsy and seizure susceptibility', *BiolImpacts*. Tabriz University of Medical Sciences, pp. 97–102. doi: 10.15171/bi.2015.07.
- Vogel, H. G. (2008) *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, Springer. Available at: <https://www.springer.com/gp/book/9783540709954> (Accessed: 1 May 2020).
- Wang, Y. and Chen, Z. (2019) 'An update for epilepsy research and antiepileptic drug development: Toward precise circuit therapy', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., pp. 77–93. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.010.
- White, H. S. (2003) 'Preclinical development of antiepileptic drugs: Past, present, and future directions', *Epilepsia*, 44(SUPPL. 7), pp. 2–8. doi: 10.1046/j.1528-1157.44.s7.10.x.
- WHITE, H. S. *et al.* (2006) 'Therapeutic Assays for the Identification and Characterization of Antiepileptic and Antiepileptogenic Drugs', in *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier, pp. 539–549. doi: 10.1016/B978-012088554-1/50046-3.
- Wilcox, K. S., West, P. J. and Metcalf, C. S. (2019) 'The Current Approach of the Epilepsy Therapy Screening Program Contract Site for Identifying Improved Therapies for the Treatment of Pharmacoresistant Seizures in Epilepsy.', *Neuropharmacology*, p. 107811. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107811.
- Wojda, E. *et al.* (2009) 'Isobolographic characterization of interactions of levetiracetam with the various antiepileptic drugs in the mouse 6 Hz psychomotor seizure model', *Epilepsy Research*, 86(2–3), pp. 163–174. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2009.06.003.
- Yuen, E. S. M. and Trocóniz, I. F. (2015) 'Can pentylenetetrazole and maximal electroshock rodent seizure models quantitatively predict antiepileptic efficacy in Humans?', *Seizure*, 24(C),



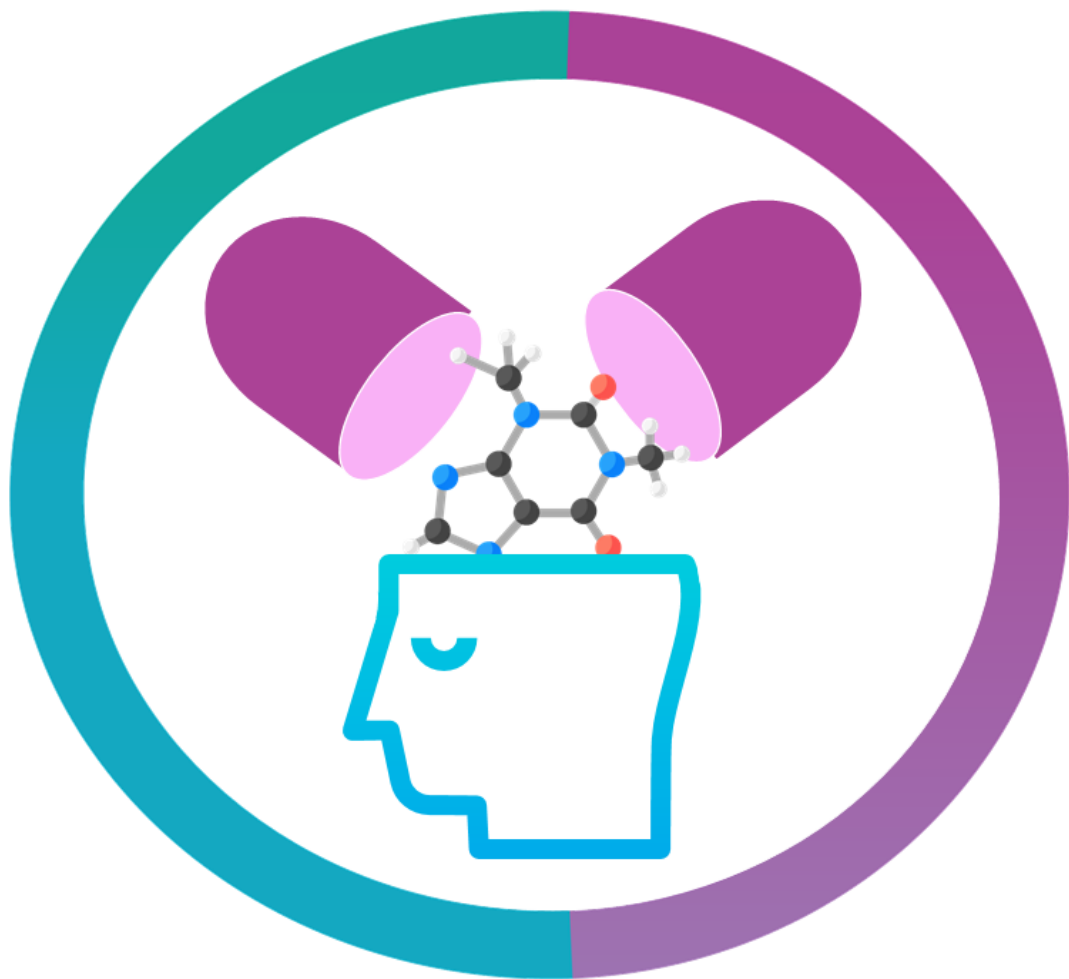


pp. 21–27. doi: 10.1016/j.seizure.2014.11.006.



# CAPÍTULO 4

## DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS





## Capítulo 4: Descubrimiento de Fármacos

### 4.1. Introducción

El descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco para una patología específica es un proceso largo y riguroso que incluye diferentes etapas y procedimientos (Fig. 4.1). El mismo comprende desde la identificación de un compuesto activo hasta el desarrollo de los estudios que garanticen la seguridad y eficacia del producto farmacéutico para el uso clínico propuesto, lo que puede llevar entre 12 a 15 años (**Mohs & Greig, 2017**). La identificación de un posible fármaco para una determinada patología implica una evaluación inicial de aproximadamente 100.000 compuestos candidatos, cientos de ensayos preclínicos y estudios clínicos de diferentes alcances y escala que involucran a miles de pacientes (**Blass, 2015**). Sumado a ello, los procesos globales implicados en el desarrollo suponen un costo promedio de alrededor de 2,6 billones de dólares (**DiMasi et al., 2016**), por lo que las pequeñas empresas farmacéuticas y las instituciones académicas se encuentran en una clara desventaja competitiva, que ocasionalmente puede salvarse mediante distintos modelos colaborativos (**Allarakhia, 2013**). En 2018, la FDA aprobó un récord de 59 nuevas drogas, en tanto que 42 nuevos candidatos fueron recomendados por la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency - EMA*). En general, el número de lanzamientos al mercado de los productos farmacéuticos muestra una tendencia positiva en los últimos años, aunque se observan importantes variaciones según el área terapéutica. En términos generales, las grandes compañías farmacéuticas priorizan aquellas áreas con mayor probabilidad de éxito o retorno de inversión (**Dowden & Munro, 2019**). Un análisis reciente de Takebe y colaboradores enfocado en la colaboración entre el sector farmacéutico privado y el sector académico en Estados Unidos, sugiere que las probabilidades de éxito en el campo del desarrollo farmacéutico aumentan considerablemente cuando los proyectos de las instituciones académicas son beneficiados con la colaboración de la industria farmacéutica (**Takebe et al., 2018**).

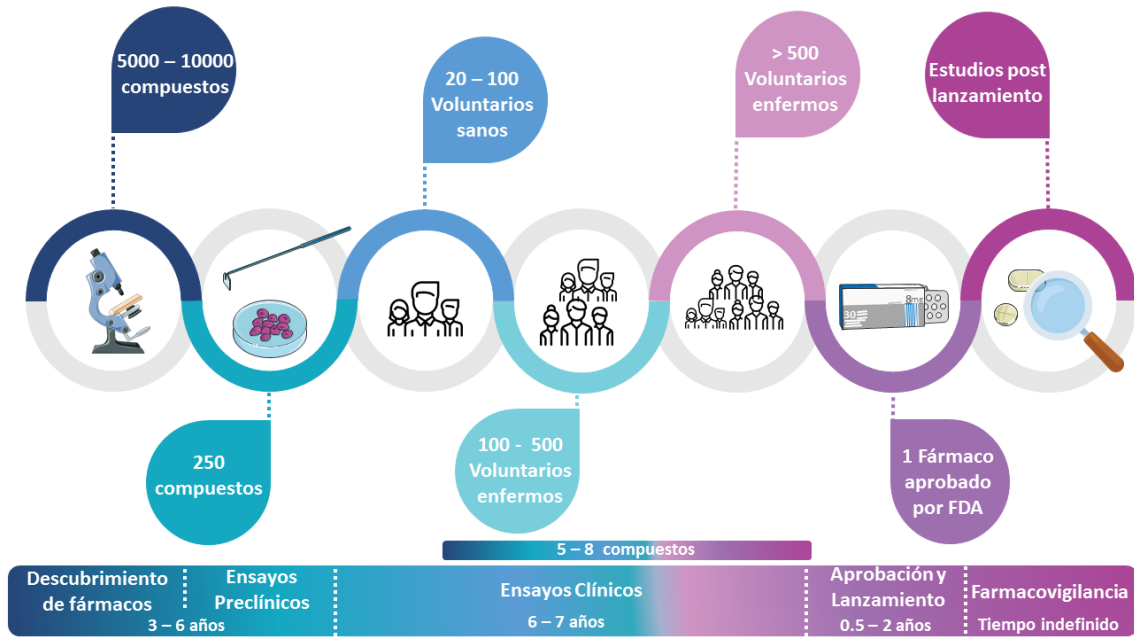
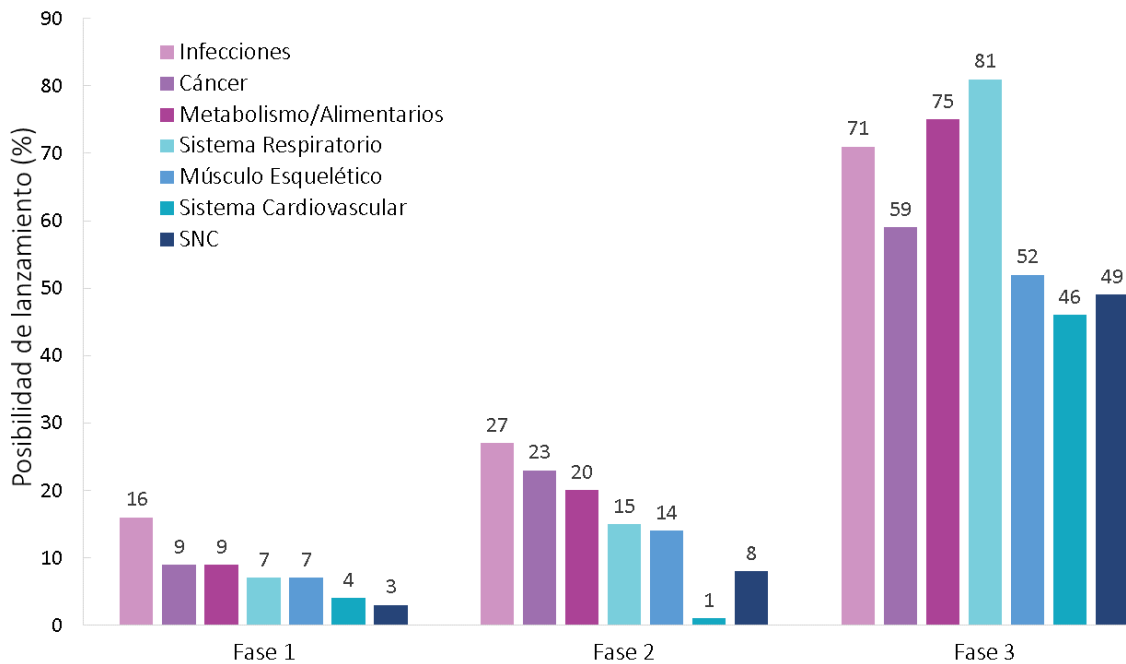


Figura 4.1 Etapas generales del descubrimiento y desarrollo de un fármaco (Ciani & Jommi, 2014).

#### 4.1.1. Descubrimiento de Fármacos Antiepilépticos

Actualmente existe una necesidad de descubrir nuevos agentes terapéuticos para aquellas enfermedades cuyos síntomas y progresión no se logran controlar o revertir adecuadamente con la terapia disponible. Como se explicó ya en el Capítulo 2, en particular en epilepsia las terapias farmacológicas de las que se dispone no logran controlar el cuadro clínico de pacientes que no responden al tratamiento (Löscher *et al.*, 2013). Más aún, aquellos fármacos que proveen control sintomático en los pacientes mediante su efecto anticonvulsivo, no previenen el inicio y progresión de esta enfermedad (Łukawski *et al.*, 2016). Sumado a ello, y como se vio en la sección anterior, particularmente los desórdenes del SNC no representan un campo prioritario para el desarrollo de nuevas entidades por su baja tasa de éxitos entre los años 2010 - 2017 (Fig. 4.2) (Dowden & Munro, 2019).



**Figura 4.2** Probabilidad de lanzamiento al mercado entre los años 2010 – 2017 desde las fases I, II y III de acuerdo con las distintas áreas terapéuticas.

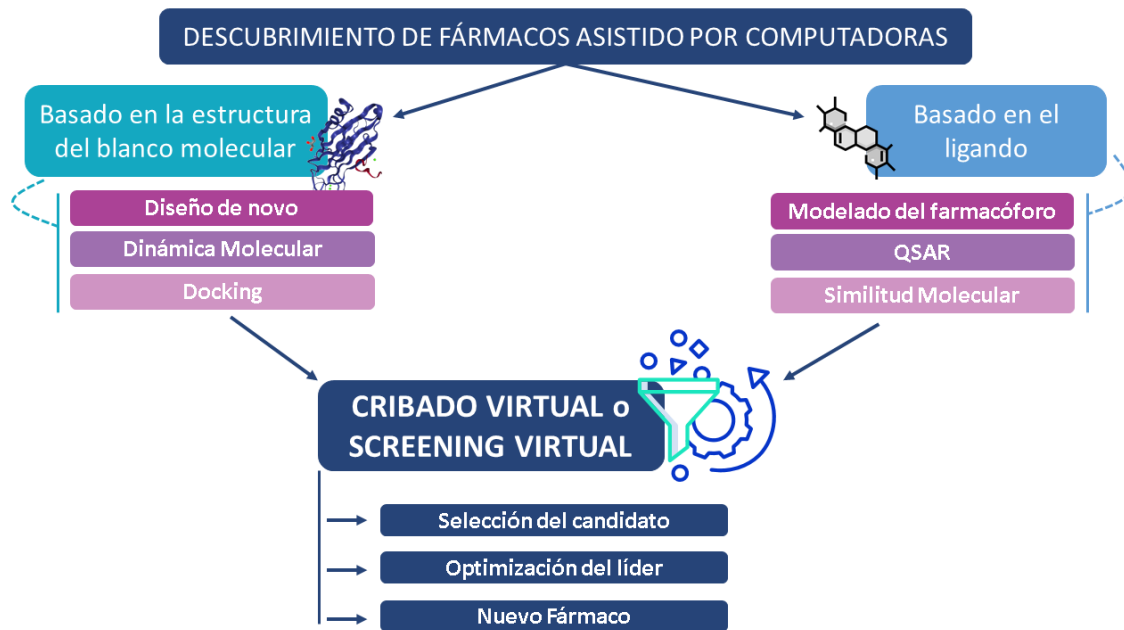
Se han planteado posibles soluciones para afrontar la necesidad de incorporar nuevos agentes antiepilépticos, involucrando diferentes estrategias multidisciplinarias que incluyen entre muchas otras, el desarrollo de nuevos modelos *in vitro* e *in vivo* de epilepsia, la identificación de nuevos blancos moleculares y sus posibles mecanismos de acción, la aplicación de metodologías asistidas por computadora o el desarrollo de sistemas avanzados de liberación de fármacos (Talevi & Rocha, 2016). Se propone además que todas estas estrategias se enfoquen en hallar tratamientos dirigidos a las epilepsias farmacorresistentes, disminuir las comorbilidades y prevenir el desarrollo de la epilepsia (epileptogénesis) (Löscher *et al.*, 2013).

Actualmente, el estado de desarrollo de tecnologías de alto rendimiento aplicadas a diferentes campos como la genómica y proteómica, permiten identificar blancos moleculares novedosos asociados a la fisiopatología de la epilepsia y comprender los mecanismos involucrados en el desarrollo de la misma (Löscher *et al.*, 2013). La comprensión de los mecanismos implicados en la ictogénesis y epileptogénesis ha permitido un cambio de perspectiva sobre el descubrimiento de fármacos hacia



enfoques basados en el blanco molecular, con la subsecuente validación en modelos animales. En los últimos años, se identificaron nuevos blancos implicados en el desarrollo de las crisis y la epilepsia. Algunos de ellos despiertan especial interés, como las subunidades  $\alpha 2\delta$  tipo 1 y 2 de los canales de calcio voltaje-operados donde actúa la PGB, la proteína SV2A que interactúa con LEV y BRV, los receptores glutamatérgicos AMPA que son el sitio de acción del PRP y talampanel, y las muy estudiadas vías inflamatorias desencadenantes de las crisis (**Łukawski *et al.*, 2016; Wang & Chen, 2019**).

Los métodos computacionales aplicados a la identificación y diseño de fármacos se emplean principalmente en la primera etapa del desarrollo (descubrimiento de compuestos bioactivos), donde el objetivo principal es seleccionar compuestos candidatos (**Prieto-Martínez *et al.*, 2019**). Estos métodos pueden ser abordados desde dos grandes perspectivas, las metodologías basadas en el ligando o aquellas basadas en el blanco molecular (Fig. 4.3) (**Sliwoski *et al.*, 2014**). Si se compara con otras áreas de la terapéutica, los enfoques computacionales para la selección o diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia han sido relativamente poco explorados (**Talevi, 2016**). Muchos de los blancos moleculares validados en epilepsia son canales iónicos voltaje-operados, cuyas estructuras aún no han sido determinadas mediante técnicas experimentales (este obstáculo, afortunadamente, está salvándose en los últimos tiempos). En ausencia de la estructura del blanco molecular, los esfuerzos de descubrimiento asistido por computadora deben centrarse en el modelado por homología o las aproximaciones de modelado basadas en el ligando.



**Figura 4.3** Esquema general de las metodologías utilizadas en el descubrimiento de fármacos asistido por computadoras.

## 4.2. Cribado Virtual

La identificación de *hits* capaces de interactuar con un determinado blanco molecular y la optimización progresiva de su potencia y propiedades farmacológicas, son los puntos críticos en las etapas tempranas del descubrimiento de un fármaco **(Mohs & Greig, 2017)**. A comienzos de la década de los 90, las técnicas de cribado farmacológico de alto rendimiento (*High Throughput Screening*, HTS) y la química combinatoria se imponían como la gran renovación en el proceso de desarrollo de fármacos, reduciendo notablemente los tiempos de obtención y evaluación de bibliotecas químicas, y promoviendo la búsqueda de diversidad estructural. El HTS combina la robotización y miniaturización de ensayos a grandes escalas permitiendo identificar con rapidez y pequeñas cantidades de muestra compuestos que modulen un blanco molecular determinado. Aunque es muy utilizada por la industria farmacéutica, presenta una gran desventaja: el elevado costo de la tecnología necesaria para implementarlo y sus también muy altos costos operativos, lo que mayormente restringe su utilización a las industrias farmacéuticas, con algunas excepciones **(Lionta et al., 2014)**.





Una aproximación probablemente más racional y económica es el Cribado Virtual, Tamizado Virtual o Screening Virtual (SV) **(Talevi, 2018)**. Consiste en utilizar aproximaciones *in silico* para tamizar quimiotecas digitales y decidir qué compuestos serán sometidos a ensayos *in vitro* y/o *in vivo*. De este modo, se enfocan los recursos en la evaluación *in vitro* o *in vivo* de compuestos que probablemente presenten la actividad buscada **(Kontoyianni, 2017)**.

Entre las ventajas de las técnicas de SV se pueden mencionar:

a) **Eficiencia:** el estado de la técnica de las metodologías *in silico*, sumado a la potencia de cómputo actual, permite explorar bases de datos de millones de estructuras químicas en períodos de tiempo relativamente cortos.

b) **Costos:** el proceso de SV, por su carácter teórico, no requiere del acceso físico a los millones de compuestos que se criban, pudiendo incluso analizarse aquellos compuestos que no han sido sintetizados aún **(McInnes, 2007)**. Sólo aquellos compuestos que sean predichos como promisorios activos serán requeridos para una evaluación posterior *in vitro* o *in vivo* **(Neves et al., 2018)**. Adicionalmente, una proporción importante de las aplicaciones informáticas que se emplean poseen licencias académicas o de código abierto, lo que conduce a una mayor reducción en los costos **(Talevi & Bruno Blanch, 2009)**. Entre los programas de acceso gratuito para el sector académico o general se encuentran los diferentes paquetes de ChemAxon (<https://chemaxon.com/>); PaDEL **(Yap, 2011)**; UCSF Chimera **(Pettersen et al., 2004)**; Open Babel **(O'Boyle et al., 2011)** o los paquetes desarrollados en entorno R-Studio (<https://rstudio.com/>), utilizados en esta tesis para la obtención de modelos. Por otra parte, muchas bases de datos de estructuras químicas disponibles son también de dominio público. Entre ellas, se encuentran ZINC15, que contiene alrededor de 750 millones de compuestos y aproximadamente 120 millones son compuestos tipo fármaco **(Sterling & Irwin, 2015)**; PubChem, con más de 96 millones de compuestos **(Kim et al., 2016)**; ChEMBL que contiene 1,9 millones de compuestos **(Gaulton et al., 2017)**, acompañados de datos de ensayos relacionados con sus características fisicoquímicas, farmacológicas y farmacocinéticas; DrugBank, compilando en su última versión 13.339



estructuras químicas de fármacos aprobados, en etapas experimentales y productos biotecnológicos (**Wishart et al., 2018**).

c) **Reposicionamiento de Fármacos:** debido a la existencia de bases de datos de fármacos aprobados, discontinuados o que se encuentran atravesando estudios clínicos, como DrugBank o SweetLead (**Novac, 2013**), es posible el cribado *in silico* orientado a encontrar nuevas indicaciones terapéuticas para fármacos existentes.

d) **Ventajas Bioéticas:** el empleo de estas metodologías reduce el número de compuestos a evaluar en ensayos *in vitro* y/o *in vivo* y aumenta la probabilidad de obtener un resultado positivo en estas etapas, lo cual conduce a minimizar el número de ensayos preclínicos y utilizar una menor cantidad de animales.

En general, las estrategias de SV puede dividirse en dos grandes categorías: Métodos basados en la Estructura o en el Blanco Molecular (métodos directos) y Métodos basados en el Ligando (o métodos indirectos) (**Lavecchia et al., 2013**). Durante los últimos años se ha recurrido crecientemente a la combinación de ambas metodologías, dado que son aproximaciones complementarias en términos de fortalezas y debilidades (**Kumar & Zhang, 2015**).

#### 4.2.1. Métodos basados en el blanco molecular

En estos métodos es condición necesaria conocer (o poder modelar comparativamente) la estructura tridimensional del blanco (**Lavecchia et al., 2013**). Asimismo, existen diferentes bases de datos que compilan miles a millones de estructuras de proteínas y ácidos nucleicos (según el caso, como estructura primaria o terciaria/cuaternaria), las cuales son recuperadas para llevar a cabo el *docking*. Las bases de datos de estructuras usualmente utilizadas son *Protein Data Bank* (PDB), que contiene una amplia cantidad de moléculas biológicas, tal como proteínas y ácidos nucleicos. Actualmente se reportan más de 164.000 estructuras macromoleculares



biológicas; *UniProt*, por su parte, provee gratuitamente secuencias anotadas para más de 120 millones de estructuras de proteínas (**The UniProt Consortium, 2019**).

En general, existen diferentes enfoques que se utilizan cuando se piensa en el descubrimiento o diseño de nuevas drogas a partir del blanco molecular. Una de las aproximaciones consiste en analizar el acoplamiento de un dado ligando al sitio de unión del blanco molecular, para luego proponer modificaciones del andamiaje activo (*active scaffold*) que potencien la interacción; alternativamente, pueden proponerse ligandos completamente *de novo* (por ejemplo, mediante una aproximación basada en fragmentos) (**Sliwoski et al., 2014**). Un enfoque alternativo implica cribar virtualmente una biblioteca de compuestos, con el fin de encontrar aquellas estructuras que mejor se ajusten al sitio de unión de interés en el blanco molecular y así encontrar un nuevo andamiaje activo (**Kontoyianni, 2017**).

La drogabilidad del blanco molecular, la identificación del sitio de unión, la selección de la estructura más relevante, el estudio de su flexibilidad, el análisis del estado de protonación de los residuos y la consideración explícita de las moléculas de agua que rodean al sitio de unión, son algunas de las cuestiones fundamentales que deben tenerse en cuenta al momento de seleccionar un blanco molecular (**Lionta et al., 2014**).

#### 4.2.1.1. Docking Molecular

El método de SV basado en el blanco molecular más utilizado es el *docking* molecular (o acoplamiento molecular). En términos generales consiste en tres pasos: a) generación de un modelo del blanco molecular a partir de la estructura tridimensional experimental u obtenida por modelado por homología; b) pretratamiento y muestreo conformacional de los ligandos y; c) formación de los complejos ligando-blanco y evaluación de estos en términos de su energía libre de unión (**Ma et al., 2013**).

El procedimiento de *docking* es utilizado para explorar y predecir los posibles modos de formación de complejos ligando-blanco molecular. El proceso por el cual un ligando se une a su blanco molecular depende de factores entrópicos y entálpicos



(Kontoyianni, 2017). Se estudian las distintas conformaciones de unión que puede adquirir un ligando dentro del sitio activo y se caracterizan los complejos en función de la energía libre del sistema, otorgando un valor de *score* (*scoring*) (Fig. 4.4) (Sousa *et al.*, 2006).

Algunos de los softwares más comunes con licencia gratuita para implementar *docking* molecular son el AUTODOCK (<http://autodock.scripps.edu/>), DOCK (<http://dock.compbio.ucsf.edu/>) y ZDOCK (<https://zlab.umassmed.edu/zdock/>) (Lavecchia *et al.*, 2013).

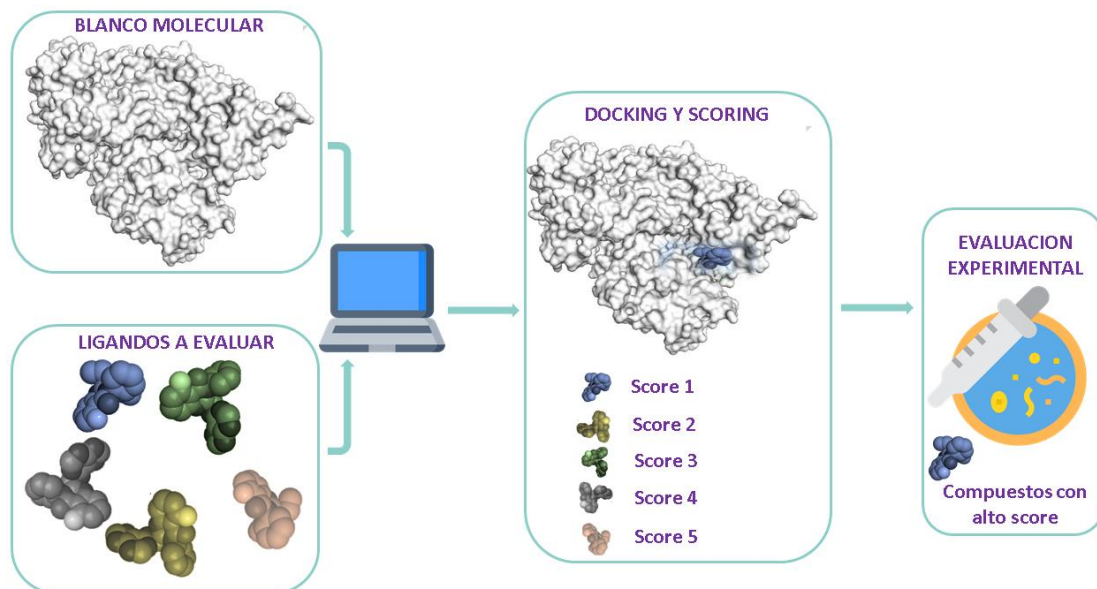


Figura 4.4 Esquema general de la técnica de *docking* molecular aplicada a SV.

#### 4.2.2. Métodos basados en el ligando

En muchas ocasiones, la estructura tridimensional del blanco molecular no está disponible, ya sea porque no es posible obtenerla mediante las distintas metodologías experimentales, o bien porque no se puede modelar a través del modelado por homología. En esos casos cobran especial importancia los métodos basados en el ligando que emplean la información obtenida de la estructura química de un conjunto



de compuestos con actividad conocida para identificar compuestos candidatos a ser evaluados experimentalmente. En esta ocasión y dependiendo de la información disponible, las técnicas utilizan métodos basados en alineamientos con hipótesis farmacofóricas, estrategias que incluyen la búsqueda por similitud molecular y metodologías basadas en descriptores moleculares **(Li & Shah, 2017)**.

#### 4.2.2.1. Métodos basados en el farmacóforo

El farmacóforo se puede describir como un arreglo tridimensional que posee características mínimas estructurales o funcionales comunes, que comparten un conjunto de moléculas diferentes y que son esenciales para que ejerzan la actividad biológica por interacción con el blanco molecular correspondiente **(Seidel et al., 2019)**. Más específicamente, la IUPAC lo define como un conjunto de propiedades estéricas y electrónicas necesarias para garantizar las interacciones óptimas con un blanco biológico específico **(Wermuth et al., 1998)**. En general, esta técnica consiste en superponer un conjunto de moléculas que comparten determinada actividad biológica, con el objetivo de extraer aquellas propiedades o características químicas comunes que se presentan como esenciales para manifestar dicha actividad **(Yang, 2010)**. Luego, las moléculas que presentan patrones farmacofóricos similares serán reconocidas por el mismo sitio de unión en el blanco molecular, por lo tanto se espera que desencadenen similar respuesta biológica **(Seidel et al., 2019)**. Ocasionalmente, puede inferirse una hipótesis farmacofórica a partir de un número reducido de ligandos (por ejemplo, cuando se dispone de ligandos rígidos).

Por otra parte, se pueden desarrollar modelos con alta calidad a partir del complejo ligando-blanco. La rigidez del ligando dentro del complejo permite ubicar con mayor precisión las características farmacofóricas, incorporando adicionalmente información sobre la forma del sitio activo. Existen distintos algoritmos capaces, automáticamente, de reconocer el ligando y crear una grilla en su espacio más próximo para finalmente generar el farmacóforo **(Sliwoski et al., 2014)**.



La construcción manual del farmacóforo es la metodología más simple, siempre y cuando se cuente con la estructura del ligando unido o cuando la flexibilidad conformacional del ligando sea lo suficientemente despreciable como para disminuir la incertidumbre en la determinación de las conformaciones óptimas para la unión.

Comúnmente las características que se superponen son “difusas” (es decir, pueden ser satisfechas por distintas funciones o grupos químicos) e involucran grupos de átomos con cargas positiva y negativa, dadores y aceptores de puente de hidrógeno y regiones o sustituyentes con carácter hidrofóbico. Los métodos de superposición, consideran la geometría 3D y habitualmente evalúan la diferencia entre dos conformaciones (la de menor energía, obtenida por análisis conformacional, y la conformación activa definida por el farmacóforo); esto implica la necesidad de realizar una búsqueda conformacional para cada estructura de la base de datos a fin de superponer uno o varios conformeros de baja energía, lo cual se traduce en un incremento del costo computacional (**Seidel *et al.*, 2019**).

#### 4.2.2.2. Similitud molecular

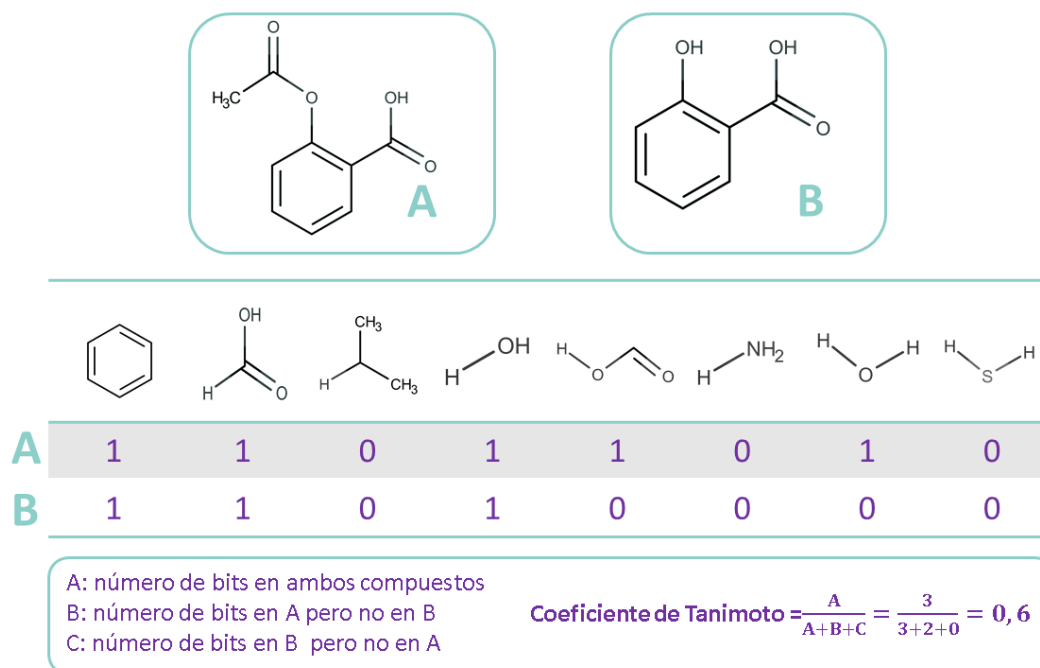
Bajo la premisa “estructuras similares comparten actividades biológicas similares”, se han desarrollado herramientas que implican la comparación sistemática y objetiva de pares de estructuras con el fin de encontrar nuevos candidatos a través de la similitud química (**Prieto-Martínez *et al.*, 2019**).

Los métodos de búsqueda por similitud usualmente requieren la representación de la estructura molecular, en la cual se ponderan determinadas propiedades moleculares relevantes, y un método mediante el cual se pueda cuantificar el nivel de similitud que existe entre la estructura de referencia y la estructura candidato (**García-Hernández *et al.*, 2019**). Se consideran dos enfoques principales para medir cuán similares son las estructuras de las moléculas. El primer enfoque considera la resolución del problema de encontrar un subgrafo de borde común máximo (MCES por sus siglas en inglés) entre dos grafos representado por vértices y aristas. Si se consideran dos grafos A y B, el problema es encontrar el máximo subgrafo de A isomorfo a un subgrafo



de B y hallar una similitud basada entre los tamaños de ambas estructuras (**Nouleho Ilemo *et al.*, 2019**).

El segundo enfoque evalúa la intersección entre ciertas secuencias de bits (denominadas *fingerprints* o huellas dactilares) asociadas a las moléculas cuya similitud se compara (Fig. 4.5). Esta comparación debe expresarse de manera tal que pueda ser cuantificada y, es por ello que existen diferentes formas de evaluar la similitud (**Cereto-Massagué *et al.*, 2015**). Cada bit corresponde a una característica estructural o funcional determinada (por ejemplo, una subestructura o subgrafo), de naturaleza 2D o 3D, que puede estar presente o no en cada molécula. En ciertas ocasiones, los bits pueden indicar la frecuencia con la que aquellas propiedades mencionadas aparecen en cada molécula comparada. Finalmente, se cuantifican todos los bits presentes en las estructuras y se convierten en un coeficiente de similitud (**Maggiora *et al.*, 2014**). En general, estos valores oscilan entre 0 y 1, obteniéndose un valor de coeficiente de similitud de 1 para moléculas idénticas y 0 si son completamente disímiles (**Willett, 2006**). Existen distintos coeficientes de similitud que ponderan de diferente manera las características estructurales en el cálculo de similitud; posiblemente el más utilizado sea el coeficiente de Tanimoto, que se encuentra detallado en la sección 5.2 del capítulo siguiente.



**Figura 4.5** Ejemplo esquemático de la metodología de comparación por similitud molecular basada en el cálculo de un coeficiente de similitud, en este caso, el coeficiente de Tanimoto.

Particularmente, los *fingerprints* han sido utilizados ampliamente en técnicas de SV, ya que permiten un nivel de comparación más simplificado donde las representaciones moleculares son muy poco costosas computacionalmente (**Cereto-Massagué et al., 2015**). La velocidad a la que se pueden realizar búsquedas de subestructuras y determinar su similitud, conlleva a una mayor utilización durante el SV, obteniendo, en términos de enriquecimiento de activos, rendimientos semejantes a otras metodologías más complejas. No obstante, estos rendimientos se verán afectados dependiendo el tipo de *fingerprint* que se utilice (**Girschick et al., 2013**).

#### 4.2.2.3. Descriptores moleculares

Un descriptor molecular se define como “el resultado final de un procedimiento lógico y matemático, que transforma la información química codificada en una representación simbólica de una molécula en un número útil o en el resultado de algún experimento estandarizado” (**Todeschini & Consonni, 2010**). De esta manera, cada





estructura se representa mediante conjuntos específicos de propiedades estructurales y fisicoquímicas consideradas relevantes para la actividad biológica de interés. Estas incluyen información que comprende desde el peso molecular, la geometría o el volumen, hasta contenido de anillos, distancias entre átomos, distribución atómica y polarizabilidad, entre muchos otros (**Sliwoski et al., 2014**). Los descriptores moleculares permiten obtener información teórica a partir de una representación de la estructura de una molécula y, luego, vincular aquella con alguna propiedad observada experimentalmente (**Grisoni et al., 2018**).

El cálculo de los descriptores moleculares se puede realizar utilizando diversas herramientas disponibles y la información obtenida a partir de ellos puede, como se dijo, variar de acuerdo con diferentes niveles de complejidad o dimensionalidad (**Grisoni et al., 2018**):

Los **descriptores 0D o 0-dimensionales** se obtienen a partir de la fórmula química, son muy fáciles de calcular e interpretar. Sin embargo, muestran muy escaso contenido de información y un alto grado de degeneración, esto es, para algunos descriptores se podrían presentar iguales valores para moléculas diferentes. Dentro de estos se encuentran el peso molecular, la frecuencia de determinado átomo en la molécula (por ejemplo, el número de átomos de carbono) y la suma o promedio de propiedades atómicas (por ejemplo, los volúmenes atómicos de van der Waals).

Los **descriptores 1D o 1-dimensionales** provienen de la representación de las moléculas como un conjunto de subestructuras, tales como grupos funcionales. Estos descriptores se reflejan mediante una representación binaria, como la presencia o ausencia de una subestructura determinada, o a través de la frecuencia con que esta aparece en la molécula.

A diferencia de los niveles anteriores, los **descriptores 2D o 2-dimensionales** agregan información adicional y consideran cómo son las conexiones entre los átomos respecto de su presencia y naturaleza (**Sliwoski et al., 2014**). La molécula es representada como un grafo, donde los vértices se corresponden a los átomos y las

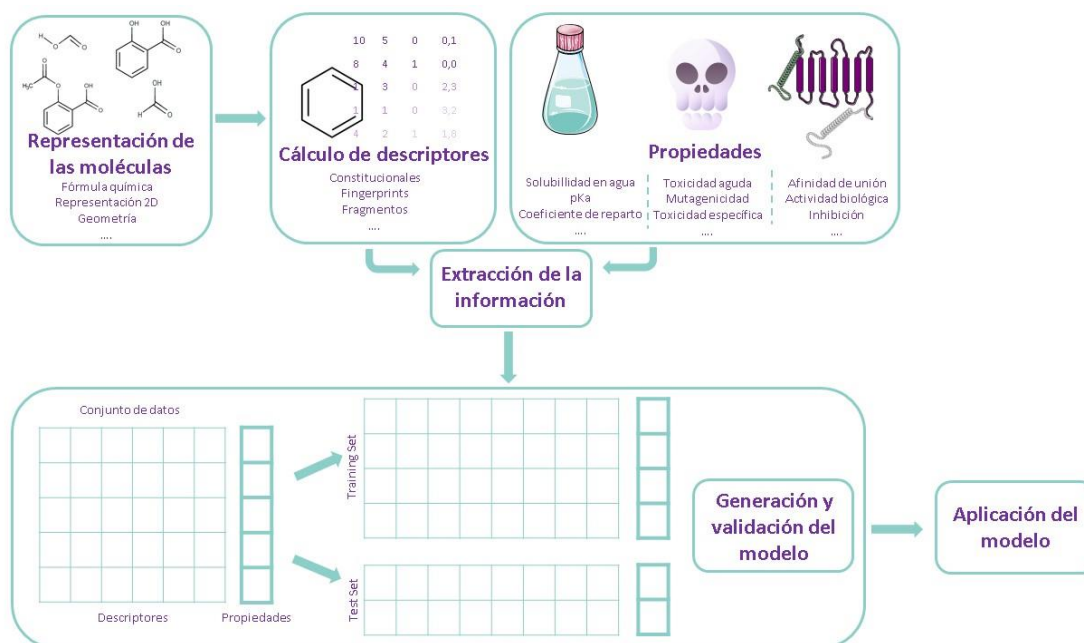


aristas, los enlaces. De esta manera, se derivan los índices topológicos, que comprenden todas aquellas propiedades relacionadas con características estructurales comunes como la forma, el tamaño, la simetría y la ramificación, o la presencia de uniones donores o aceptores de hidrógenos (**Consonni & Todeschini, 2012**).

En un nivel más elevado de complejidad se ubican los **descriptores 3D o 3-dimensionales**, donde no sólo se tiene en cuenta el tipo de átomo, la conectividad y la adyacencia, sino que se obtiene información de la molécula representada geométricamente en el espacio. Los descriptores derivados contienen alto contenido de información y puede ser particularmente útiles durante el modelado y la caracterización de las actividades biológicas (**Grisoni et al., 2018**). Estas variables son más difíciles de calcular e interpretar y, es por ello, que su uso dependerá en cada caso de la relación costo-beneficio. Por último, no menos importante, pero con alto nivel de complejidad, están los **descriptores 4D o 4-dimensionales**, utilizados para caracterizar cuantitativamente las interacciones entre las moléculas y el sitio activo del receptor biológico. En esta instancia, se obtiene una representación basada en una grilla, donde se ubica la molécula y se describen las interacciones a partir de un campo de interacción molecular generado entre un átomo de prueba y todos los átomos de la molécula (**Ferreira, 2017**).

#### 4.2.2.3.1. Aplicación de descriptores moleculares en metodologías de SV

Existen diferentes estrategias estadísticas para encontrar correlaciones entre una variable dependiente (propiedad o actividad a modelar) y uno o más descriptores moleculares. Estas relaciones son conocidas como **Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad o QSAR** (del inglés, *Quantitative Structure-Activity Relationship*). El desarrollo de este tipo de modelos consta de las siguientes etapas generales (Fig. 4.6): (a) selección y curado de datos; (b) cálculo de descriptores moleculares; (c) extracción de la información; (d) generación y validación del modelo; (e) aplicación del modelo.



**Figura 4.6** Etapas vinculadas al desarrollo de modelos QSAR a partir del cálculo de descriptores moleculares representativos.

Los modelos QSAR se clasifican en cuantitativos o cualitativos dependiendo de la naturaleza de la variable dependiente. En los primeros se obtiene como resultado una variable dependiente continua, es decir que es posible predecir el valor numérico de una determinada propiedad o actividad (por ejemplo, IC50, Ki, ED50); los modelos cualitativos generan una respuesta discreta (son conocidos como modelos clasificatorios), en este caso el valor se asocia a distintas categorías (por ejemplo “activo” e “inactivo”, “inhibidor” y “no inhibidor”, etc.). Luego de generados y validados los modelos QSAR pueden ser aplicados en campañas de SV sobre grandes bases de datos de compuestos químicos, a partir de las cuales se puede identificar uno o más compuestos posiblemente activos en la patología que estamos estudiando (**Neves et al., 2018**).



### 4.2.3. Metodologías combinadas

Este enfoque puede ser necesario para satisfacer los requerimientos prácticos al momento de identificar un compuesto promisorio y, a su vez, permite generar flujos de trabajo abocados al diseño o búsqueda de fármacos que resuelvan las limitaciones adherentes a cada metodología particular (**Macalino *et al.*, 2015**).

En la mayoría de los casos, las técnicas basadas en el blanco molecular y en el ligando se combinan o bien de forma secuencial o bien en paralelo. En general, cuando se combinan de manera jerárquica o secuencial, se busca utilizar en una etapa preliminar estrategias que permitan la disminución de costos y tiempos y, luego, en etapas posteriores, emplear métodos más precisos pero con alto costo computacional (**Wang *et al.*, 2020**). La combinación en paralelo tiene como objetivo comparar los compuestos seleccionados de ambos métodos de manera complementaria, es decir, comparar los compuestos mejor clasificados con cada método (**Lavecchia *et al.*, 2013**), pudiendo enfocarse en los *hits* comunes a distintas metodologías (consenso), para aumentar la confiabilidad de la predicción, o en las divergencias, a fin de aumentar la diversidad estructural recuperada.

## 4.3. Reposicionamiento de fármacos

### 4.3.1. Generalidades

Actualmente, uno de los grandes desafíos que atraviesa el descubrimiento de fármacos es encontrar estrategias que mejoren las capacidades de búsqueda de nuevos medicamentos a costos reducidos (**Vanhaelen *et al.*, 2017**). El reposicionamiento de fármacos (en inglés “*drug repositioning*” o “*drug repurposing*”) es una estrategia atractiva para encontrar nuevas indicaciones terapéuticas para drogas existentes. Los candidatos reposicionados en general son drogas ya aprobadas, retiradas del mercado, abandonadas en las fases clínicas por no demostrar la eficacia esperada contra determinada patología, o drogas que se encuentran en etapas avanzadas de



investigación (Naveja *et al.*, 2016; Pushpakom *et al.*, 2019). En los últimos años, a través de las técnicas de reposicionamiento de fármacos se han encontrado nuevas indicaciones terapéuticas, aprobadas por la FDA, para aproximadamente un 30% de las drogas y vacunas que ya estaban disponibles en el mercado (Jin & Wong, 2014). Este crecimiento marcado de la estrategia ofrece varias ventajas respecto con el descubrimiento de una droga *de novo*. Primero, y tal vez más importante, el riesgo de fallar en las distintas etapas del descubrimiento es más bajo, ya que los fármacos reposicionados que han demostrado suficiente seguridad en los modelos preclínicos y en humanos presentan menos probabilidad de fallar por razones de seguridad cuando se estudian para la nueva indicación propuesta. Otra ventaja es la reducción del tiempo que insume el descubrimiento de una nueva droga (Farha & Brown, 2019). Esto conlleva además que se requieran menos inversiones durante las etapas de desarrollo, principalmente durante las fases regulatorias I y II, que representan menores costos para llevar el fármaco al mercado (Pushpakom *et al.*, 2019).

Uno de los ejemplos más conocidos es el caso del sildenafil citrato utilizado en el tratamiento de la hipertensión arterial en su primer uso y más tarde, empleado ampliamente como terapia en la disfunción eréctil; particularmente, se trata de un ejemplo de reposicionamiento por serendipia. Otro ejemplo histórico fue talidomida, utilizado en 1957 para tratar las náuseas de las embarazadas. En 1998, se le encontró un nuevo uso para tratar el eritema nudoso leproso y, más tarde (en 2006) en una segunda oportunidad, para el mieloma múltiple (Vargesson, 2015; Farha & Brown, 2019).

### 4.3.2. Métodos de reposicionamiento de fármacos

La disponibilidad de diferentes bibliotecas de fármacos aprobados y los rápidos avances en la genómica y la bioinformática han acelerado y sistematizado el reposicionamiento de fármacos, empleando tanto estrategias basadas en la actividad (enfoque experimental) como metodologías *in silico* (enfoque computacional) (Shim & Liu, 2014). En el primer enfoque se aplican métodos experimentales de screening de



drogas disponibles, mientras que la estrategia *in silico* utiliza bases de datos y herramientas químico y bioinformáticas para la identificación sistemática de nuevas interacciones entre el blanco molecular y las drogas. Particularmente, se ha incrementado en las últimas décadas la aplicación de este último enfoque a partir del aumento de la información disponible sobre la estructura de las proteínas, datos de bioactividad y diversidad de ensayos de fármacos aprobados o en fases de evaluación (Vanhaelen *et al.*, 2017). En la figura 4.7, se muestra un resumen de los diferentes enfoques empleados en el reposicionamiento de fármacos.



Figura 4.7 Diferentes enfoques empleados en el reposicionamiento de fármacos. Adaptado de (Talevi *et al.*, 2019).

#### 4.3.2.1. Enfoques no computacionales

Conocer el mecanismo de acción de un determinado compuesto, así como la fisiopatología de muchas enfermedades, podría ser determinante para inferir la asociación entre una única droga con múltiples indicaciones terapéuticas (Naveja *et al.*, 2016). Este enfoque se conoce como *estrategias de descubrimiento basadas en la literatura o en el conocimiento*.



Entre las primeras estrategias sistemáticas utilizadas en el reposicionamiento de fármacos también encontramos las *metodologías de screening masivo experimental*. Estos métodos han ido evolucionando desde el screening o cribado de baja performance (donde sólo se analiza un pequeño set de compuestos) hasta las ya discutidas estrategias de HTS que permiten evaluar por encima de 100.000 compuestos en tan sólo un día (**Salazar & Gormley, 2016**). Como ya se mencionó, la principal limitación del HTS es el alto costo requerido para los equipamientos robóticos, la infraestructura y el costo de contar con la colección de compuestos y los gastos operativos; podemos sumar a ello también el elevado número de falsos positivos.

#### 4.3.2.2. Enfoques computacionales

Las grandes ventajas en lo que respecta a tiempo y costos hacen de las metodologías computacionales, estrategias de preferencia frente a otras. De acuerdo con el tipo de información disponible, los métodos *in silico* se pueden clasificar en tres grandes grupos: bioinformáticos, quimioinformáticos y basados en la literatura de alto rendimiento (**Alberca, 2018**).

##### 4.3.2.2.1 Metodologías bioinformáticas

La bioinformática aborda el reto de encontrar similitudes estructurales y conexiones funcionales entre los productos de los genes, y, más recientemente, las similitudes y similitudes inversa/reversa entre los patrones/perfiles de expresión de todo el genoma (firmas genéticas) relacionados con la enfermedad y el efecto de uno o varios fármacos. El perfil de expresión génica ofrece una medida global instantánea de los niveles de transcripción en una célula determinada, tejido u organismo bajo una cierta condición experimental (**Qu & Rajpal, 2012**).

Un recurso público destinado a conectar enfermedades y moléculas bioactivas a través de perfiles génicos es *Connectivity Map* o CMap (Instituto Board) (**Lamb et al., 2006**) y su proyecto extendido LINCS (*Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures*) (**Vidović et al., 2014**), compilan perfiles de expresión génica derivados de la exposición/tratamiento de una serie de células humanas con un gran número de



fármacos y compuestos bioactivos. El recurso emplea algoritmos simples de comparación de patrones que permiten descubrir conexiones funcionales entre fármacos, genes y enfermedades, a través de cambios comunes en la expresión de genes. Entonces, ¿Cómo puede ser utilizado este recurso en el reposicionamiento de fármacos? Si se utiliza una firma genética correspondiente a un estado determinado de una enfermedad como “firma de consulta” (*query*), los fármacos que presenten una similitud inversa a la consulta serían, hipotéticamente, una terapia potencial para restaurar el estado fisiológico. De manera alternativa, si una firma fármaco-efecto es seleccionada como consulta, entonces todas las firmas fármaco-efecto almacenadas similares representarían a los fármacos con efecto similar.

Otras herramientas bioinformáticas que pueden utilizarse son las que comparan secuencias genéticas o estructuras de las proteínas. Estas metodologías se basan en la premisa de que proteínas homólogas de diferentes especies pueden interactuar con los mismos ligandos (**Gfeller & Zoete, 2015**).

Finalmente, proteínas que no poseen relaciones evolutivas aparentes o incluso sin una estructura tridimensional o una función similar, también pueden ser utilizadas en el reposicionamiento. Por ejemplo, puede encontrarse similitud entre sitios de unión de proteínas de posean baja similitud global, las cuales pueden interactuar con ligandos similares. Por lo tanto, conociendo el sitio de unión de una proteína, mediante diferentes herramientas bioinformáticas es posible identificar qué proteínas de una base de datos presentan sitios de unión similar, detectando de esta manera alternativas de reposicionamiento cruzadas en sus respectivos ligandos conocidos (**Konc et al., 2015**).

#### 4.3.2.2.2. Metodologías quimioinformáticas

Las metodologías quimioinformáticas aplicadas en el reposicionamiento de fármacos incluyen principalmente las estrategias de SV discutidas anteriormente, incluyendo aquellas basadas tanto en el ligando como en la estructura del blanco molecular (**Naveja et al., 2016**).





Actualmente existen repositorios de libre acceso que contienen información sobre compuestos químicos aprobados por la FDA o por otras agencias reguladoras o compuestos que se encuentren en alguna etapa de investigación o discontinuados (Talevi, 2016). Por ejemplo DrugBank (Wishart *et al.*, 2018), SweetLead (Novick *et al.*, 2013), Nubbe (Pilon *et al.*, 2017) y DrugCentral (Ursu *et al.*, 2017). Además existen otras bases que incluyen información de blancos moleculares vinculados a enfermedades humanas, tales como *Therapeutic Target Database* (Li *et al.*, 2018).

#### 4.3.2.2.3. Metodologías basadas en la literatura

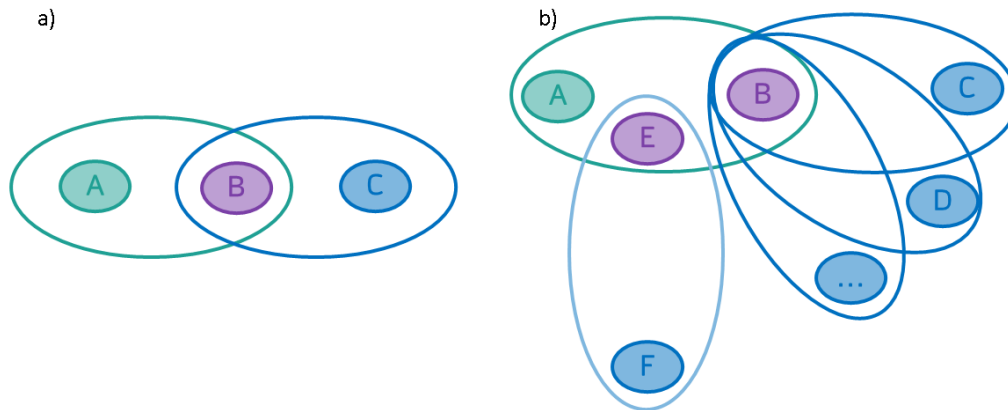
El descubrimiento basado en la literatura (*literature-based discovery* – LBD) parte de la hipótesis de que dos conjuntos de conocimientos o conceptos A y C pueden estar relacionados entre sí si comparten un vínculo a un concepto intermedio B (Deftereos *et al.*, 2011) (de hecho, cuanto más grande es el número de conceptos compartidos entre A y C, más probable será la relación entre ellos).

Este modelo luego se postuló y aplicó por primera vez durante los años '80 y se conoce como el modelo ABC de Swanson (Swanson, 1991). El descubrimiento bajo el modelo ABC puede llevarse a cabo como un proceso cerrado o abierto. Un proceso de descubrimiento cerrado comienza con los conceptos iniciales y de destino conocidos, A y C. La tarea en este caso consiste en identificar y evaluar todos los conceptos intermedios (B) relevantes que apoyan la relación de A y C. Un proceso de descubrimiento abierto, por otro lado, comienza con un concepto inicial conocido A, mientras que el concepto de objetivo relevante C no se conoce de antemano y debe ser identificado por el algoritmo (Fig. 4.8) (Deftereos *et al.*, 2011).

El rápido incremento en el volumen de la literatura científica genera un enorme número de conexiones implícitas/indirectas (y potencialmente valiosas) entre entidades descritas en ella; la posibilidad de este tipo de conexiones para permanecer ocultas/desapercibidas aumenta sustancialmente debido a la naturaleza cada vez más divergente del conocimiento como consecuencia de la especialización científica. Por lo tanto, el desarrollo de métodos automatizados de alto rendimiento de recuperación de



la información y extracción de información relevante es cada día más necesario (Cohen *et al.*, 2012).



**Figura 4.8** Modelos de reposicionamiento basado en literatura. a) El concepto A se relaciona con el concepto B (indicado en la elipse verde), el cual, a su vez, está relacionado con el concepto C (indicado en la elipse azul). Se puede inferir que A y C se relacionan indirectamente a través de B. b) El concepto A se relaciona directamente con B, e indirectamente a través de este, con los conceptos C, D, etc. Además, A está relacionado indirectamente con F, a través de su relación directa con E. Adaptado de (Deftereos *et al.*, 2011).

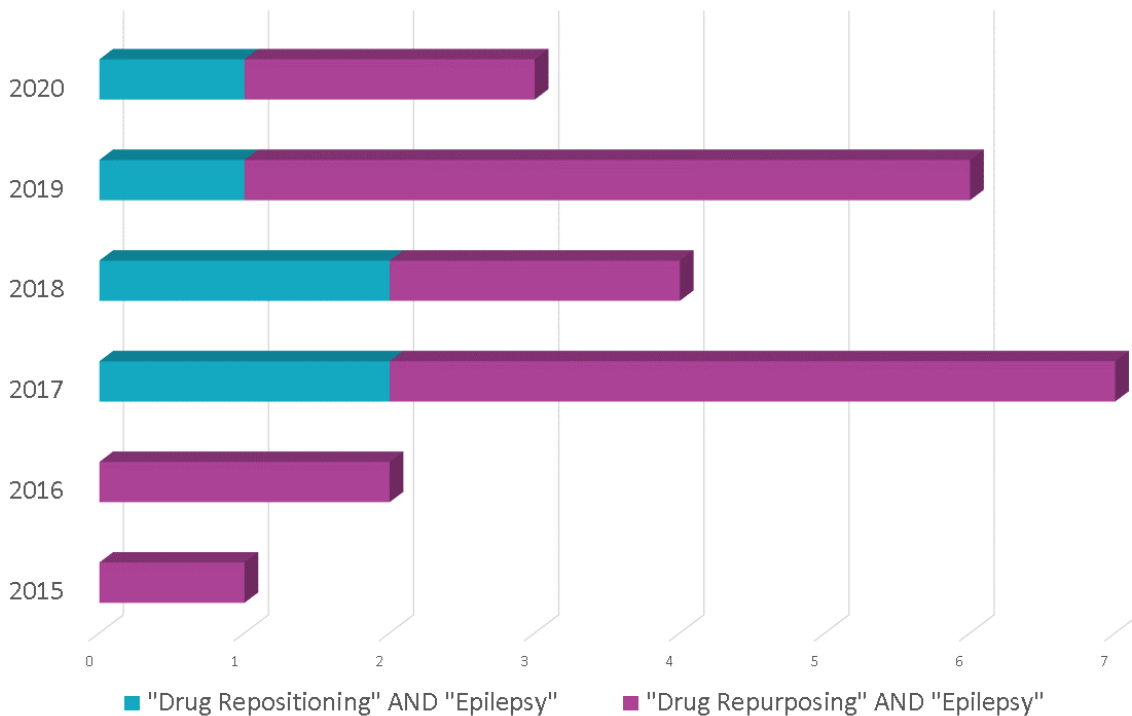
### 4.3.3. Casos exitosos en antiepilépticos

En el campo de la epilepsia, la estrategia de reposicionamiento de fármacos puede presentar ciertas ventajas, principalmente si se tienen en cuenta la compleja naturaleza de la enfermedad y la polifarmacología o promiscuidad de algunos FAEs (Mehndiratta *et al.*, 2016). Se ha observado que los antiarrítmicos y los FAEs comparten algunos de sus mecanismos de acción, como es el caso de la propafenona, un antiarrítmico que demostró una exacerbación de la actividad anticonvulsiva de los FAEs clásicos en el modelo MES en ratones (Banach *et al.*, 2016). La lidocaína utilizada ampliamente como anestésico y el propranolol utilizado en una primera instancia como antiarrítmico de clase II, también demostraron actividad antiepiléptica en pacientes con epilepsia generalizada crónica (de Oliveira & Borges, 1994; Mori *et al.*, 2004). Además, este último presentó efectos anticonvulsivos en modelos de crisis tónico-clónico generalizadas y de crisis parciales complejas (Borowicz & Banach, 2014). Continuando



con los antiarrítmicos, amiodarona (de clase III) y verapamilo (de clase IV) también ejercieron efectos anticonvulsivos en distintos modelos de crisis animal y frente a distintos tipos de epilepsia (**Mehndiratta *et al.*, 2016**).

Como se mencionó anteriormente, desarrollar un nuevo fármaco anticonvulsivo es un importante desafío y se necesita superar una serie de obstáculos adherentes al propio proceso de desarrollo (**Brueggeman *et al.*, 2018**). A pesar de la disponibilidad de una batería de herramientas computacionales, su aplicación ha sido muy poco explorada en lo que respecta a epilepsia (Fig. 4.9). Es por ello que considerar las técnicas de reposicionamiento para el hallazgo de nuevos candidatos a FAEs es una estrategia muy atractiva (**Mehndiratta *et al.*, 2016**).



**Figura 4.9** Número de artículos publicados, en los últimos 5 años, en revistas indexadas por PubMed que contienen el término “epilepsy” en combinación con “drug repositioning” o “drug repurposing”.



#### 4.4. Estrategia utilizada en este trabajo de tesis

En este trabajo de tesis, hemos implementado modelos computacionales en la búsqueda de nuevos compuestos candidatos a ser evaluados frente al modelo de crisis animal de 6 Hz. En una primera instancia, se desarrollaron modelos QSAR-2D cualitativos basados en descriptores moleculares; una vez obtenidos, optimizados y validados los modelos, teniendo en cuenta el éxito de las estrategias de reposicionamiento de fármacos en otras patologías, cribamos diferentes bases de datos de fármacos ya conocidos con el objetivo de reposicionar candidatos que sean activos en el modelo 6 Hz.

#### 4.5. Referencias

- Alberca, L. N. (2018) *Búsqueda asistida por computadora de nuevos fármacos antichagásicos análogos de poliaminas*. Available at: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/72607>.
- Allarakhia, M. (2013) 'Open-source approaches for the repurposing of existing or failed candidate drugs: learning from and applying the lessons across diseases', *Drug Design, Development and Therapy*, p. 753. doi: 10.2147/DDDT.S46289.
- Banach, M., Piskorska, B. and Borowicz-Reutt, K. K. (2016) 'Propafenone enhances the anticonvulsant action of classical antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock model', *Pharmacological Reports*, 68(3), pp. 555–560. doi: 10.1016/j.pharep.2016.01.002.
- Blass, B. E. (2015) 'Drug Discovery and Development', in *Basic Principles of Drug Discovery and Development*. Elsevier, pp. 1–34. doi: 10.1016/B978-0-12-411508-8.00001-3.
- Borowicz, K. K. and Banach, M. (2014) 'Antiarrhythmic drugs and epilepsy', *Pharmacological Reports*. Elsevier, pp. 545–551. doi: 10.1016/j.pharep.2014.03.009.
- Brueggeman, L. *et al.* (2018) 'Drug repositioning in epilepsy reveals novel antiseizure candidates', *Annals of Clinical and Translational Neurology*. Wiley-Blackwell, 6(2), p. acn3.703. doi: 10.1002/acn3.703.
- Cereto-Massagué, A. *et al.* (2015) 'Molecular fingerprint similarity search in virtual screening', *Methods*, 71, pp. 58–63. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.08.005.
- Choi, J. *et al.* (2013) *Generation and application of drug indication inference models using typed network motif comparison analysis*, *BMC Medical Informatics and Decision Making*. doi: 10.1186/1472-6947-13-S1-S2.
- Ciani, O. and Jommi, C. (2014) 'The role of health technology assessment bodies in shaping drug development', *Drug Design, Development and Therapy*, p. 2273. doi: 10.2147/DDDT.S49935.



- Cohen, T. *et al.* (2012) 'Discovering discovery patterns with predication-based Semantic Indexing', *Journal of Biomedical Informatics*, 45(6), pp. 1049–1065. doi: 10.1016/j.jbi.2012.07.003.
- Consonni, V. and Todeschini, R. (2012) 'Multivariate Analysis of Molecular Descriptors', in *Statistical Modelling of Molecular Descriptors in QSAR/QSPR*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 111–147. doi: 10.1002/9783527645121.ch4.
- Deftereos, S. N. *et al.* (2011) 'Drug repurposing and adverse event prediction using high-throughput literature analysis', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 3(3), pp. 323–334. doi: 10.1002/wsbm.147.
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G. and Hansen, R. W. (2016) 'Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs', *Journal of Health Economics*, 47, pp. 20–33. doi: 10.1016/j.jhealeco.2016.01.012.
- Dowden, H. and Munro, J. (2019) 'Trends in clinical success rates and therapeutic focus', *Nature Reviews Drug Discovery*. NLM (Medline), 18(7), pp. 495–496. doi: 10.1038/d41573-019-00074-z.
- Farha, M. A. and Brown, E. D. (2019) 'Drug repurposing for antimicrobial discovery', *Nature Microbiology*, 4(4), pp. 565–577. doi: 10.1038/s41564-019-0357-1.
- Ferreira, M. M. C. (2017) 'Multivariate QSAR'. American Cancer Society, pp. 1–38. doi: 10.1002/9781118468586.EPOC3013.
- Garcia-Hernandez, C., Fernández, A. and Serratosa, F. (2019) 'Ligand-Based Virtual Screening Using Graph Edit Distance as Molecular Similarity Measure', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(4), pp. 1410–1421. doi: 10.1021/acs.jcim.8b00820.
- Gaulton, A. *et al.* (2017) 'The ChEMBL database in 2017', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 45(D1), pp. D945–D954. doi: 10.1093/nar/gkw1074.
- Gfeller, D. and Zoete, V. (2015) 'Protein homology reveals new targets for bioactive small molecules', *Bioinformatics*, 31(16), pp. 2721–2727. doi: 10.1093/bioinformatics/btv214.
- Girschick, T., Puchbauer, L. and Kramer, S. (2013) 'Improving structural similarity based virtual screening using background knowledge', *Journal of Cheminformatics*, 5(1). doi: 10.1186/1758-2946-5-50.
- Grisoni, F. *et al.* (2018) 'Molecular Descriptors for Structure–Activity Applications: A Hands-On Approach', in, pp. 3–53. doi: 10.1007/978-1-4939-7899-1\_1.
- Jesús Naveja, J., Dueñas-González, A. and Medina-Franco, J. L. (2016) 'Drug Repurposing for Epigenetic Targets Guided by Computational Methods', in *Epi-Informatics: Discovery and Development of Small Molecule Epigenetic Drugs and Probes*. Elsevier Inc., pp. 327–357. doi: 10.1016/B978-0-12-802808-7.00012-5.
- Jin, G. and Wong, S. T. C. (2014) 'Toward better drug repositioning: Prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines', *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 19(5), pp. 637–644. doi: 10.1016/j.drudis.2013.11.005.



- Kim, S. *et al.* (2016) 'PubChem substance and compound databases', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 44(D1), pp. D1202–D1213. doi: 10.1093/nar/gkv951.
- Konc, J. *et al.* (2015) 'ProBiS-CHARMMing: Web Interface for Prediction and Optimization of Ligands in Protein Binding Sites', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(11), pp. 2308–2314. doi: 10.1021/acs.jcim.5b00534.
- Kontoyianni, M. (2017) 'Docking and virtual screening in drug discovery', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 255–266. doi: 10.1007/978-1-4939-7201-2\_18.
- Kumar, A. and Zhang, K. Y. J. (2015) 'Hierarchical virtual screening approaches in small molecule drug discovery', *Methods*, 71, pp. 26–37. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.07.007.
- Lamb, J. *et al.* (2006) 'The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes, and Disease', *Science*, 313(5795), pp. 1929–1935. doi: 10.1126/science.1132939.
- Lavecchia, Antonio *et al.* (2013) 'Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review'. doi: 10.2174/09298673113209990001.
- Li, Q. and Shah, S. (2017) 'Structure-based virtual screening', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 111–124. doi: 10.1007/978-1-4939-6783-4\_5.
- Li, Y. H. *et al.* (2018) 'Therapeutic target database update 2018: enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics.', *Nucleic acids research*, 46(D1), pp. D1121–D1127. doi: 10.1093/nar/gkx1076.
- Lionta, E. *et al.* (2014) 'Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances', *Current Topics in Medicinal Chemistry*. Bentham Science Publishers Ltd., 14(16), pp. 1923–1938. doi: 10.2174/1568026614666140929124445.
- Löscher, W. *et al.* (2013) 'New avenues for anti-epileptic drug discovery and development', *Nature Reviews Drug Discovery*, pp. 757–776. doi: 10.1038/nrd4126.
- Łukawski, K. *et al.* (2016) 'Exploring the latest avenues for antiepileptic drug discovery and development', *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11(4), pp. 369–382. doi: 10.1517/17460441.2016.1154840.
- Ma, D. L., Chan, D. S. H. and Leung, C. H. (2013) 'Drug repositioning by structure-based virtual screening', *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry, pp. 2130–2141. doi: 10.1039/c2cs35357a.
- Macalino, S. J. Y. *et al.* (2015) 'Role of computer-aided drug design in modern drug discovery', *Archives of Pharmacal Research*. Pharmaceutical Society of Korea, 38(9), pp. 1686–1701. doi: 10.1007/s12272-015-0640-5.
- Maggiara, G. *et al.* (2014) 'Molecular Similarity in Medicinal Chemistry', *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(8), pp. 3186–3204. doi: 10.1021/jm401411z.
- McInnes, C. (2007) 'Virtual screening strategies in drug discovery', *Current Opinion in Chemical Biology*, pp. 494–502. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.08.033.
- Mehndiratta, M. M. *et al.* (2016) 'Drug repositioning', *International Journal of Epilepsy*, 03(02),



pp. 091–094. doi: 10.1016/j.ijep.2016.09.002.

Mohs, R. C. and Greig, N. H. (2017) 'Drug discovery and development: Role of basic biological research', *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*. Elsevier Inc., 3(4), pp. 651–657. doi: 10.1016/j.trci.2017.10.005.

Mori, K. *et al.* (2004) 'Successful Management of Intractable Epilepsy with Lidocaine Tapes and Continuous Subcutaneous Lidocaine Infusion', *Epilepsia*, 45(10), pp. 1287–1290. doi: 10.1111/j.0013-9580.2004.17304.x.

Neves, B. J. *et al.* (2018) 'QSAR-Based Virtual Screening: Advances and Applications in Drug Discovery', *Frontiers in Pharmacology*, 9. doi: 10.3389/fphar.2018.01275.

Nouleho Ilemo, S. *et al.* (2019) 'Improving graphs of cycles approach to structural similarity of molecules', *PLOS ONE*. Edited by M. S. Rahman, 14(12), p. e0226680. doi: 10.1371/journal.pone.0226680.

Novac, N. (2013) 'Challenges and opportunities of drug repositioning', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 34(5), pp. 267–272. doi: 10.1016/j.tips.2013.03.004.

Novick, P. A. *et al.* (2013) 'SWEETLEAD: an In Silico Database of Approved Drugs, Regulated Chemicals, and Herbal Isolates for Computer-Aided Drug Discovery', *PLoS ONE*. Edited by F. Pappalardo, 8(11), p. e79568. doi: 10.1371/journal.pone.0079568.

O'boyle, N. M. *et al.* (2011) *Open Babel: An open chemical toolbox*. doi: 10.1186/1758-2946-3-33.

de Oliveira, G. G. and Borges, M. A. (1994) 'PROPRANOLOL ACTION IN CHRONICALLY UNSTABLE GENERALIZED EPILEPSY', *American Journal of Therapeutics*, 1(1), pp. 38–41. doi: 10.1097/00045391-199406000-00007.

Pettersen, E. F. *et al.* (2004) 'UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis', *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), pp. 1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084.

Pilon, A. C. *et al.* (2017) 'NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity', *Scientific Reports*, 7(1), p. 7215. doi: 10.1038/s41598-017-07451-x.

Prieto-Martínez, F. D. *et al.* (2019) 'Computational Drug Design Methods—Current and Future Perspectives', in *In Silico Drug Design*. Elsevier, pp. 19–44. doi: 10.1016/B978-0-12-816125-8.00002-X.

Prieto-Martínez, F. D., Norinder, U. and Medina-Franco, J. L. (2019) 'Cheminformatics Explorations of Natural Products', in, pp. 1–35. doi: 10.1007/978-3-030-14632-0\_1.

Pushpakom, S. *et al.* (2019) 'Drug repurposing: progress, challenges and recommendations', *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), pp. 41–58. doi: 10.1038/nrd.2018.168.

Qu, X. A. and Rajpal, D. K. (2012) 'Applications of Connectivity Map in drug discovery and development', *Drug Discovery Today*, 17(23–24), pp. 1289–1298. doi: 10.1016/j.drudis.2012.07.017.

Salazar, D. E. and Gormley, G. (2017) 'Modern Drug Discovery and Development', in *Clinical and*





- Translational Science*. Elsevier, pp. 719–743. doi: 10.1016/B978-0-12-802101-9.00041-7.
- Seidel, T. *et al.* (2019) 'The Pharmacophore Concept and Its Applications in Computer-Aided Drug Design', in, pp. 99–141. doi: 10.1007/978-3-030-14632-0\_4.
- Shim, J. S. and Liu, J. O. (2014) 'Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs', *International Journal of Biological Sciences*, 10(7), pp. 654–663. doi: 10.7150/ijbs.9224.
- Sliwoski, G. *et al.* (2014) 'Computational methods in drug discovery', *Pharmacological Reviews*, pp. 334–395. doi: 10.1124/pr.112.007336.
- Sousa, S. F., Fernandes, P. A. and Ramos, M. J. (2006) 'Protein-ligand docking: Current status and future challenges', *Proteins: Structure, Function and Genetics*, pp. 15–26. doi: 10.1002/prot.21082.
- Sterling, T. and Irwin, J. J. (2015) 'ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone', *Journal of Chemical Information and Modeling*. American Chemical Society, 55(11), pp. 2324–2337. doi: 10.1021/acs.jcim.5b00559.
- Swanson, D. R. (1991) 'Complementary structures in disjoint science literatures', in *Proceedings of the 14th annual international ACM SIGIR conference on Research and development in information retrieval - SIGIR '91*. New York, New York, USA: ACM Press, pp. 280–289. doi: 10.1145/122860.122889.
- Takebe, T., Imai, R. and Ono, S. (2018) 'The Current Status of Drug Discovery and Development as Originated in United States Academia: The Influence of Industrial and Academic Collaboration on Drug Discovery and Development', *Clinical and Translational Science*. Blackwell Publishing Ltd, 11(6), pp. 597–606. doi: 10.1111/cts.12577.
- Talevi, A.; Rocha, L. (2016) *Antiepileptic Drug Discovery*. Edited by A. Talevi and L. Rocha. New York, NY: Springer New York (Methods in Pharmacology and Toxicology). doi: 10.1007/978-1-4939-6355-3.
- Talevi, A. (2016) 'Computational approaches for innovative antiepileptic drug discovery', *Expert Opinion on Drug Discovery*. Taylor and Francis Ltd, 11(10), pp. 1001–1016. doi: 10.1080/17460441.2016.1216965.
- Talevi, A. (2018) 'Computer-Aided Drug Design: An Overview', in, pp. 1–19. doi: 10.1007/978-1-4939-7756-7\_1.
- Talevi, A. and Bruno Blanch, L. E. (2009) 'Screening Virtual: una herramienta eficaz para el desarrollo de nuevos fármacos en Latinoamérica', *Latin American Journal of Pharmacy*, 28, no. 1.
- Talevi, A., Carrillo, C. and Comini, M. (2019) 'The Thiol-polyamine Metabolism of *Trypanosoma cruzi*: Molecular Targets and Drug Repurposing Strategies', *Current Medicinal Chemistry*, 26(36), pp. 6614–6635. doi: 10.2174/0929867325666180926151059.
- The UniProt Consortium (2019) 'UniProt: a worldwide hub of protein knowledge', *Nucleic Acids Research*, 47(D1), pp. D506–D515. doi: 10.1093/nar/gky1049.





- Todeschini, R. and Consonni, V. (2010) *Molecular Descriptors for Chemoinformatics, Molecular Descriptors for Chemoinformatics*. Wiley Blackwell. doi: 10.1002/9783527628766.
- Ursu, O. *et al.* (2017) 'DrugCentral: online drug compendium', *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp. D932–D939. doi: 10.1093/nar/gkw993.
- Vanhaelen, Q. *et al.* (2017) 'Design of efficient computational workflows for in silico drug repurposing', *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, pp. 210–222. doi: 10.1016/j.drudis.2016.09.019.
- Vargesson, N. (2015) 'Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms', *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 105(2), pp. 140–156. doi: 10.1002/bdrc.21096.
- Vidović, D., Koletić, A. and Schürer, S. C. (2014) 'Large-scale integration of small molecule-induced genome-wide transcriptional responses, Kinome-wide binding affinities and cell-growth inhibition profiles reveal global trends characterizing systems-level drug action', *Frontiers in Genetics*, 5. doi: 10.3389/fgene.2014.00342.
- Wang, Y. and Chen, Z. (2019) 'An update for epilepsy research and antiepileptic drug development: Toward precise circuit therapy', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., pp. 77–93. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.010.
- Wang, Z. *et al.* (2020) 'Combined strategies in structure-based virtual screening', *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(6), pp. 3149–3159. doi: 10.1039/C9CP06303J.
- Wermuth, CG; Ganellin, CR; Lindberg, P. M. LA (1998) *INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY CHEMISTRY AND HUMAN HEALTH DIVISION MEDICINAL CHEMISTRY SECTION GLOSSARY OF TERMS USED IN MEDICINAL CHEMISTRY*.
- Willett, P. (2006) 'Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints', *Drug Discovery Today*, 11(23–24), pp. 1046–1053. doi: 10.1016/j.drudis.2006.10.005.
- Wishart, D. S. *et al.* (2018) 'DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46(D1), pp. D1074–D1082. doi: 10.1093/nar/gkx1037.
- Yang, S. Y. (2010) 'Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: Challenges and recent advances', *Drug Discovery Today*, pp. 444–450. doi: 10.1016/j.drudis.2010.03.013.
- Yap, C. W. (2011) 'PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints', *Journal of Computational Chemistry*, 32(7), pp. 1466–1474. doi: 10.1002/jcc.21707.



# CAPÍTULO 5

## ESTRATEGIA COMPUTACIONAL Y VALIDACIÓN EXPERIMENTAL: METODOLOGÍA





## Capítulo 5: Estrategia Computacional y Validación Experimental: Metodología

### 5.1. Introducción

Las relaciones estructura-actividad pueden ser representadas de manera general mediante la ecuación 5.1:

$$A = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

Donde A es la actividad biológica, reflejada a través de una variable categórica o continua, la cual es dependiente de  $n$  descriptores moleculares  $x$  (**Grisoni et al., 2018**).

El desarrollo de modelos QSAR, es un proceso complejo que involucra diferentes etapas (**Cherkasov et al., 2014**): a) Compilado y curado de la base de datos de compuestos que posean determinada la actividad biológica de interés; b) Cálculo de descriptores moleculares; c) Generación de los modelos que vinculan cuantitativamente la variable dependiente con un subconjunto de descriptores moleculares; d) Validación de los modelos generados (**Alberca, 2018**).

Conforme a lo mencionado en el objetivo de la tesis, hemos desarrollado funciones discriminantes o modelos clasificatorios capaces de distinguir compuestos activos frente al modelo animal de crisis 6 Hz. En este capítulo abordaremos la metodología *in silico* empleada y su validación experimental.

En la figura 5.1 se presenta un flujo de trabajo que resume la estrategia empleada:

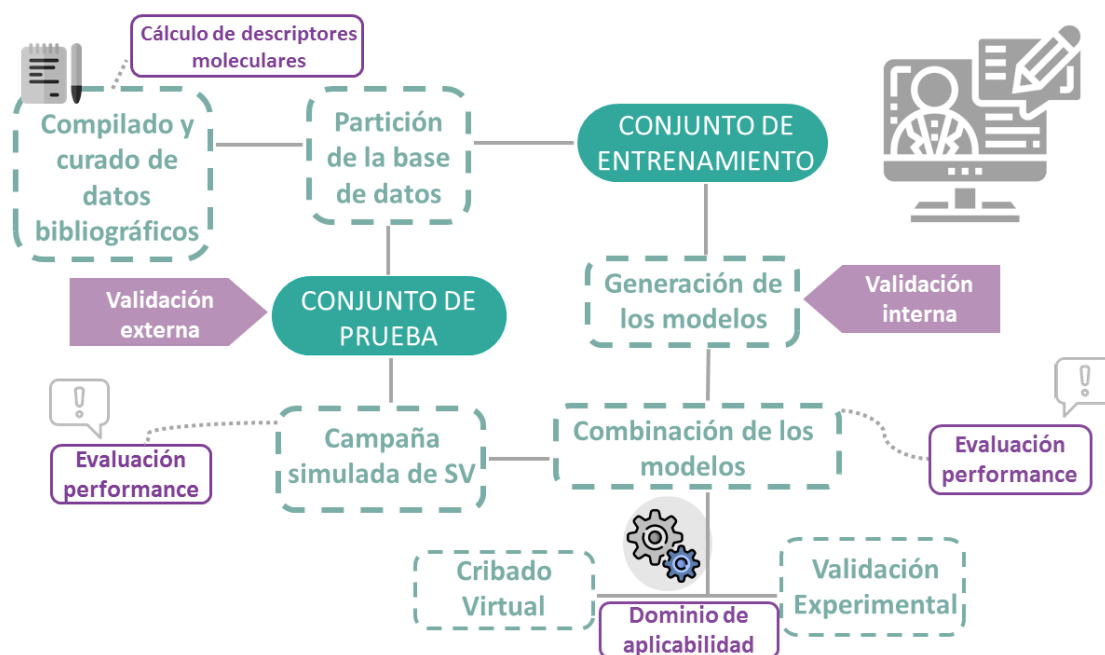


Figura 5.1 Flujo de trabajo general empleando durante el desarrollo de modelos QSAR.

## 5.2. Obtención de modelos QSAR (funciones discriminantes)

### 5.2.1. Compilado de la base de datos

El primer paso para la confección de los modelos computacionales es la recolección de datos de la actividad de interés, en nuestro caso reportes de actividad de diferentes compuestos ensayados en el modelo agudo 6 Hz. Es crucial que el conjunto de datos que obtengamos lo curemos en términos de que el cálculo de los descriptores moleculares se realice a partir de representaciones estandarizadas de la estructura molecular de los compuestos que conforman ese conjunto (**Mansouri et al., 2016**). Por ejemplo, debe definirse si las estructuras aromáticas se representarán como dobles enlaces conjugados o si los electrones  $\pi$  correspondientes se presentarán como electrones deslocalizados; si los hidrógenos se presentarán de manera explícita o implícita, etc.



Con el fin de realizar los modelos QSAR, es importante comenzar por buscar aquellos compuestos que se encuentren reportados como activos e inactivos frente al blanco molecular, o, en nuestro caso, en el modelo experimental de interés. Debe destacarse que, aunque la teoría QSAR se desarrolló inicialmente en el marco de un paradigma fuertemente enfocado en el blanco molecular y en la descripción y predicción de la actividad biológica de series de homólogos y series de compuestos con el mismo núcleo químico, existe abundante evidencia empírica de que puede ser exitosamente aplicada a la predicción de respuestas fenotípicas (Bellera & Talevi, 2019), estrategia que ha sido potenciada con el advenimiento de las técnicas de aprendizaje automático de última generación, incluyendo el aprendizaje por ensamblado, el aprendizaje multitarea y el aprendizaje profundo (Bellera & Talevi, 2019).

En primer lugar, entonces, realizamos una búsqueda bibliográfica utilizando la combinación de las siguientes palabras clave: “6 Hz seizure model”; “6 Hz model” AND “antiepileptic drug”; “6 Hz model” AND “antiseizure drug” en los repositorios Scopus (<https://www.scopus.com/home.uri>) y PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Es importante destacar que la mayoría de los datos relevados reportaban un porcentaje de actividad, medido como protección frente a las crisis inducidas (número de animales protegidos respecto de número de animales evaluados), a una cierta dosis y a un cierto tiempo. Se consideraron compuestos “ACTIVOS” a aquellos reportados con actividad igual o mayor a 75% a diferentes tiempos post-administración, a dosis iguales o menores a 30 mg/kg. En contraste, los compuestos evaluados a dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg que no presentaron protección alguna contra las crisis fueron catalogados como “INACTIVOS”. Los compuestos que a dosis menores o iguales a 30 mg/kg presentaron protección sobre 0% a 25% de los animales evaluados fueron excluidos, por considerarse su clasificación dudosa.

El curado de la base de datos es un paso de partida crítico para desarrollar modelos con alta capacidad de predicción (Roy *et al.*, 2015). Cualquier error en la representación de la estructura se traduce en un cálculo incorrecto de los descriptores moleculares y la consecuencia de ello, posiblemente sea una interpretación incorrecta



de los resultados que se obtienen a partir de los modelos (Fourches *et al.*, 2010). Como se mencionó, se recurrió a un procedimiento de estandarización para erradicar incongruencias en la representación de las estructuras moleculares (Fig. 5.2). En líneas generales, se removieron los metales, las moléculas de solvente y contraiones, se neutralizaron las estructuras, se aromatizaron las estructuras con anillos aromáticos, se explicitaron los hidrógenos y, finalmente, se eliminaron estructuras duplicadas. Dado que trabajaríamos con descriptores independientes de la conformación, también se removió de la representación cualquier indicación de estereoisomería óptica. Para tal estandarización se utilizó el programa Standardizer Instant JCHEM v. 16.9.12.0, aplicando los siguientes pasos en el siguiente orden: *disconnect metal atoms; remove solvents; strip salts; remove absolute stereo; add explicit hydrogens; aromatize; neutralize; clean 3D; clean 2D; clear stereo*.

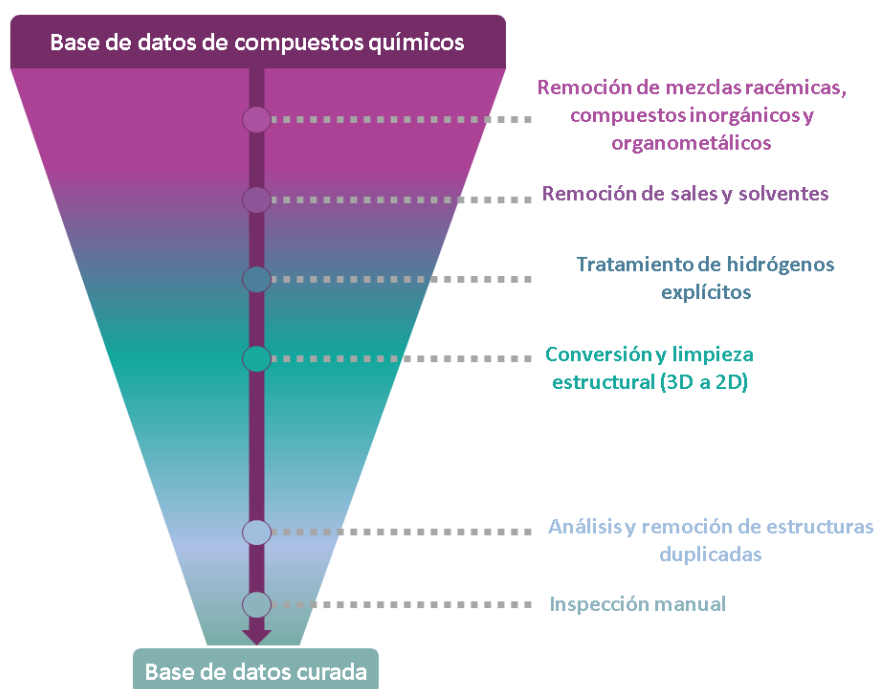


Figura 5.2 Proceso general para el curado de la base de datos empleado en este trabajo de tesis.

Para observar la diversidad de los compuestos dentro de la base de datos y dentro de cada categoría, de manera de asegurar que no se presenten estructuras



repetidas, por un lado, y apreciar la diversidad molecular intra- e inter-clase, se realizaron mapas de calor o *heatmaps* empleando en programa Gitoools versión 2.3.1 (Perez-Llamas & Lopez-Bigas, 2011). Éstos están basados en los coeficientes de Tanimoto, obtenidos mediante huellas dactilares circulares de radio 4 (circular ECFP<sub>4</sub> molecular fingerprints) utilizando el programa ScreenMD – Molecular Descriptor Screening v. 5.5.0.1 (JChem Manager, ChemAxon, 2016). Existen diferentes coeficientes tanto de similitud como de disimilitud; en este trabajo de tesis, se utilizó el coeficiente de disimilitud de Tanimoto  $1 - S_T$ , donde  $S_T$  está representado en la ecuación 5.2:

$$S_T = \frac{c}{a+b-c} \quad 0 < S_T < 1 \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

Donde  $a$ : número de tipos de subestructuras (*bits*) o características estructurales presentes en el compuesto A;  $b$ : número de tipos de subestructuras o *bits* presentes en el compuesto B;  $c$ : número de tipos de subestructuras o bits presentes en ambos compuestos.

### 5.2.2. Partición de la base de datos

Los compuestos de la base de datos deben ser particionados para conformar dos subconjuntos de datos, el conjunto de entrenamiento o *training set* y el conjunto de prueba o *test set*. Estudios previos sugieren que el muestreo racional del set de datos en subconjuntos representativos conduce a modelos con mejor capacidad predictiva (Leonard & Roy, 2006; Martin *et al.*, 2012). Los compuestos dentro de cada conjunto deben abarcar el mayor espacio químico posible, para que los modelos resultantes puedan emplearse para explorar grandes repositorios químicos de gran diversidad molecular. Adicionalmente, se prefiere que las clases del conjunto de entrenamiento estén equitativamente balanceadas para evitar sesgos (Wei & Dunbrack, 2013).

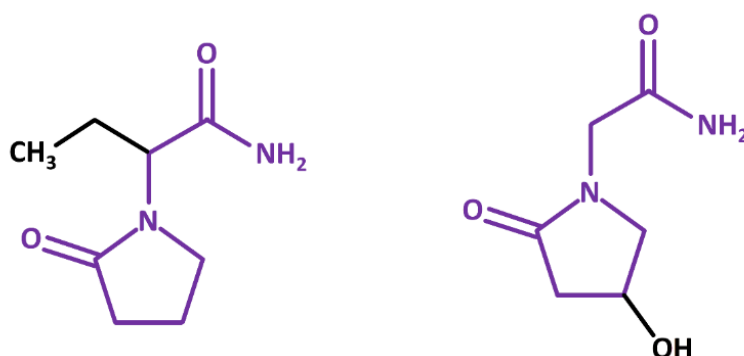
Los algoritmos de partición racional como las metodologías de *clustering* (o agrupamiento) intentan dividir los datos de una forma más representativa, pertenecen





al grupo de técnicas de clasificación no supervisadas (es decir, no requieren de una variable dependiente) y nos permiten agrupar datos utilizando sólo las características moleculares de los compuestos. Existen numerosos métodos de *clustering* basados en descriptores y *fingerprints*, entre los que de manera muy general se puede mencionar al método de Ward (técnica jerárquica), el método de Jarvis-Patrick y el algoritmo *k-means* (ambos pertenecientes a las técnicas no jerárquicas) (**Böcker, 2008**). A continuación, se detalla la estrategia de partición que empleamos.

En este trabajo utilizamos dos metodologías secuenciales de agrupamiento o *clustering* para dividir el conjunto de datos de manera representativa. En una primera etapa se aplicó una técnica de *clustering* jerárquico basado en la máxima subestructura común mediante LibraryMCS v16.10.10.0 (ChemAxon 2016). LibraryMCS se basa en la búsqueda de la máxima subestructura común (MSC) (**Vargyas et al., 2008**), es decir el subgrafo químico de mayor tamaño contenido dentro de las moléculas comparadas. El algoritmo construye una matriz de similitud para el pool de estructuras consideradas y en función de los coeficientes de similitud, selecciona el par de estructuras que presentan el mayor valor del coeficiente, determinando la MSC entre ellas. A partir de esta subestructura MSC, se agrupan todas aquellas estructuras del conjunto de datos que la contienen (Fig. 5.3). Este procedimiento se repite con las moléculas remanentes hasta que no se encuentran más pares de estructuras con un valor de coeficiente de similitud por encima del valor umbral empleado por el algoritmo, o con una MSC por encima del umbral definido por el usuario. Las estructuras que presentan valores de coeficientes menores al valor umbral, no se incluyen dentro de ningún *cluster* y son denominadas *outliers*. Utilizando una MSC de al menos 9 átomos y permitiendo que se fragmenten los anillos, se formaron diferentes *clusters* o grupos, tanto para los activos como para los inactivos, a partir de los cuales se eligieron aquellas estructuras que actuarían como “semilla” para la técnica de *clustering* no jerárquico utilizada en la etapa siguiente.



**Figura 5.3** Ejemplo de Máxima Subestructura Común entre Levetiracetam (izquierda) y Oxiracetam (derecha). Puede observarse que la subestructura de color violeta es común a ambos compuestos.

En una segunda etapa, utilizamos el método de optimización *k-means* empleando el programa Statistica 10 (Statsoft Inc., 2011) (Everitt *et al.*, 2011), se optimizaron los grupos de compuestos obtenidos por jerarquía (Fig. 5.4). El método *k-means* involucra un algoritmo de optimización de agrupamientos que - como cualquier algoritmo de optimización de agrupamientos - obedece los siguientes pasos generales: a) encontrar o proponer una partición inicial de  $n$  objetos en  $k$  grupos; b) calcular la variación en un criterio de agrupamiento cuando un objeto de un grupo se mueve a otro; c) realizar el cambio que conduce a la mayor mejora en el valor del criterio de agrupamiento; d) repetir los pasos b) y c) tantas veces como lo defina el usuario o hasta alcanzar convergencia (cuando ningún desplazamiento de objetos de un grupo a otro produzca una mejoría). En el caso particular del método *k-means*, el criterio de agrupamiento es la minimización de la suma de cuadrados intragrupo (Ecuación 5.3) (Verma *et al.*, 2012).

$$\sum_{m=1}^k \sum_{l=1}^{nm} (x_{ml} - \bar{x}_m)^2 \quad (\text{Ecuación 5.3})$$



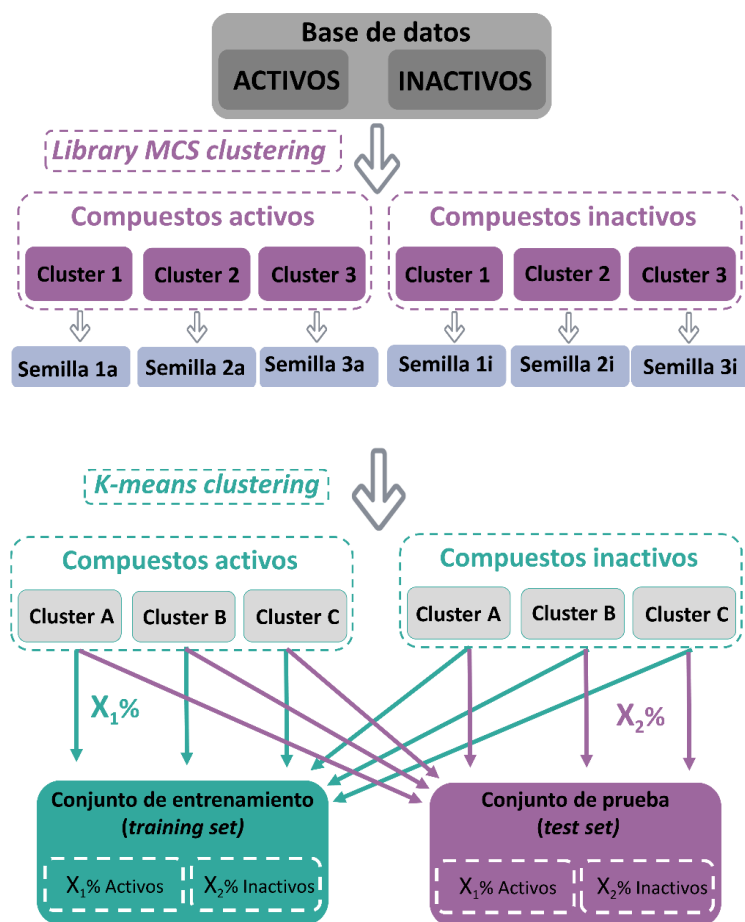
Donde  $k$  representa el número de grupos en los que se particionan los objetos,  $n_m$  es el número de objetos en el grupo  $m$ ,  $x_{ml}$  denota al vector p-dimensional (considerando que se utilizan p descriptores moleculares para caracterizar cada objeto) de observaciones del objeto  $l$  del grupo  $m$ ,  $\bar{x}_m$  y es el vector que representa la media de los elementos del grupo  $m$  en el espacio p-dimensional.

Para esta segunda etapa del *clustering* se calcularon una serie de descriptores con Dragon 6.0 (Talete SRL, 2011) que reflejan distintos aspectos de la estructura molecular<sup>1</sup>, y se normalizaron para el posterior cálculo de la distancia euclidiana. Para el primer paso, se definieron como semillas de los  $k$  grupos  $n$  estructuras elegidas aleatoriamente de los *clusters* propuestos por el algoritmo de *clustering* jerárquico.

Luego de las dos etapas secuenciales de *clustering*, se generaron diferentes conjuntos de moléculas, tanto para los compuestos activos como para los inactivos. De allí, se seleccionaron aleatoriamente un porcentaje cercano a 70% para los compuestos activos y una proporción similar para los inactivos para formar parte del conjunto de entrenamiento o *training set*; mientras que los compuestos restantes se asignaron al conjunto de prueba o *test set* (cercano al 30% para ambas categorías).

---

<sup>1</sup> 'MW': Peso molecular; 'MlogP': Coeficiente de partición octanol agua; 'TPSA (Tot)': Área de superficie total topológica; 'nHAcc': Número de átomos aceptores de enlaces de H; 'IAC': Índice de información total sobre la composición atómica; 'Sv': Suma de los volúmenes atómicos de van der Waals.



**Figura 5.4** Esquema general ilustrativo de partición de la base de datos obtenida a partir de bibliografía, empleando la técnica de *clustering* Library MCS y luego, la técnica de *clustering* *k-means*.

### 5.2.3. Cálculo de descriptores moleculares

En este trabajo, se decidió trabajar con descriptores de baja dimensionalidad (0D - 2D), ya que presentan algunas ventajas respecto a los descriptores 3D/4D. La primera de ellas es que son independientes de la conformación (**Cherkasov *et al.*, 2014**), por lo que su utilización está asociada a menor costo computacional (no es necesario realizar un análisis conformacional previo, lo cual constituye un aspecto fundamental cuando se pretende cribar bases de datos de gran tamaño) y su cálculo es absolutamente reproducible (condición que no siempre se cumple cuando se trabaja con descriptores



dependientes de la geometría utilizando una búsqueda conformacional estocástica). Sin embargo, el empleo de descriptores 2D presenta ciertas limitaciones: muchos de ellos son abstractos y difíciles de interpretar, lo que se traduce en una dificultad para conocer cómo un determinado compuesto interacciona con su blanco molecular, ya que se carece de información sobre el tipo de interacciones y/o efectos electrónicos, estéricos o hidrofóbicos (**Bellera, 2014**).

Se calcularon, con el software Dragon 6.0, 3.668 descriptores moleculares independientes de la conformación para todas las estructuras que conforman cada uno de los conjuntos de datos. En este cálculo, se excluyeron los descriptores constantes y casi constantes (aquellos que presenten baja variabilidad, con desvío estándar  $< 0,05$ ) con el fin de excluir descriptores con bajo contenido de información. También se han excluido aquellos descriptores que presentaban uno o más valores perdidos (es decir, cuando no se podía calcular su valor para alguna/s de las moléculas del conjunto de entrenamiento).

#### 5.2.4. Modelado

Uno de los desafíos que presenta el modelado QSAR es que frecuentemente se utilizan datos ruidosos provenientes de determinaciones en distintos laboratorios, con diferentes protocolos experimentales (por ejemplo, tal vez utilizando equipamientos de distinto fabricante o modelo, distintas cepas de animales, etc.) (**Cherkasov et al., 2014**). Dado que la función (modelo) que se busca no predecirá una variable continua sino la clase a la que pertenece cada elemento de un conjunto de objetos se ha propuesto que el ALD y otras técnicas destinadas a encontrar modelos clasificadores pueden ser útiles para manejar datos ruidosos (por ejemplo, un punto final asociado a gran variabilidad o aquellos casos, como el nuestro, en los que se compilan datos experimentales de distintos laboratorios).



Con el fin de generar los modelos clasificatorios, cada clase de objeto se asoció a un valor de una variable dependiente binaria arbitraria que funciona como etiqueta de las clases. En nuestro caso, a la categoría “Activos” le asignamos el valor de “1”, en tanto que a la categoría de “Inactivos” se le dio el valor de “0”.

#### 5.2.4.1. Subespacios aleatorios

Actualmente, existen muchos métodos que generan automáticamente conjuntos de clasificadores. Algunos de ellos realizan muestreos aleatorizando el conjunto de ejemplos de entrenamiento (tal como *bootstrapping*), otros aleatorizan la elección de los atributos (por ejemplo, el método de subespacios aleatorios) y otros métodos aleatorizan tanto ejemplos como atributos (como en el caso de *Grandon Forest*) (Daho & Chikh, 2015).

En este trabajo de tesis, para generar los modelos clasificatorios se dividió el pool total de descriptores moleculares en 1.000 subconjuntos con no más de 200 descriptores cada uno; luego, a partir de cada subconjunto se generó un modelo clasificador independiente. Esta estrategia se corresponde a un enfoque de subespacios aleatorios, donde los descriptores moleculares se muestrean al azar y cada clasificador individual se entrena en un subconjunto aleatorio del espacio de descriptores. Esta técnica conduce a que los modelos individuales no se concentren en las características que muestran una alta capacidad explicativa en el conjunto de entrenamiento, tendiendo a generar una mejor capacidad predictiva (Vyškovský *et al.*, 2016).

En esta ocasión, se utilizó un script *in house* desarrollado en el lenguaje R v. 3.5.1 (<https://cran.r-project.org/package=data.table>). En el Material Suplementario se presenta el script utilizado para realizar esta aleatorización.

#### 5.2.4.2. Selección de descriptores moleculares y generación de los modelos clasificatorios

La selección de variables independientes que mejor correlacionan con la variable dependiente es un procedimiento crítico del modelado QSAR, ya que podría conducir a



una pobre performance en caso de seleccionarse características poco significativas (Gonzalez *et al.*, 2008).

En este trabajo se optó por la técnica de ALD *Stepwise Forward* (pasos hacia adelante) (Fig. 5.5). Este método estadístico realiza la selección de los descriptores que se incluyen en cada modelo mediante una regresión de cuadrados mínimos por pasos hasta encontrar el mejor modelo (“paso por paso”). En cada etapa, la variable independiente (descriptor) mejor correlacionada con la fracción sin explicar de la varianza de la variable dependiente (clase) es incluida en el modelo de regresión. Estos procesos se realizan una y otra vez hasta que la adición de una nueva variable independiente no contribuye a una reducción significativa de la varianza (Toropova & Toropov, 2017) o hasta alcanzar un máximo de pasos que define el usuario según algún otro criterio (en nuestro caso, evitar o minimizar el sobreajuste).

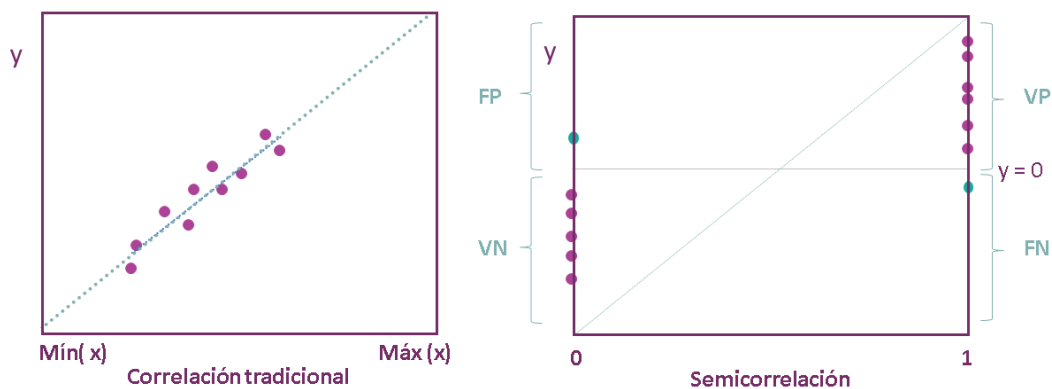


Figura 5.5 Gráfica ilustrativa de una correlación tradicional vs una semicorrelación. VP: verdaderos positivos; VN: verdaderos negativos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos. (Adaptado de Toropova & Toropov, 2017).

Se generaron entonces 1.000 modelos clasificadores o funciones discriminantes, utilizando la técnica mencionada. Se utilizó el lenguaje R v.3.5.1 y entorno RStudio v.1.1.456 para generar los modelos; el script empleado se detalla en la sección Material Suplementario.



Con el fin de excluir de las funciones discriminantes aquellos pares de descriptores altamente correlacionados, se seleccionó un valor de tolerancia ( $\beta$ ) de 0,5. El valor de  $\beta$  presenta una correlación inversa con el máximo valor del coeficiente de correlación entre una variable independiente incluida en el modelo y todas las demás; es la inversa del Factor de Inflación de la Varianza (FIV), tal como se representa en la ecuación 5.4. Cuanto menor es el valor de tolerancia, más redundante es la contribución de una variable respecto de otras variables independientes (**Daoud, 2017; Thompson et al., 2017**).

$$\beta_j = 1 - R_j^2 = \frac{1}{FIV} \quad (\text{Ecuación 5.4})$$

Donde  $R_j$  es el coeficiente de correlación entre la variable independiente  $j$  y todas las restantes variables independientes incluidas en el modelo. En general se acepta que valores de  $FIV \leq 5$  indican que no existe alta multicolinealidad (**Daoud, 2017; Rawlings et al., 1998**). Por lo tanto, el valor de  $\beta$  de 0,5 indicaría como máximo un valor de FIV de 2.

Hoy en día, las diversas herramientas computacionales permiten el cálculo de un gran número de descriptores, de tal modo que es posible que en un modelo QSAR se incluyan un gran número de variables en comparación con el número limitado de ejemplos de entrenamiento, con riesgo de correlaciones espurias (**Roy et al., 2015**). Algo similar podría ocurrir si se recurre a métodos excesivamente flexibles en relación con el número de ejemplos de entrenamiento disponibles. Por otra parte, el principio de Ockham o principio de parsimonia, como se lo conoce más comúnmente, establece que, en igualdad de condiciones, la explicación más sencilla de un fenómeno debe preferirse a la más compleja. Ahora bien, cuando un modelo QSAR quebranta este principio, se incorporan innecesariamente en él mayor número de variables independientes o un exceso de parámetros ajustables, característica que se conoce como sobreajuste (en inglés, *overfitting*) (**Hawkins, 2004**). El sobreajuste implica aumentar el carácter explicativo o descriptivo del modelo (es decir, en nuestro caso su poder clasificador sobre el conjunto de entrenamiento) sacrificando generalizabilidad (es decir, capacidad





predictiva frente al conjunto de prueba o cualquier otro conjunto independiente que se estudie) (**Subramanian & Simon, 2013**). Con el fin de reducir el sobreajuste, se configuró el número máximo de descriptores por modelos en un valor de 6 ( $n = 6$ ), ya que se recomienda una relación mínima de 10 entre el número de objetos de entrenamiento y el número de descriptores (**Subramanian & Simon, 2013**).

La función discriminante (FD) obtenida corresponde a un plano en el espacio  $k$ -dimensional (siendo  $k$  el número de descriptores incluidos en el modelo) que, idealmente, deja a uno y otro lado los compuestos activos e inactivos. La ecuación 5.5 presenta la forma general de una FD (**Yee & Wei, 2012**):

$$FD = a_0 + \sum_{i=1}^k a_i w_i \quad (\text{Ecuación 5.5})$$

Donde  $a_0$  es la ordenada al origen y  $a_i$  es el coeficiente asociado a cada descriptor  $w_i$  que se incluye en la función discriminante (FD).

### 5.3. Validación de los modelos individuales

Para evaluar la robustez y capacidad predictiva de los modelos generados, se utilizaron dos técnicas de validación: **validación interna**, utilizando a tal fin el propio conjunto de entrenamiento, y **validación externa**, realizada empleando el conjunto de prueba (**Roy et al., 2015**). Mediante estas, se puede analizar cómo se comportan los modelos generados, desde el punto de vista de la clasificación. Particularmente, para este trabajo de tesis, un buen modelo o combinación de modelos será aquel que pueda discriminar con un grado alto de confiabilidad entre un compuesto activo y un compuesto inactivo frente al modelo animal de crisis 6 Hz.

#### 5.3.1. Validación interna

Se aplicó el método de validación cruzada *Leave Group Out* (**Veerasingam & Rajak, 2011**).



### 5.3.1.1. Validación Cruzada o Leave Group Out

Un método comúnmente empleado durante la validación interna es la validación cruzada, que comprende distintos enfoques dependiendo de la proporción de los datos utilizada, tales como *Leave Group Out* (LGO, también conocida como *k-fold cross validation*) y *Leave One Out* (LOO) (Gramatica, 2013) (“dejar un grupo fuera” y “dejar uno fuera”, respectivamente). Estas técnicas permiten evaluar la robustez y predictibilidad de los modelos generados (Veerasingam & Rajak, 2011).

En este trabajo de Tesis, se utilizó la técnica de *k-fold Cross Validation* para evaluar la performance de clasificación de las funciones discriminantes generadas. El método implica la división de manera aleatoria del conjunto de entrenamiento en *k* subconjuntos de compuestos (cada subconjunto se denomina *fold*, es decir, doblez o pliegue), los cuales tienen aproximadamente el mismo número de objetos. Los *folds* son removidos, uno por vez, para generar en cada caso un nuevo modelo clasificatorio con los compuestos pertenecientes a los *k-1 folds* restantes. Luego, se evalúa la exactitud de las predicciones de este nuevo modelo sobre el *fold* removido, y este proceso se repite tantas veces hasta haber conseguido, por lo menos, que cada compuesto del *training set* haya sido removido en uno de los *folds*. Se compara luego el desempeño sobre los *folds* con el desempeño del modelo original sobre el *training set* completo (Wong, 2015).

En cada ronda de validación cruzada, se tomó al azar un subconjunto que comprendía 3 compuestos de cada categoría (3 activos y 3 inactivos), y el modelo se regeneró utilizando los compuestos restantes como ejemplos de entrenamiento. El modelo resultante se usó para predecir la etiqueta “clase” para los 6 compuestos eliminados. El procedimiento se repitió 10 veces ( $k=10$ ), eliminando cada uno de los compuestos del conjunto de entrenamiento al menos una vez.

Los resultados se informaron como el porcentaje promedio de buenas clasificaciones (%BC) en los *folds*, y esto se comparó con la performance para el conjunto de entrenamiento original. Un alto %BC promedio significa, por un lado, que las funciones discriminantes que se obtienen son capaces de discriminar entre las dos



categorías, “Activos” e “Inactivos”, pero, además, que el procedimiento por el cual se generó el modelo es robusto en el sentido de que el desempeño del modelo no se modifica sustancialmente ante pequeñas perturbaciones (en este caso, la remoción de un 10% de los ejemplos de entrenamiento). Además, la performance de la predicción interna de los modelos se comparó con el parámetro NOMER% o tasa de error en ausencia del modelo (ecuación 5.6) **(Gramatica, 2013)**.

$$NOMER\% = \frac{n - n_M}{n} \times 100 \quad (\text{Ecuación 5.6})$$

Donde  $n$  es el número total de objetos y  $n_M$  es el número de objetos de la clase más representada.

### 5.3.2. Validación externa

Consiste en predecir el valor de la variable dependiente para un conjunto de moléculas externas que no hayan sido utilizadas para la generación de los modelos **(Veerasamy & Rajak, 2011)**. Aunque las validaciones internas arrojen buenos resultados, la capacidad predictiva de los modelos QSAR solo se puede establecer si se aplica con éxito en un conjunto de prueba externo **(Kausar & Falcao, 2018)**.

Durante esta validación, los modelos generados se aplicaron al conjunto de prueba, que incluía compuestos de ambas clases, y se evaluó así cuáles de ellos estaban correctamente clasificados. Se obtuvieron distintos parámetros: %BC global, %BC para la categoría “ACTIVOS” y para la categoría “INACTIVOS”.

### 5.3.3. Evaluación del desempeño de los modelos

A partir de la construcción de una matriz de confusión, mostrada en la tabla 5.1, que codifica el número de predicciones correctas e incorrectas de cada clase es posible calcular dos indicadores relevantes para estimar el desempeño de un modelo QSAR en tareas de clasificación, la Sensibilidad ( $Se$ , tasa de verdaderos positivos) y la Especificidad ( $Sp$ , tasa de verdaderos negativos) **(Ballabio et al., 2018; Gramatica, 2013)**.



**Tabla 5.1** Matriz de confusión.

		Predicción	
		Positivos	Negativos
Observación	Positivos	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Negativos (FN)
	Negativos	Falsos Positivos (FP)	Verdaderos Negativos (VN)

Las ecuaciones de  $Se$  y  $Sp$  se presentan en las ecuaciones 5.7 y 5.8, respectivamente. Los VP son aquellos compuestos ACTIVOS clasificados como ACTIVOS, FN indican en nuestro caso compuestos ACTIVOS clasificados como INACTIVOS por el modelo, VN indica compuestos INACTIVOS clasificados como INACTIVOS y FP son aquellos compuestos INACTIVOS que son clasificados como ACTIVOS por el modelo.

$$Se = \frac{VP}{VP+FN} \quad (\text{Ecuación 5.7})$$

$$Sp = \frac{VN}{VN+FP} \quad (\text{Ecuación 5.8})$$

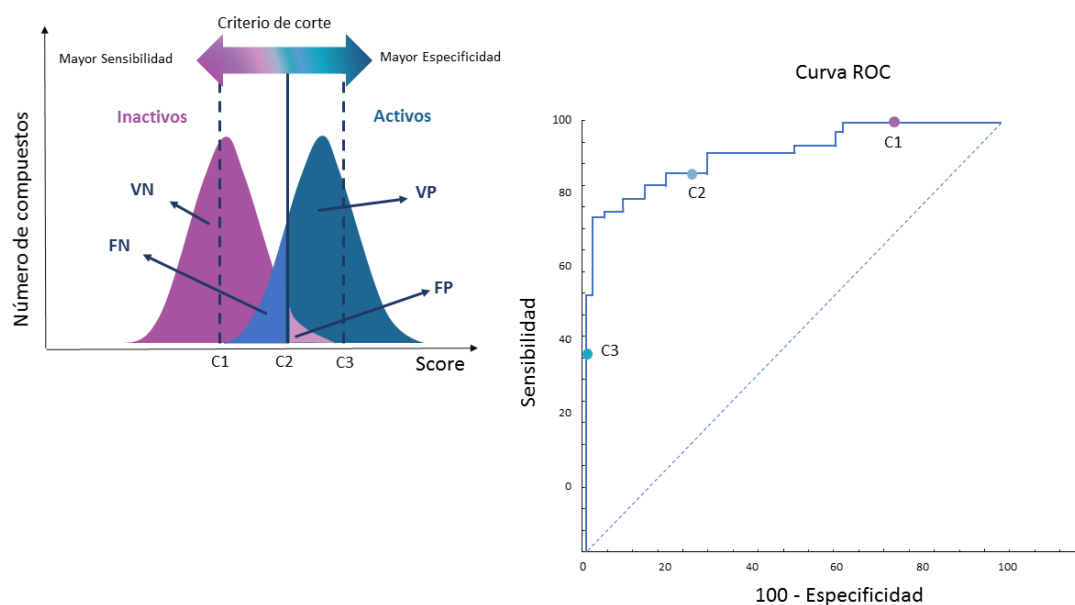
### 5.3.3.1. Análisis del Área bajo la curva ROC

La curva *Receiver Operating Characteristics* (ROC) es una herramienta valiosa que permite evaluar si el modelo se comporta significativamente mejor que una clasificación al azar o que otro modelo (**Roy et al., 2015**). Tal como se observa en la gráfica de la figura 5.6, una AUC ROC igual a 1 se relacionará con un modelo cuya clasificación es perfecta, mientras que un modelo que presente AUC ROC con valores cercanos a 0,5, representada por la línea diagonal de la gráfica, será aquel con un bajo o nulo poder predictivo (clasificaciones al azar) (**Gramatica, 2013**). Valores de AUC ROC comprendidos entre 0,5 y 1, estarán asociados a modelos con capacidades predictivas intermedias, que mejoran conforme se acercan a una AUC ROC = 1.

Como afirman Triballeau y colaboradores en el primer reporte del uso de estas curvas en el marco de una campaña de SV, la selección de un determinado balance entre  $Se$  y  $Sp$  no es una cuestión estadística, sino que depende del contexto. En nuestro caso,



debido al presupuesto limitado para adquirir candidatos, decidimos priorizar  $S_p$  sobre  $S_e$  para reducir el número de falsos positivos (compuestos que ensayaríamos en el ensayo 6 Hz, pero no tendrían la actividad predicha sobre el ensayo). Esto significa, no obstante, que para reducir el número de falsos positivos nos arriesgamos a perder andamios/motivos estructurales potencialmente valiosos (**Bertrand & Triballeau, 2005**).



**Figura 5.6** Gráfica esquemática de la construcción de una curva Receiver Operating Curve (ROC).

Para la obtención de las curvas ROC se utilizó el programa MedCalc Statistical Software versión 16.4.3 (MedCalc Software 2016; <https://www.medcalc.org>). Las distintas curvas ROC fueron comparadas, obteniendo los intervalos de confianza del 95% a través del método no paramétrico de DeLong y colaboradores (**DeLong et al., 1988**).

### 5.3.3.2. Otras métricas generales de evaluación del desempeño

Una diversidad de parámetros estadísticos se utiliza comúnmente para evaluar el desempeño de los modelos clasificatorios (**Gramatica, 2013; Roy & Mitra, 2011**). Entre tales parámetros, se obtuvo la Exactitud o *Accuracy* que, como se ha visto, refiere



a la proporción de clasificaciones correctas respecto del número total de ejemplos en el conjunto. Asimismo, se obtuvieron el Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo. El primero refiere a la proporción de compuestos predichos como activos por el modelo clasificatorio y que experimentalmente demuestran resultados positivos, es decir, poseen la actividad buscada. Por su parte, el Valor Predictivo Negativo es la proporción de compuestos que el modelo clasificatorio predice como inactivos, y cuyos resultados experimentales son negativos (**Gramatica, 2013**).

Se calculó además el parámetro F-measure, el cual evalúa la capacidad de los modelos para aceptar objetos de ambas clases. El F-measure se obtiene como resultado de la media armónica entre la *Se* y la precisión, relacionada con la capacidad del clasificador para evitar predicciones incorrectas dentro de una clase (**Ballabio et al., 2018**). Los valores de este parámetro varían entre 0 y 1. Valores altos de *Se* y de precisión implican valores altos de F-measure que, a su vez, infiere una buena capacidad clasificatoria del modelo (**Roy & Mitra, 2011**).

### 5.3.4. Campañas simuladas de SV

A través de campañas de SV retrospectivo, Truchon y colaboradores demostraron que la desviación estándar de las métricas de AUC obtenidas de las curvas ROC converge a un valor constante cuando se utilizan pequeños rendimientos de activos (también denominados prevalencia de activos  $Y_a$  de la biblioteca analizada (**Truchon et al., 2007**)). Un valor de  $Y_a$  pequeño (por debajo de 0,05) parece proporcionar resultados robustos y también asegura que el efecto de saturación es constante o ausente. Un alto número de señuelos y un pequeño  $Y_a$  contribuyen a un comportamiento estadístico controlado. En consecuencia, se realizaron campañas retrospectivas de SV para estimar el desempeño de los modelos individuales en un escenario similar al que utilizaríamos en una campaña de SV prospectivo. Las campañas de SV retrospectivas nos permiten, entonces, examinar la performance de nuestras funciones discriminantes al ser



confrontadas con bibliotecas químicas similares a las que utilizaremos en un escenario real (**Alberca et al., 2019**).

Para ello, se construyeron dos bibliotecas adicionales, las cuales contienen un pequeño número de activos inmersos en un gran número de compuestos inactivos. Los compuestos activos elegidos para el conjunto de prueba se dispersaron en un gran número de señuelos (presuntos inactivos o *decoys*) proporcionados por el *enhanced Directory Useful Decoys* (DUD-E) (**Mysinger et al., 2012**). La biblioteca llamada base “DUDE-A”, se construyó generando 50 presuntos inactivos por cada uno de los 14 compuestos activos de aquel conjunto, resultando en una baja proporción de activos (menor al 2%; 14 activos inmersos en 700 *decoys*). Adicionalmente, se generó una segunda biblioteca, denominada “DUD-E B”, aunque esta vez el número de señuelos fue considerablemente mayor (3.500 *decoys*).

Tal como se mencionó anteriormente, el conjunto DUDE-A se utilizó para estimar el rendimiento de los modelos individuales en un verdadero experimento de cribado virtual y para decidir la mejor combinación de modelos, esto es la cantidad de modelos que se combinan y a través de qué operador (*ver siguiente sección*). La base DUDE-B se utilizó para validar el desempeño de los ensambles de modelos.

## 5.4. Combinación de modelos

El Aprendizaje por Ensamblado (en inglés, *Ensemble Learning*) implica todos aquellos procedimientos empleados para entrenar múltiples algoritmos de aprendizaje y combinar sus resultados adecuadamente (**Brown, 2010**). Se sabe que esta aproximación conduce a una mejora en las precisiones y predicciones individuales (**Carbonneau et al., 2016; Daho & Chikh, 2015; Li et al., 2014; Min, 2016**).



Para mejorar la performance de los clasificadores individuales, se aplicaron diferentes operadores para combinar modelos individuales: RANKING, PROMEDIO, MINIMO y VOTING (Zhang & Muegge, 2006).

La técnica del promedio del RANKING (*Rank Average*) calcula los promedios del Ranking de los compuestos  $j$ , ordenados de forma decreciente según cada valor de *score* obtenido en cada modelo individual. Mediante el operador PROMEDIO (*Average Score*) se compara todos los valores de *score* que se obtienen en los modelos individuales que se combinan y se calcula el promedio de estos. La técnica de fusión de los modelos por el operador MINIMO (*Minimum Score*) devuelve para cada compuesto, el valor mínimo de *score* de entre todos los calculados por los modelos individuales que integran el ensamble (Alberca, 2018). Cuando los modelos se combinan por el promedio de VOTING (*Voting Average*), el cálculo se realiza a través de la ecuación 5.9, para la cual  $rank_{ij}$  se define como la posición en el ranking que ocupa cada compuesto  $j$  cuando los compuestos se ordenan en orden descendiente y  $N_{BD}$  es el número total de compuestos en la base de datos. Luego se promedian los votos obtenidos para cada compuesto  $j$ .

$$voto_j = \text{máx} \left( 0, \text{int} \left( 11 - \frac{rank_{ij}}{0,02N_{BD}} \right) \right) \quad (\text{Ecuación 5.9})$$

Para obtener las distintas combinaciones de modelos se utilizó el lenguaje R y el entorno RStudio. Los scripts para utilizar cada técnica de *Ensemble Learning* se adjuntan en el Anexo 2 del Material Suplementario.

Los mejores modelos individuales fueron seleccionados y combinados utilizando como criterio de desempeño el AUC ROC en la base DUDE-A, analizando distintas combinaciones sistemáticas a partir de los dos mejores modelos hasta llegar a la combinación de 100 modelos. En este caso, se obtuvieron gráficas de valores de curvas AUC ROC versus número de modelos combinados empleando cada operador, con el paquete pROC (Robin et al., 2011). También se calcularon las métricas BEDROC y RIE 1% (Truchon et al., 2007). BEDROC (en inglés, *Boltzmann-enhanced discrimination of ROC*) es un parámetro que indica la probabilidad de que un compuesto se clasifique como





activo entre los primeros compuestos rankeados dentro de un conjunto ordenado, el cual presenta distribución exponencial con un nivel de significancia  $\alpha$ . En general, para la evaluación de metodologías de VS se recomienda un valor de  $\alpha = 20$ , lo que significa que el 8% en el inicio del ranking contribuye en un 80% al valor de BEDROC (**Ntie-Kang, 2020**). Esta métrica se deriva del parámetro RIE, tomando valores entre 0 y 1. El parámetro RIE (en inglés, *Robust initial enhancement*), descrito por Sheridan y colaboradores (**Sheridan et al., 2001**), utiliza un esquema de ponderación exponencial, otorgando mayor peso a los activos que son reconocidos entre los primeros *scores* dentro un ranking relativo de compuestos (**Zhao et al., 2009**). Para RIE 1%, aquella ponderación se realiza sobre el 1% de los compuestos que quedan rankeados en los primeros puestos.

Se realizaron los análisis anteriormente descritos para los cinco mejores modelos individuales y para la combinación de modelos con cada operador, utilizando el entorno R y la herramienta online ROCKER (**Lätti et al., 2016**). El desempeño de la mejor combinación de modelos fue evaluado en otra campaña retrospectiva, que incluía como base de datos a la base DUDE-B.

## 5.5. Selección de valor de corte

Tal como se mencionó en la sección 5.3.3, para poder conocer si la predicción del modelo o la combinación de modelos es positiva, es decir, el modelo predice un determinado compuesto como activo, es necesario establecer un valor de corte del *score*, que se utilizará en el screening. Una posibilidad es definir el valor de corte como aquel que conduce a una relación  $Sp - Se$  adecuada, a través de las gráficas de las curvas ROC. Una alternativa es recurrir al análisis de gráficos de superficie del Valor Predictivo Positivo (PPV, por sus siglas en inglés) (**Alberca et al., 2019**).

Una cuestión importante al implementar campañas de SV es predecir la probabilidad real con la que un *hit* pueda confirmar la actividad predicha cuando se



someta a pruebas experimentales (PPV). A menudo, se suelen confundir tanto el término de PPV como el Valor Predictivo Negativo (NPV, por sus siglas en inglés) con la  $Se$  y  $Sp$  (**Sadrzadeh et al., 2017**), aunque los primeros son más informativos desde el punto de vista práctico en tanto en su cálculo se considera, también, la proporción de activos en la base de datos. Por lo mismo, la estimación de tal probabilidad se dificulta debido a su dependencia de  $Ya$ , un dato que en campañas prospectivas de SV no es conocido de antemano (**Goicoechea et al., 2019**) (Ecuación 5.10):

$$PPV = \frac{Se Ya}{Se Ya + (1 - Sp)(1 - Ya)} \quad (\text{Ecuación 5.10})$$

La ecuación 5.10 se aplicó para construir gráficos de superficie PPV, con el fin de elegir un valor de corte óptimo para seleccionar los *hits* a partir de una campaña prospectiva de SV. Tales gráficas 3D ilustran la interacción entre el valor de PPV, la relación  $Se/Sp$  y  $Ya$ . Cuando el valor de PPV se aproxima a 1 (100%), mejor es la predicción de los modelos, ya que la probabilidad de confirmar un verdadero positivo es la mayor entre todos aquellos compuestos predichos como activos.

Para la construcción de los gráficos de superficie PPV se utilizó el paquete de gráficos en R (<https://cran.r-project.org/package=plotly>). Los valores de  $Se$  y  $Sp$  se calcularon en todo el rango de valores de *score* posibles y  $Ya$  fue variado entre 0,001 y 0,010 (0,1% y 1%, respectivamente), ya que se estima que en una campaña prospectiva esa es, aproximadamente  $Ya$ . El análisis visual de las superficies PPV resultantes nos permitió seleccionar un valor de umbral de *score* con un rango deseado de PPV.

## 5.6. Cribado Virtual

Tal como se ha postulado a lo largo de este trabajo, la técnica de SV fue empleada para cribar grandes bases de datos, empleando los modelos construidos. En particular, se aplicó la combinación de modelos elegidas sobre la base de datos DrugBank v.5.0.0. y SweetLead. DrugBank 5.0.0, es una base de datos en línea que contiene información



extensa sobre los fármacos candidato que se encuentran en fase clínica de evaluación, nutraceuticos y fármacos aprobados por la FDA (**Wishart *et al.*, 2018**). Por su parte, SweetLead es una base de datos que reúne fármacos aprobados por otras agencias reguladoras internacionales, derivados de productos naturales y productos químicos regulados (**Novick *et al.*, 2013**).

Las bibliotecas químicas obtenidas de ambas bases de datos se procesaron mediante Standardizer versión 16.9.12.0 (ChemAxon 2016), utilizando los mismos pasos especificados en la sección 5.2.1.

Se calcularon los descriptores moleculares para los compuestos de estas bibliotecas y, utilizando la mejor combinación de modelos, se calcularon los valores de *score* para cada uno de los compuestos contenidos en las bases de datos DrugBank y SweetLead.

## 5.7. Dominio de aplicación

El dominio de aplicación representa una región teórica del espacio químico, donde las predicciones de cada modelo QSAR-2D son confiables. Con la estimación de este dominio, definido por la naturaleza de los compuestos químicos que componen el *training set*, se determina la región del espacio químico donde los modelos realizan predicciones verídicas. De esta manera, una vez obtenidos los resultados del SV, se estima un límite a partir del cual la predicción deja de ser confiable (**Roy *et al.*, 2015**).

Existen varios métodos para estimar el dominio de aplicación; particularmente en este trabajo de tesis se utilizó la regla de la palanca (*Leverage Method*), un método basado en distancias (**Roy *et al.*, 2015a**). Se calculan los valores de la palanca  $h_i$  de cada compuesto que integra la base de datos a evaluar (ecuación 5.11).



$$h_i = \chi_i (\chi^T * \chi)^{-1} * \chi_i^T \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (\text{Ecuación 5.11})$$

Siendo  $\chi_i$  el vector de los descriptores del compuesto  $i$ , y  $\chi$  es la matriz que contiene los valores de los descriptores del modelo para el conjunto de entrenamiento (**Eslamimanesh et al., 2012**).

Un compuesto seleccionado a partir del SV de una base de datos estará dentro del dominio del modelo si está por debajo del valor umbral o crítico  $h^*$ , calculado a través de la ecuación 5.12, donde  $f$  es el número de descriptores incluidos en el modelo y  $n$  es el número de compuestos en el conjunto de entrenamiento.

$$h^* = \frac{3f}{n} \quad (\text{Ecuación 5.12})$$

Aquellos compuestos que presenten valores de palanca  $h_i$  mayores a  $h^*$ , quedarán por fuera del dominio ya que se estima que la predicción que ha hecho el modelo respecto de su clasificación no es confiable (**Eslamimanesh et al., 2012**).

Este método cumple con ciertas ventajas, entre las cuales se destaca que es simple y computacionalmente fácil de llevar a cabo, ya que además no requiere ningún software estadístico especial (**Roy et al., 2015a**).

Descartando aquellos compuestos que quedan por fuera de este dominio, se evaluaron adicionalmente ciertas características relevantes para la posterior adquisición de algunos pocos compuestos que serán probados experimentalmente. Entre tales características se pueden mencionar si el fármaco se encuentra aprobado para su comercialización o si está en fase experimental; sus propiedades farmacocinéticas; su disponibilidad comercial y relacionado con ello, los costos de adquisición.



## 5.8. Validación experimental

De acuerdo con el flujo de trabajo esquematizado en la figura 5.1, la validación experimental constituye la última etapa una vez desarrollados y aplicados los modelos QSAR. Durante esta etapa se evalúan los candidatos seleccionados como promisorios por el modelo *in silico* en los ensayos experimentales correspondientes (**Cherkasov et al., 2014**).

La validación experimental se realizó mediante la evaluación de los compuestos seleccionados en el modelo de crisis de 6 Hz. Adicionalmente los candidatos adquiridos fueron evaluados en los modelos de MES y PTZ disponibles en el laboratorio. Todos los ensayos fueron realizados bajo la aprobación de los protocolos por parte del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP), a través del cual se garantiza que los ensayos se desarrollen de acuerdo con los estándares internacionales de bienestar animal. Dichos protocolos se adjuntan a este trabajo de tesis (Protocolos N° 004-23-17 y 014-06-15).

### 5.8.1. Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa NIH: Swiss, con pesos entre 20 y 25 gramos, los mismos fueron provistos por el Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP (FCV-UNLP), con certificación SPF (libre de patógenos específicos), y alojados en el Bioterio perteneciente al Laboratorio.

Los animales fueron alojados y mantenidos bajo condiciones estandarizadas de temperatura, humedad y luz controladas, dentro de cajas de policarbonato de 300 mm x 200 mm x 190 mm, con tapa rejilla de acero inoxidable. En cada caja se dispuso de grupos de un número máximo de 5 animales por cada grupo, con agua y alimento balanceado *ad libitum*. Para disminuir el stress de los animales, se enriquecieron



ambientalmente las cajas de mantenimiento según las normas éticas de bienestar animal (**Maschi *et al.*, 2019**). Además, los ratones fueron administrados i.p. con un volumen de 0,1 ml de solución fisiológica (SF) durante una semana y fueron luego restringidos manualmente con acercamiento de los electrodos de ojos, de manera que se acostumbren a la manipulación y se minimice, en el momento de evaluar los tratamientos, la influencia de la manipulación en los resultados observados. Todos los procedimientos realizados durante el alojamiento fueron practicados bajo estándares de cuidado y bienestar animal, siguiendo las normas éticas dispuestas por la NIH y aprobadas por el CICUAL-FCE-UNLP.

### 5.8.2. Drogas

Todas las soluciones de los compuestos fueron preparadas en el momento previo al ensayo y fueron administradas por vía i.p. en un volumen máximo de 10 ml/kg.

5-fluorouridina (PM 262,19 g/mol), triflupromazina clorhidrato (PM 388,8 g/mol) y pirenzepina clorhidrato (PM 424,32 g/mol) fueron adquiridos comercialmente en Sigma-Aldrich Argentina S.A. Levetiracetam (LEV) fue proporcionado por GlaxoSmithKline (Keppra Levetiracetam solución inyectable) en viales de 5 ml conteniendo 100 mg/ml.

Se prepararon dos soluciones para cada droga, teniendo en cuenta las siguientes relaciones: 30 mg de droga por cada kg de ratón (solución de 30 mg/kg) y 100 mg de droga por cada kg de ratón (solución de 100 mg/kg). Para ello, se pesaron aproximadamente 10 mg y 18 mg, en viales individuales, correspondientes a cada droga (5-FU, TFP y PZP), de acuerdo con lo calculado para obtener las soluciones de 30 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente. Para disolver todas las drogas se utilizó SF a razón de 10 ml por cada kg de ratón (10 ml/kg). La solución de LEV utilizada fue de una concentración de 30 mg/kg (aproximadamente dos veces la dosis efectiva 50 - 14,9 mg/kg). Se tomaron



0,18 ml correspondientes a 18 mg de droga y se depositaron en un vial, llevando a un volumen final de 10 ml con SF.

PHT (Sigma-Aldrich Argentina S.A) se disolvió en solución salina y se ajustó a un pH = 11.2 con solución de NaOH. PB (Serva, Heidelberg, Germany) y PTZ se disolvieron en SF.

### 5.8.3. Modelo de neurotoxicidad – Rotorod

Tal como se explicó en el capítulo 3, mediante el ensayo de Rotorod se evalúa si el compuesto en cuestión presenta efectos neurotóxicos, lo que se refleja en sedación, dificultad para caminar, somnolencia, entre otros signos.

Se inyectaron los animales con las soluciones a evaluar (30 mg/kg y 100 mg/kg) y se colocaron sobre el cilindro del equipo, que gira a una velocidad de 6 rpm, inmediatamente en el instante previo al ensayo de 6 Hz. Los animales son observados durante el lapso de 1 minuto y se anotan, de existir, las caídas desde el rodillo. Se considera que el compuesto presenta efectos de neurotoxicidad cuando el animal reporta un mínimo de tres caídas en ese tiempo.

### 5.8.4. Modelo de MES

Los animales se evaluaron administrando i.p. las drogas a dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg, con tiempos de pretratamiento de 0,5 hs y 4 hs. Como control negativo, se administró PHT a una dosis de 15 mg/kg y se evaluó a las 2 hs post inyección, tiempo que corresponde al tiempo de efecto máximo. Además, se administró SF en un volumen de 10 ml/kg a un grupo de animales para utilizar como control positivo.

El ensayo MES fue descrito en detalle en el capítulo 3. Durante este ensayo, a cada animal se aplicó un estímulo eléctrico (duración de pulso: 0,2 ms; frecuencia de pulso: 60 Hz; ancho de pulso: 0,6 ms) con intensidad de corriente de 50 mA, mediante



electrodos auriculares utilizando un generador de pulsos Ugo Basile ECT- 57800 (Ugo Basile SRL, Italia).

El criterio de protección que se utilizó fue la ausencia de la fase de extensión tónica. Los resultados se reportaron como número de animales protegidos vs número de animales evaluados, a cada dosis y a cada tiempo.

### 5.8.5. Modelo de PTZ

Los animales se evaluaron administrando i.p las drogas a dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg, con tiempos de pretratamiento de 0,5 hs y 4 hs. Como control negativo, se administró PB a una dosis de 25 mg/kg y se evaluó a las 0,5 hs post inyección, tiempo que corresponde al tiempo de efecto máximo. Además, se administró SF en un volumen de 10 ml/kg a un grupo de animales para utilizar como control positivo.

Durante este ensayo (descrito detalladamente en el capítulo 3), a cada animal se administró por vía subcutánea una solución de PTZ a 80 mg/kg (a razón de 5 ml/kg), preparada previa al momento de la evaluación. Los animales fueron observados durante los 30 minutos posteriores a la inyección de PTZ.

Se utilizó como criterio de protección la ausencia de crisis clónica, parcial o generalizada. Los resultados se reportaron como número de animales protegidos vs número de animales evaluados, a cada dosis y a cada tiempo.

### 5.8.6. Modelo de crisis de 6 Hz

Como se mencionó en el capítulo 3, este modelo es capaz de identificar aquellos compuestos que presenten protección frente a las crisis psicomotoras inducidas por estímulos de baja frecuencia (6 Hz) y larga duración (3 segundos). Asimismo, se ha demostrado para ciertos fármacos bloqueantes de los canales de sodio que el ensayo de 6 Hz puede presentar farmacoresistencia parcial a completa (**Barton et al., 2001**). Esto





hace de este, un ensayo que prima durante las etapas tempranas de identificación del programa ETSP.

Para llevar a cabo este ensayo, se utilizaron grupos de 6 animales por dosis y por tiempo. Los animales fueron inyectados por vía i.p. con soluciones de 30 mg/kg y 100 mg/kg de cada droga, y evaluados a 30 minutos y 4 horas luego de la administración. 15 minutos previo a la inducción, se les aplicó una gota de una solución de tetracaína al 0,5%, con el fin de anestesiarse la zona y asegurar el contacto durante la estimulación (**Parchen et al., 2011**). Los electrodos corneales fueron embebidos en gel neutro para garantizar la correcta propagación del estímulo durante el shock eléctrico.

Para la estimulación, se utilizó el generador de pulsos Ugo Basile ECT- 57800 (Ugo Basile SRL, Italia), el cual fue configurado para generar el estímulo adecuado. En este ensayo, el estímulo es de baja frecuencia (6 Hz), de larga duración de shock (3 segundos), con un ancho de pulso definido en 0,2 msegundos y una intensidad de corriente de 44 mA. Los animales fueron manualmente restringidos con utilización de guantes dieléctricos y estimulados eléctricamente. Inmediatamente después fueron colocados en una caja de plexiglás, para su observación. Se registró la ausencia o presencia de crisis a través de la observación de una fase clónica mínima, seguida de movimientos automáticos y estereotipados, movimiento de los bigotes y la muy típica, cola erecta (también conocida como *Straub tail*). Sólo se consideran animales protegidos, aquellos que no experimentan los mencionados signos.

Además, de acuerdo con algunos reportes en distintas bibliografías, se sabe que el estado de crisis donde el animal, que no recibe tratamiento (control negativo) manifiesta los diferentes signos, dura aproximadamente entre 60 – 120 segundos, momento en el cual retoma su comportamiento exploratorio normal (**Barton et al., 2001; Esneault et al., 2017; Florek-Luszczki et al., 2015**). Si un animal inyectado con el compuesto a evaluar vuelve a desarrollar su comportamiento normal dentro de los 10 segundos posteriores a la estimulación, se considera que está protegido frente a las



crisis. Por tal motivo, no sólo se observó qué características presentan las distintas crisis, sino también se registraron los tiempos que duraban las mismas.

### 5.8.7. Tratamiento estadístico de resultados

En general, cuando se analizan variables continuas, los tests estadísticos más utilizados son los tests paramétricos, en los cuales se asume que dicha variable presenta una distribución normal de los datos. Esta condición, sin embargo, no siempre se verifica. En estos últimos casos, se recurre a los tests no paramétricos, que trabajan con rangos de observaciones que no son sensibles a los datos extremos **(Nahm, 2016)**.

Por ello, los tiempos de cada grupo (solución de 30 mg/kg, solución de 100 mg/kg, solución de LEV como control negativo y solución salina como control positivo) fueron analizados estadísticamente y comparados mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

El test estadístico de Kruskal-Wallis es la técnica no paramétrica para el análisis de varianza, mediante la cual se analiza si hay diferencias entre los valores medianos de tres o más muestras independientes **(Nahm, 2016)**.

## 5.9. Referencias

Alberca, L. N. (2018). *Búsqueda asistida por computadora de nuevos fármacos antichagásicos análogos de poliaminas*. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/72607>

Alberca, L. N., Chuguransky, S. R., Álvarez, C. L., Talevi, A., & Salas-Sarduy, E. (2019). In silico Guided Drug Repurposing: Discovery of New Competitive and Non-competitive Inhibitors of Falcipain-2. *Frontiers in Chemistry | Www.Frontiersin.Org*, 1, 534. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00534>

Ballabio, D., Grisoni, F., & Todeschini, R. (2018). Multivariate comparison of classification performance measures. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 174, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.12.004>



- Barton, M. E., Klein, B. D., Wolf, H. H., & White, H. S. (2001). Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Research*, 47(3), 217–227. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(01\)00302-3](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(01)00302-3)
- Bellera, C. L. (2014). *Búsqueda racional de nuevos fármacos antichagásicos inhibidores de la cruzipaina* (Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/43315>
- Bellera, C. L., & Talevi, A. (2019). Quantitative structure-activity relationship models for compounds with anticonvulsant activity. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 14(7), 653–665. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1613368>
- Bertrand, H., & Triballeau, N. (2005). Virtual Screening Workflow Development Guided by the ROC Curve Approach . Application to High-Throughput Docking on Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 4 Accepting the Uncertainty ? *Receptor*, 2534–2547.
- Böcker, A. (2008). Toward an improved clustering of large data sets using maximum common substructures and topological fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48(11), 2097–2107. <https://doi.org/10.1021/ci8000887>
- Brian So Everitt et al. (2011). *Optimization Clustering Techniques*. <https://doi.org/10.1002/9780470977811.ch5>
- Brown, G. (2010). *Ensemble Learning*. Springer Press.
- Carbonneau, M. A., Granger, E., Raymond, A. J., & Gagnon, G. (2016). Robust multiple-instance learning ensembles using random subspace instance selection. *Pattern Recognition*, 58, 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2016.03.035>
- Cherkasov, A., Muratov, E. N., Fourches, D., Varnek, A., Baskin, I. I., Cronin, M., ... Tropsha, A. (2014). QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To? *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(12), 4977–5010. <https://doi.org/10.1021/jm4004285>
- Daho, M. E. H., & Chikh, M. A. (2015). Combining Bootstrapping Samples, Random Subspaces and Random Forests to Build Classifiers. *Journal of Medical Imaging and Health Informatics*, 5(3), 539to – 544. <https://doi.org/10.1166/jmihi.2015.1423>
- Daoud, J. I. (2017). Multicollinearity and Regression Analysis. *J. Phys*, 12009. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/949/1/012009>
- DeLong, E. R., DeLong, D. M., & Clarke-Pearson, D. L. (1988). Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach. *Biometrics*, 44(3), 837. <https://doi.org/10.2307/2531595>
- Eslamimanesh, A., Gharagheizi, F., Mohammadi, A. H., & Richon, D. (2012). A statistical method for evaluation of the experimental phase equilibrium data of simple clathrate hydrates. *Chemical Engineering Science*, 80, 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.06.019>
- Esneault, E., Peyon, G., & Castagné, V. (2017). Efficacy of anticonvulsant substances in the 6 Hz



seizure test: Comparison of two rodent species. *Epilepsy Research*, 134(March), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.05.002>

Florek-Luszczki, M., Wlaz, A., Zagaja, M., Andres-Mach, M., Kondrat-Wrobel, M. W., & Luszczki, J. J. (2015). Effects of WIN 55,212-2 (a synthetic cannabinoid CB1 and CB2 receptor agonist) on the anticonvulsant activity of various novel antiepileptic drugs against 6 Hz-induced psychomotor seizures in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 130, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.01.003>

Fourches, D., Muratov, E., & Tropsha, A. (2010). Trust, but verify: On the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50(7), 1189–1204. <https://doi.org/10.1021/ci100176x>

Goicoechea, S., Sbaraglini, M. L., Chuguransky, S. R., Morales, J. F., Ruiz, M. E., Talevi, A., & Bellera, C. L. (2019). *Application of Machine Learning Approaches to Identify New Anticonvulsant Compounds Active in the 6 Hz Seizure Model*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-36636-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-36636-0_1)

Gonzalez, M., Teran, C., Saiz-Urra, L., & Teijeira, M. (2008). Variable Selection Methods in QSAR: An Overview. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(18), 1606–1627. <https://doi.org/10.2174/156802608786786552>

Gramatica, P. (2013). *On the Development and Validation of QSAR Models*. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-059-5\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-059-5_21)

Grisoni, F., Ballabio, D., Todeschini, R., & Consonni, V. (2018). *Molecular Descriptors for Structure–Activity Applications: A Hands-On Approach*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7899-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7899-1_1)

Hawkins, D. M. (2004, January). The Problem of Overfitting. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, Vol. 44, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1021/ci0342472>

Kausar, S., & Falcao, A. O. (2018). An automated framework for QSAR model building. *Journal of Cheminformatics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13321-017-0256-5>

Lätti, S., Niinivehmas, S., & Pentikäinen, O. T. (2016). Rocker: Open source, easy-to-use tool for AUC and enrichment calculations and ROC visualization. *Journal of Cheminformatics*, 8(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0158-y>

Leonard, J. T., & Roy, K. (2006). On Selection of Training and Test Sets for the Development of Predictive QSAR models. *QSAR & Combinatorial Science*, 25(3), 235–251. <https://doi.org/10.1002/qsar.200510161>

Li, L., Hu, Q., Wu, X., & Yu, D. (2014). Exploration of classification confidence in ensemble learning. *Pattern Recognition*, 47(9), 3120–3131. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2014.03.021>

Mansouri, K., Grulke, C. M., Richard, A. M., Judson, R. S., & Williams, A. J. (2016). An automated curation procedure for addressing chemical errors and inconsistencies in public datasets used in QSAR modelling. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 27(11), 911–937.



<https://doi.org/10.1080/1062936X.2016.1253611>

Martin, T. M., Harten, P., Young, D. M., Muratov, E. N., Golbraikh, A., Zhu, H., & Tropsha, A. (2012). Does Rational Selection of Training and Test Sets Improve the Outcome of QSAR Modeling? *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(10), 2570–2578. <https://doi.org/10.1021/ci300338w>

Maschi, F., Carbone, C., & Ferrari, H. R. (2019). De reactivo biológico al animal sintiente: el bienestar animal como cambio de paradigma en la investigación biomédica y su impacto en los resultados. *Analecta Veterinaria*, 39(1), 034. <https://doi.org/10.24215/15142590e034>

Min, S. H. (2016). A genetic algorithm-based heterogeneous random subspace ensemble model for bankruptcy prediction. *International Journal of Applied Engineering Research*, 11(4), 2927–2931.

Mysinger, M. M., Carchia, M., Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2012). Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): Better ligands and decoys for better benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(14), 6582–6594. <https://doi.org/10.1021/jm300687e>

Nahm, F. S. (2016). Nonparametric statistical tests for the continuous data: the basic concept and the practical use. *Korean Journal of Anesthesiology*, 69(1), 8. <https://doi.org/10.4097/kjae.2016.69.1.8>

Novick, P. A., Ortiz, O. F., Poelman, J., Abdulhay, A. Y., & Pande, V. S. (2013). SWEETLEAD: an In Silico Database of Approved Drugs, Regulated Chemicals, and Herbal Isolates for Computer-Aided Drug Discovery. *PLoS ONE*, 8(11), e79568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079568>

Ntie-Kang, F. (2020). Fundamental Concepts. In F. Ntie-Kang (Ed.), *Fundamental Concepts*. <https://doi.org/10.1515/9783110579352>

Parchen, H. D., Izar, M. L., Branco, P. S., Lacowicz, C., Sano, D. H., Belo, C. E. P., & Vilani, R. G. D. O. C. (2011). Ophthalmic and anesthetic evaluation of topical 1% tetracaine and 0.5% proparacaine in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 63(6), 1337–1344. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600009>

Perez-Llamas, C., & Lopez-Bigas, N. (2011). Gitoools: Analysis and Visualisation of Genomic Data Using Interactive Heat-Maps. *PLoS ONE*, 6(5), e19541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019541>

Rai, P., Singh, S., & Prof, A. (2010). A Survey of Clustering Techniques. In *International Journal of Computer Applications* (Vol. 7).

Rawlings, J. O., Pantula, S. G., & Dickey, D. A. (1998). *Applied Regression Analysis*. <https://doi.org/10.1007/b98890>

Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J. C., & Müller, M. (2011). pROC: An open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-77>



Roy, K., Kar, S., & Ambure, P. (2015). On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 145, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.04.013>

Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). *Statistical Methods in QSAR/QSPR*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-17281-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-17281-1_2)

Roy, K., & Mitra, I. (2011). On various metrics used for validation of predictive QSAR models with applications in virtual screening and focused library design. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 14(6), 450–474. <https://doi.org/10.2174/138620711795767893>

Sadrzadeh, H., Baskin, L., & Kline, G. (2017). Variables affecting endocrine tests results, errors prevention and mitigation. In *Endocrine Biomarkers: Clinicians and Clinical Chemists in Partnership* (pp. 1–40). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803412-5.00001-X>

Sheridan, R. P., Singh, S. B., Fluder, E. M., & Kearsley, S. K. (2001). Protocols for Bridging the Peptide to Nonpeptide Gap in Topological Similarity Searches. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 41(5), 1395–1406. <https://doi.org/10.1021/ci0100144>

Subramanian, J., & Simon, R. (2013). Overfitting in prediction models – Is it a problem only in high dimensions? *Contemporary Clinical Trials*, 36, 636–641. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2013.06.011>

Thompson, C. G., Kim, R. S., Aloe, A. M., & Becker, B. J. (2017). Extracting the Variance Inflation Factor and Other Multicollinearity Diagnostics from Typical Regression Results. *Basic and Applied Social Psychology*, 39(2), 81–90. <https://doi.org/10.1080/01973533.2016.1277529>

Toropova, A. P., & Toropov, A. A. (2017). CORAL: Binary classifications (active/inactive) for drug-induced liver injury. *Toxicology Letters*, 268, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.01.011>

Truchon, J.-F., & Bayly, C. I. (2007). Evaluating Virtual Screening Methods: Good and Bad Metrics for the ‘Early Recognition’ Problem. *J. Chem. Inf. Model*, 47(2), 488–508. <https://doi.org/10.1021/ci600426e>

Vargyas, Miklos; Papp, Judit; Csizmadia, Ferenc; Csepregi, Szabolcs; Papp, Akos and Vadasz, P. (2008). Maximum Common Substructure Based Hierarchical Clustering. *ChemAxon Ltd*.

Veerasamy, R., & Rajak, H. (2011). *Validation of QSAR Models-Strategies and Importance Antiinflammatory effect of Calotropis procera root bark extract View project An Investigation on Male Contraception Activity of Extracts of Hibiscus Species-Mechanistic Studies (RM112200) View project*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/284566093>

Verma, M., Srivastava, M., Chack, N., Kumar Diswar, A., & Gupta, N. (2012). A Comparative Study of Various Clustering Algorithms in Data Mining. In *International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA)* (Vol. 2). Retrieved from [www.ijera.com](http://www.ijera.com)

Vyškovský, R., Schwarz, D., Janoušová, E., & Kašpárek, T. (2016). Random Subspace Ensemble



Artificial Neural Networks for First-episode Schizophrenia Classification. *Proceedings of the 2016 Federated Conference on Computer Science and Information Systems*, 8, 317–321. <https://doi.org/10.15439/2016F333>

Wei, Q., & Dunbrack, R. L. (2013). The Role of Balanced Training and Testing Data Sets for Binary Classifiers in Bioinformatics. *PLoS ONE*, 8(7), e67863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067863>

Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., ... Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>

Wong, T. T. (2015). Performance evaluation of classification algorithms by k-fold and leave-one-out cross validation. *Pattern Recognition*, 48(9), 2839–2846. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2015.03.009>

Yee, L. C., & Wei, Y. C. (2012). Current Modeling Methods Used in QSAR/QSPR. In *Statistical Modelling of Molecular Descriptors in QSAR/QSPR* (Vol. 2, pp. 1–31). <https://doi.org/10.1002/9783527645121.ch1>

Zhang, Q., & Muegge, I. (2006). Scaffold Hopping through Virtual Screening Using 2D and 3D Similarity Descriptors: Ranking, Voting, and Consensus Scoring. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(5), 1536–1548. <https://doi.org/10.1021/jm050468i>

Zhao, W., Hevener, K. E., White, S. W., Lee, R. E., & Boyett, J. M. (2009). A statistical framework to evaluate virtual screening. *BMC Bioinformatics*, 10(1), 225. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-225>





# CAPÍTULO 6

## ESTRATEGIA COMPUTACIONAL Y VALIDACIÓN EXPERIMENTAL: RESULTADOS





## Capítulo 6: Estrategia Computacional y Validación Experimental: Resultados

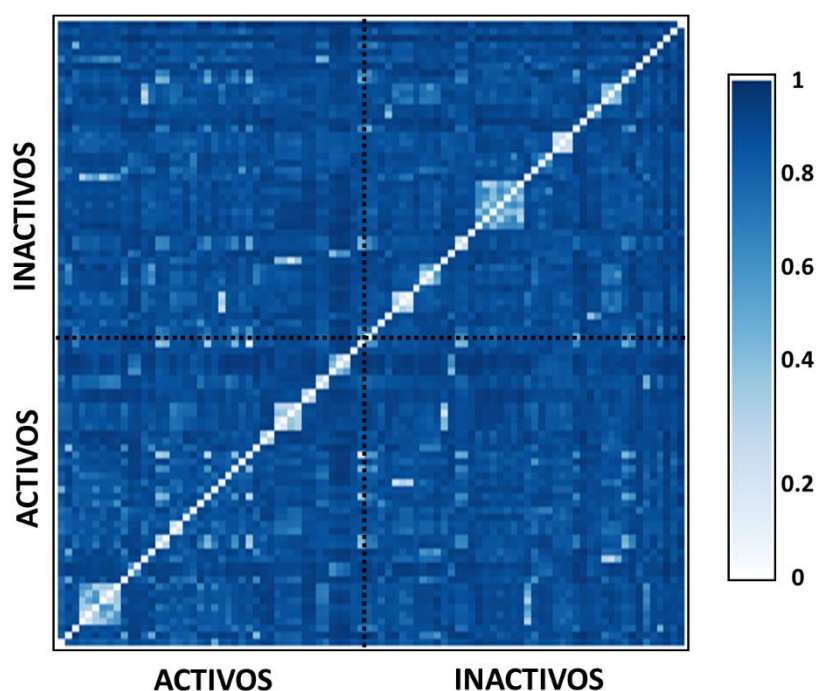
### 6.1. Compilado de la base de datos

A partir de la búsqueda bibliográfica, se compiló una base de datos de 90 compuestos evaluados frente al modelo animal de crisis 6 Hz (*Ver Anexo 1*) (**Byrtus et al., 2011; Dawidowski et al., 2011, 2013; Gasiór et al., 2012; Kumar et al., 2012, 2013; Mishra & Baker, 2012; Obniska et al., 2012; Rivara & Zuliani, 2012; Tosh et al., 2012; Wang et al., 2012; Ahsan et al., 2013; Nieoczym et al., 2013; Buenafe et al., 2013; Orellana-Paucar et al., 2013; Shaikh et al., 2013; Shandra et al., 2013; Tripathi & Kumar, 2013; Ulloora et al., 2013; Florek-Luszczki et al., 2014; Kamiński et al., 2014, 2015; Shekh-Ahmad et al., 2014; Zolkowska et al., 2014; Dawidowski & Turło, 2014; Dawidowski et al., 2014; Deng et al., 2014; Hebeisen et al., 2015; Wlaz et al., 2015; Coleman et al., 2015; Tomaciello et al., 2016; Ugale & Bari, 2016; Gunia-Krzyżak et al., 2017; Sałat et al., 2017**). Cuarenta y cuatro compuestos fueron considerados “ACTIVOS” reportando una actividad igual o mayor a 75% a diferentes tiempos post-administración, a dosis iguales o menores a 30 mg/kg. Cuarenta y seis compuestos no presentaron protección alguna a dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg contra las crisis y fueron catalogados como “INACTIVOS”. Los compuestos que a dosis menores o iguales a 30 mg/kg protegieron a 25% o menos de los animales evaluados, fueron excluidos.

Una vez estandarizadas las estructuras, utilizando el programa Standardizer Instant JCHEM v. 16.9.12.0, realizamos los mapas de calor o *heatmaps* con Gitoools v. 2.3.1 (**Perez-Llamas & Lopez-Bigas, 2011**), los cuales se muestran en la figura 6.1. Cada fila del mapa representa un compuesto, y lo mismo cada columna. En este caso, podemos observar que aquellos compuestos más disímiles se colorean de azul en su intersección, y las intersecciones de color blanco representa máxima similitud entre los compuestos (la diagonal corresponde a la comparación del mismo compuesto consigo mismo, de ahí que aparezca en blanco). Puede observarse en el mapa de calor la



presencia de compuestos de gran disimilitud, lo cual contribuye a la diversidad estructural inter- e intra-categorías, y nos permite prefigurar un dominio de aplicación relativamente amplio. En contraparte, puede notarse la presencia de pares de compuestos activos e inactivos que son muy similares entre sí (regiones blancas, correspondientes a una disimilitud cercana a 0), lo que representa un desafío mayor para los modelos de clasificación.



**Figura 6.1** Mapa de calor de la base de datos utilizada. En la escala de colores, un valor de 1 (color azul) refleja máxima disimilitud, mientras que la máxima similitud entre dos compuestos comparados se refleja en un valor de 0 (color blanco).

## 6.2. Partición de la base de datos

Para particionar representativamente los compuestos, se aplicó una técnica de *clustering* jerárquico basado en la máxima subestructura común en combinación con el método de optimización *k-means*. La operación se realizó de manera independiente para el conjunto de ACTIVOS y de INACTIVOS.



El procedimiento de *clustering* jerárquico reveló 3 grupos de por lo menos 4 compuestos para cada categoría. De acuerdo con el *clustering* MCS, existen 5 compuestos en la categoría activa que pueden ser considerados atípicos, ya que presentan una mínima subestructura común de nueve átomos con sólo un compuesto de su misma categoría. A partir de los resultados obtenidos del *clustering* jerárquico se seleccionó al azar un compuesto de cada *cluster* de cada categoría, a fin de utilizarlo como “semilla” en la técnica de *clustering k-means*.

Una vez optimizado el *clustering* jerárquico por medio del algoritmo *k-means*, se sustrajo el 32% de cada grupo de la categoría ACTIVOS y el 35% de la categoría INACTIVOS reservándolos para el conjunto de prueba, mientras que el 68% y 65% remanente se utilizó para entrenar el modelo.

De esta manera, el conjunto de entrenamiento quedó conformado por 60 compuestos (30 activos y 30 inactivos) y el conjunto de prueba por 30 compuestos (14 activos y 16 inactivos). En la figura 6.2 se observan los mapas de calor para los conjuntos de entrenamiento y de prueba, observando que el muestreo basado en estrategias de *clustering* condujo a conjuntos de entrenamiento y prueba representativos, que reflejan la diversidad estructural observada para el data set completo.

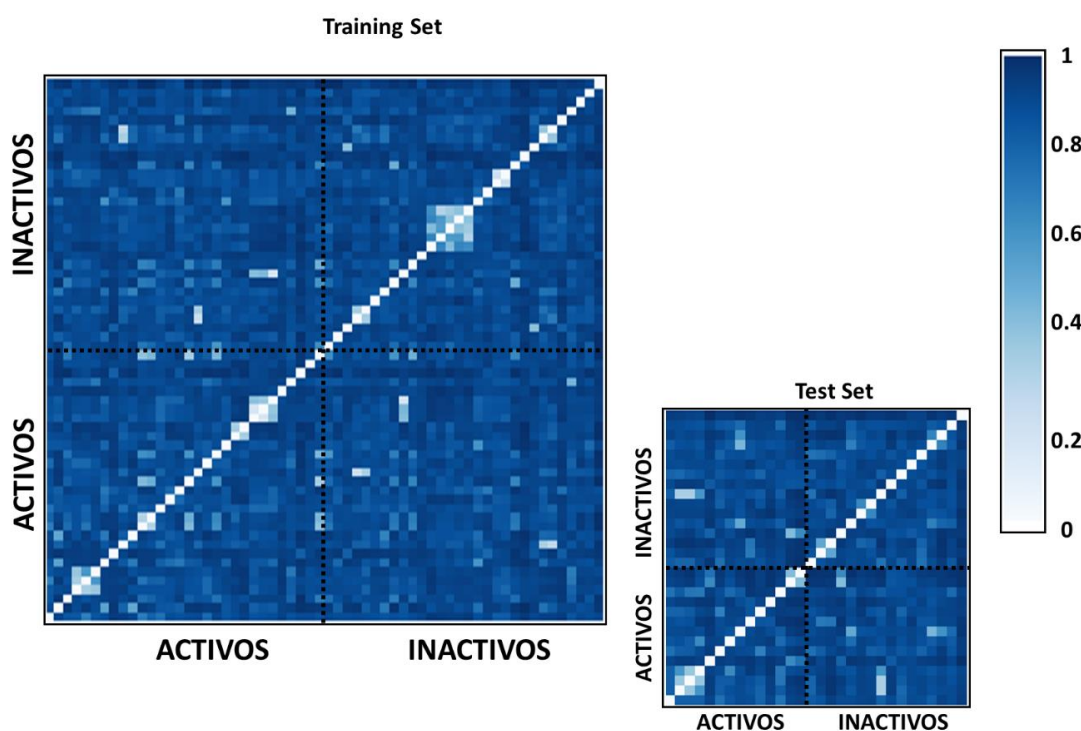


Figura 6.2 Mapas de calor de los conjuntos de entrenamiento y de prueba.

Con el objetivo de realizar una campaña de cribado retrospectivo, se generaron dos conjuntos adicionales. Los compuestos del conjunto de prueba se dispersaron en un gran número de señuelos (presuntos compuestos inactivos) proporcionados por *enhanced Directory Useful Decoys* (DUD-E) (tabla 6.1). Como resultado, a partir de los 14 compuestos activos del conjunto de prueba se generaron 700 presuntos inactivos (señuelos) para constituir la base de datos DUDE-A, en la cual la baja proporción de activos (1,96%) es más representativa de lo que sucede en una campaña de SV real. En el caso de la base DUDE-B, debido al escaso número de compuestos activos disponibles, se eligieron al azar 5 de los señuelos generados para la base DUDE-A por cada uno de los 14 activos (en total, 70 señuelos) y se generó con cada uno de ellos una segunda generación de señuelos. La base DUDE-A se utilizó para elegir la mejor combinación de modelos, la cual fue validada en el conjunto DUDE-B. En ambos conjuntos DUDE se incorporaron también los 16 compuestos inactivos del conjunto de prueba. En la figura



## Capítulo 6

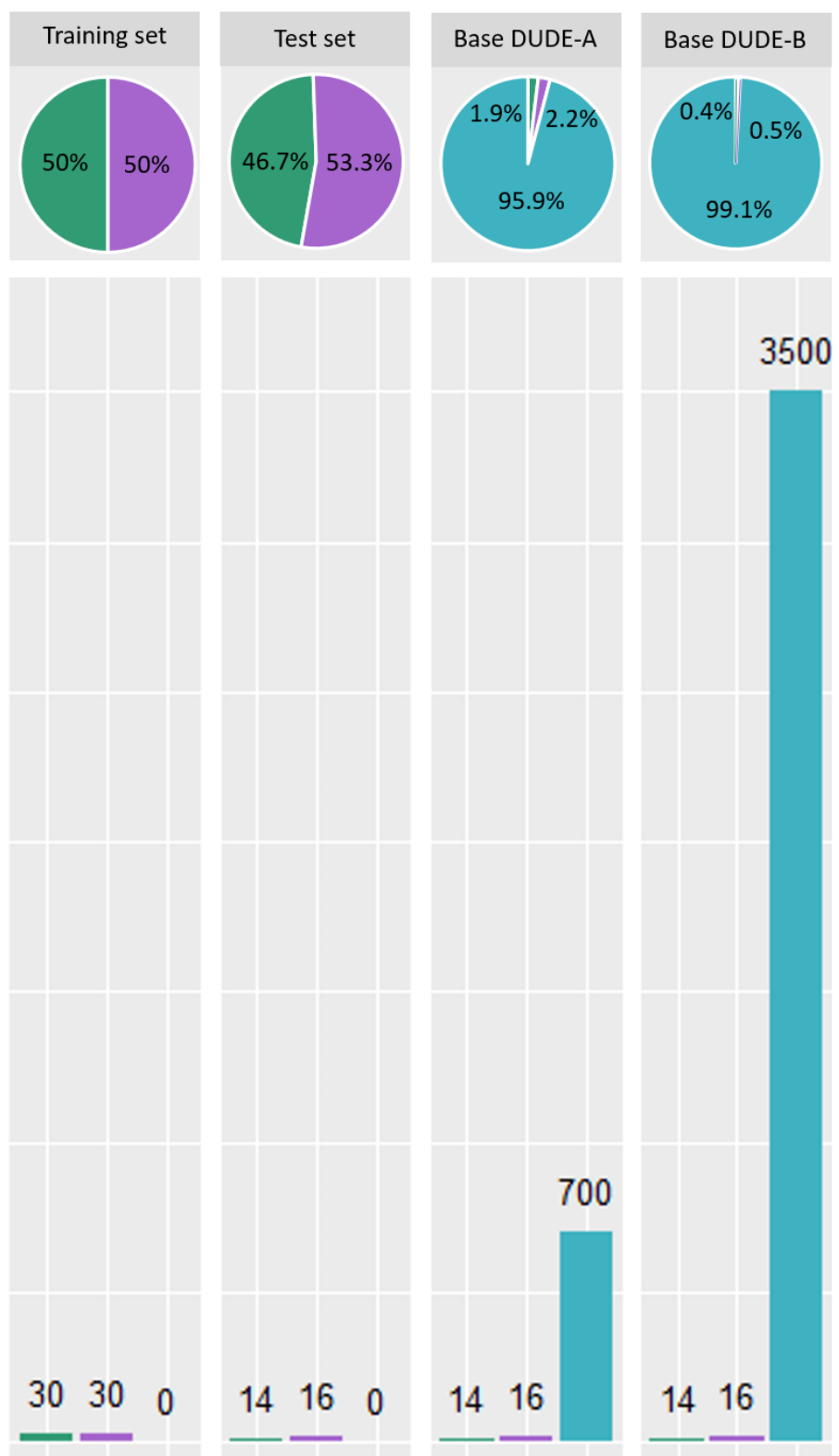
### Estrategia Computacional y Validación Experimental: Resultados

---

6.3 se observa una representación gráfica de la composición de los distintos conjuntos de datos que utilizamos en el modelado *in silico*.

**Tabla 6.1** Distribución de compuestos activos, inactivos y presuntos inactivos en los distintos conjuntos: Training Set, Test Set, DUDE-A y DUDE-B.

	Training Set	Test Set	DUDE-A	DUDE-B
<b>ACTIVOS</b>	30	14	14	14
<b>INACTIVOS</b>	30	16	16	16
<b>DECOYS</b>	-	-	700	3500
<b>TOTAL</b>	60	30	730	3530



**Figura 6.3** Composición de los diferentes conjuntos de datos: Training Set, Test Set, DUDE-A y DUDE-B. ■ Activos ■ Inactivos ■ Decoys.



## 6.3. Obtención de los modelos

### 6.3.1. Cálculo de descriptores moleculares

Se calcularon 3.668 descriptores independientes de la conformación (0D-2D) para cada una de las estructuras que conforman los distintos conjuntos de datos con el programa Dragon 6.0. Posteriormente, se excluyeron los descriptores constantes y casi constantes (aquellos que presenten baja variabilidad, con desviaciones estándares  $< 0,05$ ) con el fin de descartar a priori aquellos descriptores con bajo contenido de información. También se han excluido aquellos descriptores que presentaban uno o más valores perdidos (es decir, que no se les podía calcular su valor para algunas estructuras). Como resultado, la cantidad final de descriptores en el pool fue de 1.952 descriptores.

Los descriptores calculados pertenecen a diversas categorías, tales como descriptores constitucionales, propiedades moleculares, autocorrelaciones 2D, pares de átomos 2D, índices de conectividad, índices de adyacencia de bordes, descriptores geométricos, índice de estado E tipo átomo, entre muchos otros.

### 6.3.2. Subespacios aleatorios

Con el fin de obtener modelos independientes, se generaron aleatoriamente 1.000 conjuntos o subespacios con no más de 200 descriptores cada uno. Los descriptores se muestrearon al azar y cada modelo se entrenó en un subespacio del espacio de descriptores. Esta estrategia conduce a que los modelos individuales no se concentren de manera reiterada en las características que muestran una alta capacidad explicativa en el conjunto de entrenamiento, dando como resultado una mejor capacidad predictiva (Daho & Chikh, 2015; Vyškovský *et al.*, 2016).





### 6.3.3. Generación de los modelos

A los fines del modelado, se asignó arbitrariamente como etiqueta de clases el valor “1” a los compuestos activos y el valor “0” a los compuestos inactivos. Con ello, los modelos clasificatorios obtenidos reflejan la relación entre una variable binaria, la variable “clase”, dependiente de las variables independientes, los descriptores moleculares.

Se generaron 1.000 modelos clasificadores utilizando la técnica de semicorrelación *Stepwise Forward* (un modelo por cada subespacio de descriptores generado) (Toropova & Toropov, 2017). Se utilizó el entorno R para generar los modelos, y para el análisis y validaciones correspondientes.

Se seleccionó un valor de tolerancia  $\beta = 0,5$  para excluir de los modelos aquellos descriptores altamente correlacionados. Se utilizó una relación mínima de 6 entre el número de compuestos del conjunto de entrenamiento y el número de descriptores incluidos en el modelo, con el fin de reducir el sobreajuste. Todos estos parámetros fueron configurados en el script utilizado para obtener los modelos discriminantes.

Los modelos fueron evaluados mediante validaciones internas en el conjunto de entrenamiento y a través de la determinación del porcentaje de buenas clasificaciones (%BC) y el AUC ROC en cada conjunto de moléculas. En esta instancia, se consideraron como mejores modelos a aquellos que presentaron mayor AUC ROC en la biblioteca simulada DUDE-A. De esta manera, las funciones discriminantes correspondientes a los 5 mejores modelos individuales, según el desempeño en la campaña de cribado retrospectivo, se presentan a continuación.

#### **Modelo 191:**

**Clase = 0,46645 – 0,71571 \* B02[O-O] – 0,24724 \* CATS2D\_00\_PP + 0,02305 \* SM13\_EA(dm)**



**Modelo 208:**

$$\text{Clase} = 0,763899 - 0,475031 * \text{B02}[\text{O-O}] + 0,262913 * \text{F07}[\text{N-O}] - 0,008117 * \text{TPSA}(\text{Tot}) - 1,067750 * \text{B03}[\text{F-Cl}] + 0,505533 * \text{ATSC5e}$$

**Modelo 586:**

$$\text{Clase} = 0,4991 - 0,4722 * \text{F02}[\text{O-O}] - 2,6096 * \text{MATS1v} + 0,4355 * \text{ATSC2e}$$

**Modelo 51:**

$$\text{Clase} = 0,6293 - 0,3963 * \text{F02}[\text{O-O}] - 0,3460 * \text{CATS2D\_00\_DD} + 0,8742 * \text{MATS2i}$$

**Modelo 902:**

$$\text{Clase} = 1,28358 - 0,04515 * \text{SsNH2} - 0,79561 * \text{GATS2i} + 0,24234 * \text{B03}[\text{N-N}]$$

Los descriptores incluidos en los 5 mejores modelos individuales se describen en el Anexo 3 del Material Suplementario. Considerando que el conjunto de entrenamiento cuenta con 90 compuestos, puede observarse que los 5 modelos presentan una buena relación entre el número de compuestos del conjunto de entrenamiento y el número de descriptores incluidos en el modelo, cuatro de los modelos seleccionados presentan una relación de 1 descriptor por cada 20 compuestos del conjunto de entrenamiento, mientras que el modelo restante una relación de 1 a 12, lo que indicaría en todos los casos una muy baja probabilidad de sobreajuste.

## 6.4. Validación de los modelos individuales

Los modelos clasificatorios fueron validados mediante distintos métodos de validación interna y externa para evaluar la robustez y la capacidad predictiva.

### 6.4.1. Validación interna

Los resultados se informan como el porcentaje promedio de buenas clasificaciones (%BC). En la tabla 6.2, se puede observar que los %BC obtenidos en esta validación son muy similares a los obtenidos para los modelos originales. Se obtuvo



también para cada modelo la tasa de error en ausencia del modelo o NOMER% (tabla 6.3).

**Tabla 6.2** Valores de porcentaje de buenas clasificaciones globales (% BC), su correspondiente desviación estándar (DS) para cada modelo individual, obtenidos en la validación interna.

	Modelo original	Validación Cruzada	
	%BC	%BC promedio	DS
Modelo 191	68,33	66,67	0,19
Modelo 208	76,67	71,33	0,16
Modelo 586	70,00	66,00	0,19
Modelo 51	83,33	72,67	0,18
Modelo 902	70,00	65,00	0,15

Como puede observarse en la tabla anterior, los modelos individuales no presentan una gran capacidad explicativa. Esto podría deberse a la dificultad para modelar con modelos lineales una variable compleja como es una respuesta fenotípica, y al limitado tamaño del conjunto de entrenamiento debido a la escasez de datos.

#### 6.4.2. Validación externa

La capacidad predictiva de cada modelo individual se evaluó mediante validación externa, utilizando el conjunto de prueba de 30 compuestos (tabla 6.4). Si se comparan los resultados obtenidos en la validación interna y externa, puede observarse que uno de los modelos (modelo 51) pareciera presentar un cierto grado de sobreajuste, ya que mostró una capacidad explicativa (según su desempeño en el conjunto de entrenamiento) mayor que su capacidad predictiva. Sin embargo, este modelo presentó un buen desempeño en el conjunto DUDE-A durante la campaña de SV retrospectiva.



### 6.4.3. Evaluación del desempeño de los modelos

Se estimaron para el conjunto de entrenamiento y el de prueba, diferentes parámetros estadísticos que evalúan la performance de los modelos clasificatorios: sensibilidad ( $Se$ ), especificidad ( $Sp$ ), Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo, y el F-measure (**Roy & Mitra, 2011**). Los resultados para los cinco mejores modelos individuales se muestran en las tablas 6.3 y 6.4. Los valores de  $Se$  y  $Sp$  para ambos conjuntos se muestran en la tabla 6.5.

**Tabla 6.3** Parámetros de exactitud, F-measure, Nomer%, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo en el conjunto de entrenamiento para cada uno de los 5 mejores modelos individuales.

	Exactitud	F-measure	Nomer %	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
<b>Modelo 191</b>	0,6833	0,6984	50	0,6666	0,7037
<b>Modelo 208</b>	0,7667	0,7879	50	0,7222	0,8333
<b>Modelo 586</b>	0,7000	0,7188	50	0,6765	0,7308
<b>Modelo 51</b>	0,8333	0,8438	50	0,7941	0,8846
<b>Modelo 902</b>	0,7000	0,7097	50	0,6875	0,7143

**Tabla 6.4** Parámetros de exactitud, F-measure, Nomer%, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo en el conjunto de prueba para cada uno de los 5 mejores modelos individuales.

	Exactitud	F-measure	Nomer %	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
<b>Modelo 191</b>	0,6667	0,7059	46,67	0,6000	0,8000
<b>Modelo 208</b>	0,7333	0,7778	46,67	0,6364	1,0000
<b>Modelo 586</b>	0,7333	0,7500	46,67	0,6667	0,8333
<b>Modelo 51</b>	0,7000	0,7429	46,67	0,6190	0,8889
<b>Modelo 902</b>	0,7667	0,7667	46,67	0,6667	1,0000



**Tabla 6.5** Valores de Se y Sp obtenidos en el conjunto de entrenamiento y de prueba.

	Training set		Test set	
	Se	Sp	Se	Sp
<b>Modelo 191</b>	0,7333	0,6667	0,8571	0,6000
<b>Modelo 208</b>	0,8667	0,7222	1,0000	0,6364
<b>Modelo 586</b>	0,7667	0,6765	0,8571	0,6667
<b>Modelo 51</b>	0,9000	0,7941	0,9286	0,6190
<b>Modelo 902</b>	0,7333	0,6875	1,0000	0,6667

De acuerdo con los valores de exactitud obtenidos, cuatro de los modelos clasifican correctamente entre un 66% y 76% de los compuestos en el conjunto de entrenamiento, mientras que en el conjunto de prueba los 5 modelos seleccionados presentaron valores de exactitud similares que rondan en un 70%. El valor de F-measure se puede interpretar como una medida de superposición entre las clases verdaderas y estimadas, toma valores de 0 cuando no existe superposición alguna y valores de 1 cuando se solapan completamente; por lo que un valor alto de F-measure infiere un buen modelo clasificatorio. En este caso, para los 5 mejores modelos individuales, se obtuvo una superposición entre ambas respuestas entre un 70% y 80%.

Los Valores Predictivo Positivo y Valores Predictivo Negativo, reflejan la proporción de compuestos predichos como activos o inactivos, que experimentalmente dan resultados positivos o negativos, respectivamente. Los resultados obtenidos para los 5 mejores modelos individuales muestran que la probabilidad de que un compuesto predicho como activo, dé resultados positivos experimentalmente se encuentra entre 60% y 79%, para el training set y test set respectivamente. En cuanto a la probabilidad de que un compuesto sea inactivo experimentalmente luego de ser predicho como inactivo, los valores obtenidos en ambos conjuntos fueron más altos, entre un 80% y un 100%.



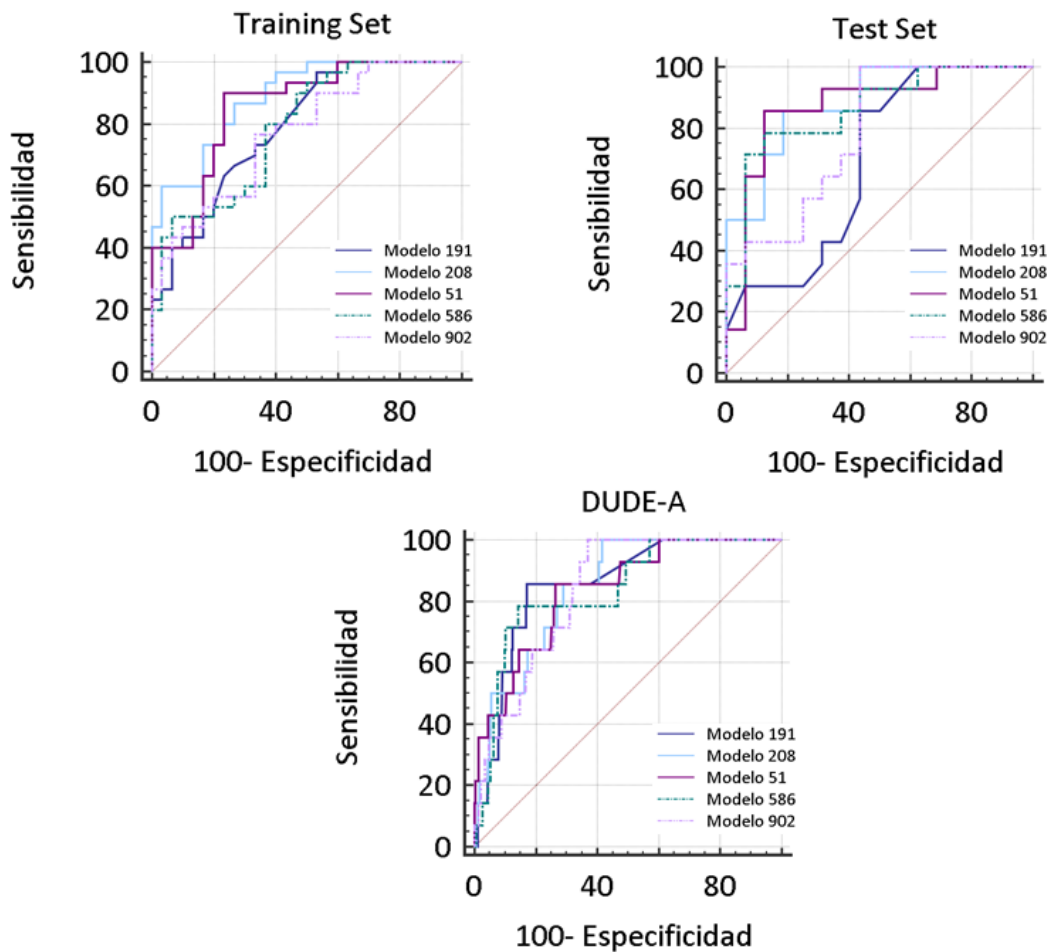
El valor de NOMER% nos indica la tasa de error en ausencia del modelo clasificatorio como medida interna de la capacidad predictiva del modelo, y se calcula considerando el número total de objetos y el número de objetos en la clase más representada. Dado que las proporciones de los compuestos activos e inactivos en los conjuntos de entrenamiento y de prueba son idénticas y casi idénticas, el NOMER% correspondiente es 50% y 46,7%, respectivamente.

Por otra parte, se obtuvieron las curvas AUC ROC para los 5 mejores modelos individuales (con sus respectivas desviaciones estándares) reportados en cada uno de los conjuntos de la base (*training set*, *test set*, DUDE-A). Si bien se analiza el desempeño de los modelos en todos los conjuntos que conforman la base de datos, los mejores modelos individuales fueron elegidos según la performance en el conjunto DUDE-A, y utilizados posteriormente para la técnica de combinación de modelos. Los resultados se muestran en la tabla 6.6.

**Tabla 6.6** Valores de AUC ROC para los cinco mejores modelos individuales, obtenidos en training set, test set, y en los conjuntos DUDE-A.

	Training Set	Test Set	DUDE-A
<b>Modelo 191</b>	0,790 ( $\pm 0,0570$ )	0,690 ( $\pm 0,100$ )	<b>0,855 (<math>\pm 0,0426</math>)</b>
<b>Modelo 208</b>	0,886 ( $\pm 0,0405$ )	0,884 ( $\pm 0,0598$ )	0,844 ( $\pm 0,0397$ )
<b>Modelo 586</b>	0,787 ( $\pm 0,0580$ )	0,862 ( $\pm 0,0694$ )	0,837 ( $\pm 0,0521$ )
<b>Modelo 51</b>	0,851 ( $\pm 0,0493$ )	0,871 ( $\pm 0,0694$ )	0,836 ( $\pm 0,0507$ )
<b>Modelo 902</b>	0,770 ( $\pm 0,0405$ )	0,786 ( $\pm 0,0841$ )	0,835 ( $\pm 0,0372$ )

Tal como se observa en la tabla anterior, si bien en los conjuntos de entrenamiento y de prueba mostraron un resultado variable, los modelos individuales muestran un desempeño aceptable en la base DUDE-A, con valores de AUC ROC mayores a 0,8, reflejando una muy buena capacidad de recuperación de activos en aquel conjunto de datos donde el porcentaje de activos fue menor a 2%. En la figura 6.4, se pueden observar las curvas ROC para los 5 mejores modelos individuales en los distintos conjuntos de datos (*training set*, *test set* y conjunto DUDE-A).



**Figura 6.4** Comparación de curvas ROC obtenidas en los distintos conjuntos de datos para los cinco mejores modelos individuales.

## 6.5. Combinación de modelos

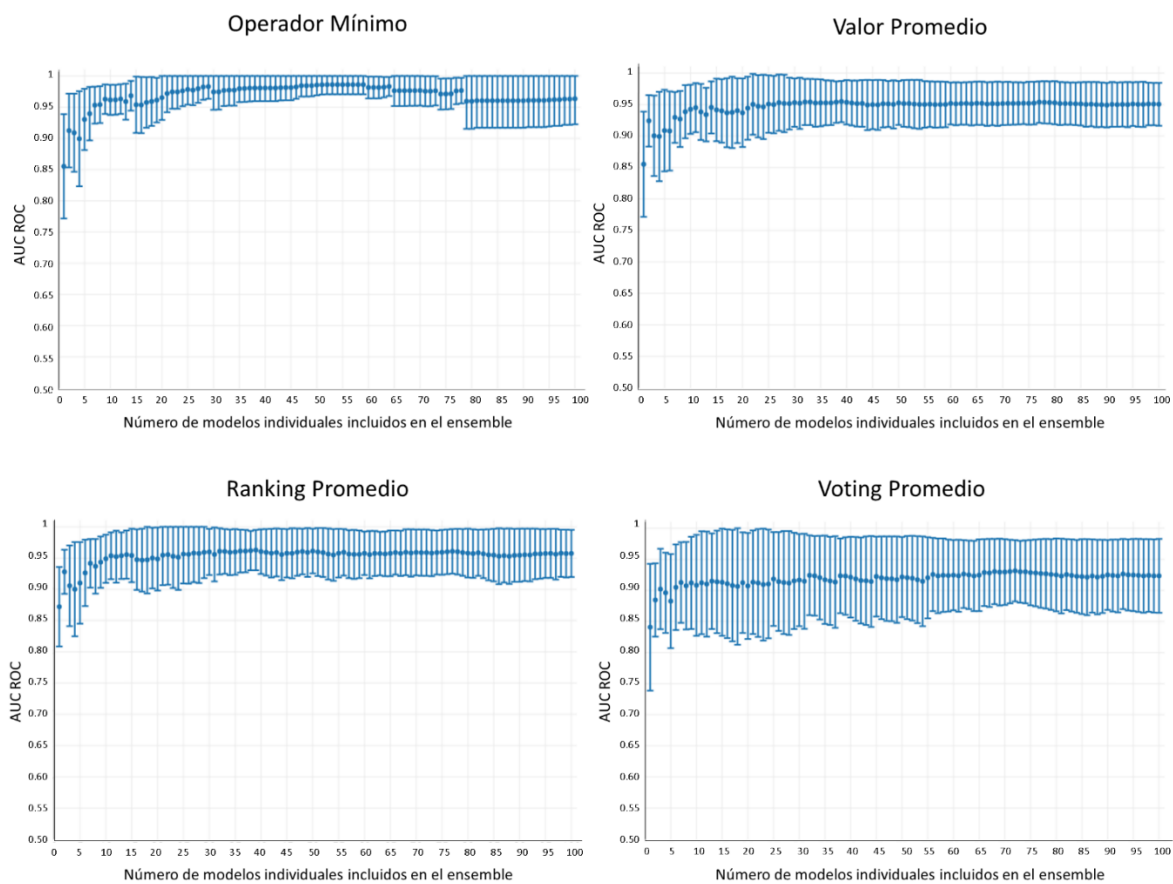
Para mejorar la situación observada en los modelos individuales recurrimos a las metodologías de combinación de modelos. En este caso, se ensayaron ensambles de entre 2 y 100 de los mejores modelos según su desempeño en la campaña de cribado retrospectivo sobre la base DUDE-A. A los fines del entrenamiento y evaluación del ensamble, se llevaron a cabo dos campañas retrospectivas. La primera de ellas, análoga a la ya descrita para los modelos individuales, sirvió para entrenar el ensamble, es decir, para definir qué número de modelos individuales integrarían el ensamble y cómo se



combinarían los *scores* de los modelos individuales; la segunda permitió validar el desempeño de la combinación de modelos elegida.

### 6.5.1. Cribado Virtual Retrospectivo

Mediante las gráficas de AUC ROC versus cantidad de modelos en la base DUDE-A (Fig. 6.5) se determinó la cantidad de modelos que obtiene el mayor AUC ROC para cada esquema de combinación. Se puede observar que la combinación de modelos, independientemente de la técnica de ensamblado empleada, conduce a la obtención de valores de AUC ROC más altos, lo que se traduce en una optimización de la capacidad predictiva por parte de las funciones discriminantes combinadas.



**Figura 6.5** Valores de AUC ROC en la base de datos DUDE-A versus el número de modelos combinados mediante la aplicación de Operador Mínimo (MIN operator), Valor Promedio (Average Score), Ranking Promedio (Average Ranking) y Voting Promedio (Average Voting).





Analizando las gráficas anteriores, puede observarse que los resultados de AUC ROC obtenidos con los operadores Valor Promedio y Voting Promedio son menores a 0,95, con una gran dispersión para los valores que resultan de la combinación por medio del Voting. Si se analizan las distintas combinaciones de modelos realizadas con los operadores Mínimo y Ranking Promedio, puede observarse que los valores de AUC ROC obtenidos se estabilizan en valores mayores a 0,95. Para el caso particular del operador Mínimo, los valores de AUC ROC son más cercanos a un valor de 1 y, además tal como se aprecia en la gráfica, las desviaciones estándares obtenidas son más pequeñas. Es por ello, que se decidió trabajar con aquella combinación de modelos que presente el mayor valor de AUC ROC para el operador MIN y que, además, combine la menor cantidad de modelos posibles. De esta manera, considerando el principio de parsimonia (*“En igualdad de condiciones, la explicación más sencilla suele ser la más probable”*) se eligió la combinación con 29 modelos (otras combinaciones incluyen mayor número de modelos con valores de AUC ROC similares a 0,98 y con variaciones respecto a la combinación elegida en la tercera cifra decimal del AUC ROC).

Adicionalmente, se calcularon los parámetros BEDROC ( $\alpha=20$ ) y RIE 1% (Truchon & Bayly, 2007). Para ello, se realizaron los respectivos análisis para la combinación de 29 modelos con cada operador, con el paquete R y se utilizó la herramienta online ROCKER. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 6.7** Valores de AUC ROC, BEDROC y RIE 1%, obtenidos en los conjuntos de entrenamiento, DUDE-A y DUDE-B.

	Training Set		DUDE-A			DUDE-B		
	AUC ROC	BEDROC	AUC ROC	BEDROC	RIE1%	AUC ROC	BEDROC	RIE1%
29-ME <sup>Min</sup>	0,951 ± 0,0292	0,999	0,983±0,0241	0,841	36,22	0,975 ± 0,0295	0,752	64,43
29-ME <sup>Prom</sup>	0,942 ± 0,0317	0,998	0,951 ± 0,0392	0,627	14,49	0,946 ± 0,0422	0,646	35,80
29-ME <sup>Rank</sup>	0,940 ± 0,0323	0,998	0,959 ± 0,0364	0,721	29,98	0,938 ± 0,0449	0,664	50,11
29-ME <sup>Vot</sup>	0,941 ± 0,0320	0,998	0,916 ± 0,0488	0,572	14,49	0,887 ± 0,0580	0,525	28,64



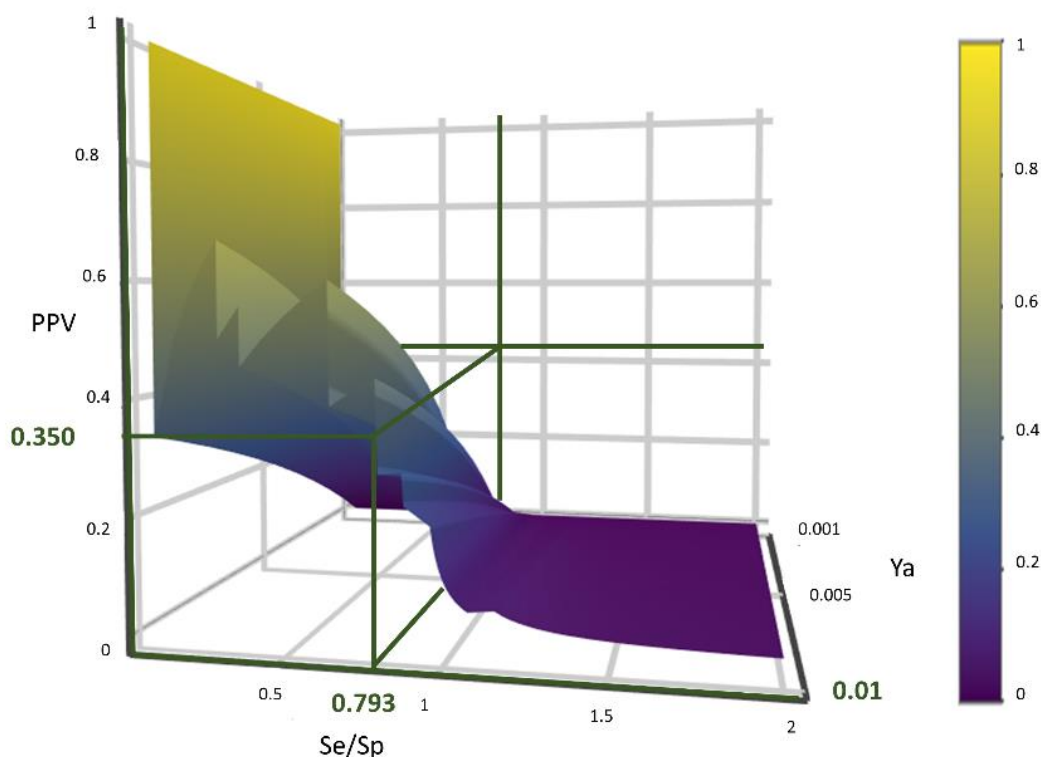
Analizando en conjunto los valores de AUC ROC y las métricas de enriquecimiento para los 29 mejores modelos ensamblados con los diferentes operadores, confirmamos la elección de la combinación de los 29 modelos mediante el operador MIN para realizar el SV prospectivo.

## 6.6. Selección del Valor de Corte

Como se describió en el capítulo anterior recurrimos a las gráficas de superficie PPV para seleccionar un valor de corte. Con el análisis de estas superficies podemos optimizar de manera visual (o eventualmente, matemática) la evolución de PPV como una función de la relación  $Se/Sp$  en un rango de valores  $Ya$ .

En nuestro caso, utilizamos la relación  $Se/Sp$  obtenida para el ensamble MIN-29 para los diferentes valores de corte del *score* en la campaña de SV retrospectivo. Adicionalmente se varió el  $Ya$  desde 0,001 hasta 0,01 con variaciones sucesivas.

En la figura 6.6 se observa la gráfica obtenida para las condiciones mencionadas; analizando la superficie observamos que al desplazarnos hacia relaciones  $Se/Sp$  bajas (alta  $Sp$ ) tenemos un impacto positivo en el PPV, lo cual resulta en mayores probabilidades de confirmar *hits in silico* cuando se someten a ensayos experimentales.



**Figura 6.6** Gráfico de superficie PPV obtenido para la combinación de los 29 mejores modelos individuales.

A partir de esta gráfica seleccionamos un valor de corte de 0,3505 para ser utilizado en la campaña de screening prospectivo; el puntaje mencionado está asociado a una relación  $Se / Sp$  de 0,793 ( $Sp = 98,99\%$ ;  $Se = 78,57\%$ ) y a un PPV de 44,10 para  $Ya = 0,01$  y 7,25 para  $Ya = 0,001$ .

## 6.7. Cribado Virtual Prospectivo

Para realizar el SV, se curaron las bases de datos DrugBank v.5.1.0 y SweetLead mediante el programa STANDARDIZER 16.9.12.0. Posteriormente, se aplicó la combinación por el operador MINIMO de los mejores 29 modelos individuales sobre una base de datos con un total de 9.032 compuestos, 6.846 provenientes de DrugBank y 2.186 de SweetLead. Como resultado de ello, se obtuvo para cada uno de los 9.032



## Capítulo 6

### Estrategia Computacional y Validación Experimental: Resultados

---

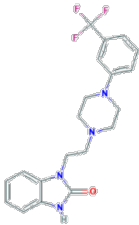
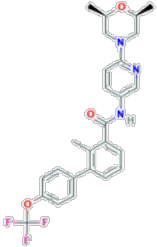
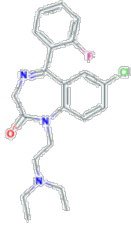
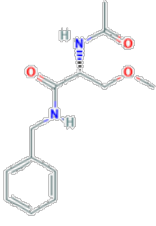
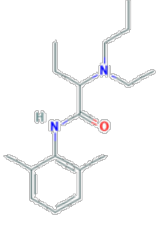
compuestos un valor de *score*. Se seleccionaron para analizar 60 compuestos, los cuales presentaron un *score* por encima de 0,3505.

Para determinar cuán confiable es la predicción realizada por la combinación de modelos se determinó el dominio de aplicación, a través del cual se verificó que cada *hit* pertenecía a tal región del espacio, determinada por la naturaleza química del conjunto de entrenamiento. Así pues, de aquellos 60 compuestos, se descartaron sólo 3 de ellos puesto que no entraron dentro del dominio de aplicabilidad.

En la tabla 6.8 se presentan los primeros 11 compuestos según los valores de *score* más altos.

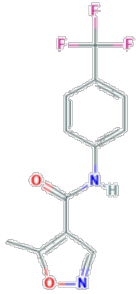
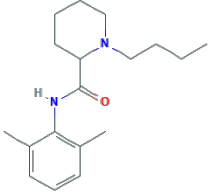
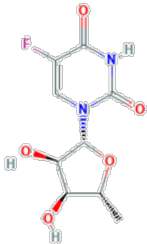
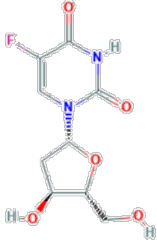
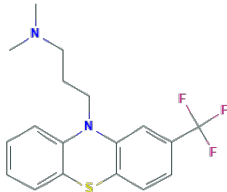
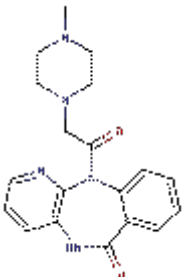


**Tabla 6.8** Compuestos seleccionados a partir del SV de las bases de datos DrugBank y SweetLead.

Nombre	MIN Score	PPV% (Ya =0,01)	Estructura	Indicación Original
Flibanserina	0,6185	33,43		Terapia en la Disfunción Sexual Hipoactiva en mujeres
Sonidegib	0,5601	50,10		Agente Antineoplásico
Flurazepam	0,4952	55,66		Hipnótico
Lacosamida	0,4683	45,56		Anticonvulsivo
Etidocaína	0,4537	50,10		Anestésico Local



Capítulo 6  
Estrategia Computacional y Validación Experimental:  
Resultados

Leflunomida	0,4142	47,48		Agente antireumático modificador de la enfermedad
Bupivacaina	0,3907	42,96		Anestésico Local o Analgesia en cirugía
Doxifluridina	0,3857	39,23		Tratamiento en el Cáncer de Estómago
Floxuridina	0,3788	39,24		Antimetabolito Antineoplásico
Triflupromazina	0,3783	39,23		Antipsicótico Antinauseoso Antiemético
Pirenzepina	0,3714	39,23		Tratamiento de la úlcera péptica, gástrica y duodenal.



Como etapa final del SV, se realizó una búsqueda bibliográfica de los 57 compuestos seleccionados, evaluando diferentes características, tales como si están aprobados por alguna autoridad regulatoria, si fueron evaluados o no frente al modelo animal de 6 Hz u otros modelos animales, la/s indicación/es terapéutica/s original/es, el costo y disponibilidad comercial. Con esta evaluación, se obtuvo un total de 28 compuestos que corresponden a fármacos aprobados, y de acuerdo con la disponibilidad y accesibilidad comercial, se adquirieron tres compuestos: 5-fluorouridina (5-FU), triflupromazina (TFP) y pirenzepina (PZP). Si bien el fármaco 5-FU no se encuentra entre los compuestos de la tabla 6.8, éste fue adquirido ya que presenta 95% de similitud química con el metabolito activo (5-fluorouracilo) generado a partir de la metabolización de la doxifluridina (**Baek et al., 2013**) siendo su costo menor.

## 6.8. Validación Experimental

Para la validación experimental, los compuestos seleccionados fueron evaluados frente al modelo animal de crisis de 6 Hz, también en el modelo de MES y PTZ. Todos los ensayos fueron realizados bajo la aprobación de los protocolos por parte del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP), a través del cual se garantiza que los ensayos se desarrollen de acuerdo con los estándares internacionales de bienestar animal. Los certificados de los protocolos empleados se adjuntan en el Anexo 4 del Material Suplementario.

### 6.8.1. Ensayo de Rotorod

Previamente a cada modelo de crisis, los animales fueron evaluados frente al ensayo de Rotorod con el fin de evaluar la neurotoxicidad de cada compuesto. Tal como



se muestra en la tabla 6.9, todos los animales superaron la prueba sin presentar signos de ataxia y/o sedación.

**Tabla 6.9** Resultados obtenidos en el ensayo de Rotorod, para las distintas dosis y tiempos utilizados en las evaluaciones de las tres drogas y controles frente al modelo de 6 Hz. \*Se reporta el resultado de un solo ensayo.

	Tiempo de pretratamiento		
	0,5 hs	1 h	4 hs
PZP 30 mg/kg	0/6	-	0/6
PZP 60 mg/kg	0/6	-	-
PZP 100 mg/kg	0/6	-	0/6
TFP 0,1 mg/kg	0/6	-	0/6
TFP 1 mg/kg	0/6	-	0/6
5-FU 30 mg/kg	0/6	-	0/6
5-FU 60 mg/kg	0/6	-	-
5-FU 100 mg/kg	0/6	-	0/6
LEV 30 mg/kg*	-	0/6	-
Control SF*	0/6	-	0/6

Los datos se reportan como animales que presentaron signos de neurotoxicidad respecto del número total de animales evaluados.

### 6.8.2. Modelo de crisis de 6 Hz

Como ya se ha mencionado, la desventaja que presenta este modelo frente a otros modelos de crisis radica en que las crisis no son a todo o nada, tal como sucede en el caso del ensayo MES o PTZsc. Además, se presenta una gran variabilidad en los tiempos asociados a las crisis presentadas por los animales del grupo control. Es por ello que para analizar si el compuesto evaluado muestra actividad protectora, no sólo se





tuvo en cuenta el tipo de crisis que presentó cada animal, sino que los tiempos fueron comparados estadísticamente. Por otra parte, se trabajó con un número de animales más representativo para cada grupo, los cuales fueron aleatorizados al momento del ensayo.

#### *6.8.2.1. Pirenzepina*

La pirenzepina (PZP) es un agente antimuscarínico que actúa sobre los receptores M1, inhibiendo la secreción gástrica. Se utiliza en el tratamiento de la úlcera péptica gástrica y duodenal.

Se evaluó a 30 mg/kg y 100 mg/kg, a dos tiempos diferentes, 30 minutos y 4 horas y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 6.10 y 6.11, respectivamente. Los animales inyectados con LEV presentaron crisis menores a 10 segundos, mientras que tanto los animales administrados con el fármaco como los animales controles inyectados con SF presentaron tiempos de crisis similares.



**Capítulo 6**  
**Estrategia Computacional y Validación Experimental:**  
**Resultados**

**Tabla 6.10** Resultados obtenidos con PZP a 0,5 horas, evaluada a dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg. \*Control SF inyectado a 10 ml/kg. Clonus unilat. miembro ant.: clonus unilateral de miembro anterior; Str. Tail: Straub tail; Inmov: inmovilidad.

	Tiempo de crisis (seg)	Tipo de crisis máxima
<b>PZP 30 mg/kg</b>	20	Clonus unilat. miembro ant.
	28	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	22	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	20	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	12	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	15	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
<b>PZP 100 mg/kg</b>	20	Clonus unilat. miembro ant.
	24	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	15	Clonus unilat. miembro ant.
	160	Clonus miembros ant. – Str. Tail - Inmov
	63	Str. Tail - Inmov
	19	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
<b>LEV 30 mg/kg</b>	5	-
	6	Clonus unilat. miembro ant.
	12	Clonus unilat. miembro ant.
	5	Clonus unilat. miembro ant.
	10	Clonus unilat. miembro ant.
	10	Clonus unilat. miembro ant.
<b>Control SF*</b>	200	Str. tail
	250	Clonus unilat. miembro ant.
	40	Clonus unilat. miembro ant. – Inmov
	30	Clonus miembros ant. – Str. tail
	140	Clonus unilat. miembro ant. – Inmov
	110	Str. Tail - Inmov



**Tabla 6.11** Resultados obtenidos con PZP a 4 horas, evaluada a dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg. \*Control SF inyectado a 10 ml/kg. Clonus unilat. miembro ant.: clonus unilateral de miembro anterior; Str. Tail: Straub tail; Inmov: inmovilidad.

	Tiempo de crisis (seg)	Tipo de crisis máxima
PZP 30 mg/kg	52	Str. tail
	265	Inmov
	268	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	275	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	13	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	19	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
PZP 100 mg/kg	16	Str. tail
	31	Str. tail
	33	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	17	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	21	Str. tail
	142	Str. Tail - Inmov
LEV 30 mg/kg	21	Str. tail
	20	-
	12	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	13	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	11	-
	11	Str. tail
Control SF*	271	Str. Tail - Inmov
	273	Str. tail
	75	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	126	Clonus miembros ant. – Str. tail

En general, se puede observar que los controles inyectados con LEV presentaron tiempos relativamente bajos, mientras que para los grupos restantes el tiempo medido



intragrupo es muy variable. Por otra parte, se caracterizó la crisis que sufrió cada animal, reflejando en cada tabla el tipo de crisis máxima que presentaban. Esto es, si simplemente presentaban inmovilidad con o sin *Straub tail* o desarrollaban clonus de uno o ambos miembros anteriores. Los animales que se trataron con LEV, en su mayoría presentaron una fase muy breve de clonus de un solo miembro anterior, siendo muy rápida su recuperación. Además, una vez recuperados, se observaba en estos un comportamiento exploratorio similar al de un ratón normal.

Con respecto a las crisis que presentaban los grupos inyectados con PZP 30 mg/kg y 100 mg/kg presentaron en su mayoría como signo de crisis la típica *Straub tail* y también tuvieron clonus de miembros anteriores. En el caso de los controles con SF, estos presentaron tiempos de crisis más prolongados caracterizadas por clonus de los miembros anteriores y/o *Straub tail*. Conforme transcurría el tiempo, estos signos eran menos evidenciables y el animal empezaba a permanecer inmóvil hacia el final de la crisis.

Para evaluar la significancia de los resultados, se analizó la variable tiempo mediante un análisis de varianza monofactorial, utilizando la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK). Si bien los resultados mostraban diferencias significativas cuando los animales eran inyectados con PZP o LEV, respecto del grupo control, al emplear el test de Levene no verificó la homogeneidad de varianzas. Una situación similar se presentó cuando se trabajó con la transformada logarítmica de la variable “tiempo” (logaritmo natural del tiempo). Por lo que, al no observarse homocedasticidad, se optó por utilizar el método no paramétrico equivalente, la prueba de Kruskal-Wallis. Los métodos no paramétricos trabajan con rangos de observaciones, siendo no sensibles a los datos extremos (Nahm, 2016).

Los resultados se muestran en las tablas 6.12 y 6.13. El valor del estadístico H de Kruskal-Wallis fue 17,78 (p-valor = 0,0005) y 11,14 (p-valor = 0,0109) para las evaluaciones de 0,5 hs y 4 hs, respectivamente.



**Tabla 6.12** Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación a 0,5 hs, utilizando ambas dosis de PZP. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). D.E: desvío estándar.

	N	Medias	D.E	Medianas	Rango promedio	
LEV 30 mg/kg	6	8,00	3,03	8,00	3,58	A
PZP 30 mg/kg	6	19,50	5,58	20,00	11,50	A B
PZP 100 mg/kg	6	50,17	56,62	22,00	14,42	B C
Control SF	6	128,33	87,04	125,00	20,50	C

Los valores de las medias, medianas y rango promedio se encuentran expresados en segundos.

**Tabla 6.13** Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación a 4 hs, utilizando ambas dosis de PZP. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). D.E: desvío estándar.

	N	Medias	D.E	Medianas	Rango promedio	
LEV 30 mg/kg	6	14,67	4,59	12,50	5,00	A
PZP 30 mg/kg	6	148,67	132,89	158,50	14,25	B
PZP 100 mg/kg	6	43,33	48,85	26,00	10,92	A B
Control SF	4	186,25	101,18	198,50	18,00	B

Los valores de las medias, medianas y rango promedio se encuentran expresados en segundos.

Analizando los resultados de la tabla 6.12, se observa que los animales tratados con PZP 100 mg/kg y los controles de SF difieren significativamente de los animales tratados con LEV. Además, el tratamiento con PZP 30 mg/kg difiere del tratamiento control con SF. En cuanto a la evaluación a un tiempo de 4 hs (tabla 6.13), se obtuvo que una vez más los animales controles con SF difieren significativamente de los tratados con LEV, al igual que PZP 30 mg/kg. Por otra parte, los animales administrados con PZP 100 mg/kg no difieren significativamente de los animales con LEV. Adicionalmente, se obtuvieron los diagramas *boxplots*, para cada uno de los tiempos de pretratamiento utilizados (Fig. 6.7 y 6.8). En estos, se representan gráficamente los diferentes datos a través de sus cuartiles y las medianas, donde puede observarse la verdadera distribución



de los datos y si existen *outliers* o valores atípicos. Estos gráficos fueron realizados utilizando el paquete disponible en el entorno R y RStudio.

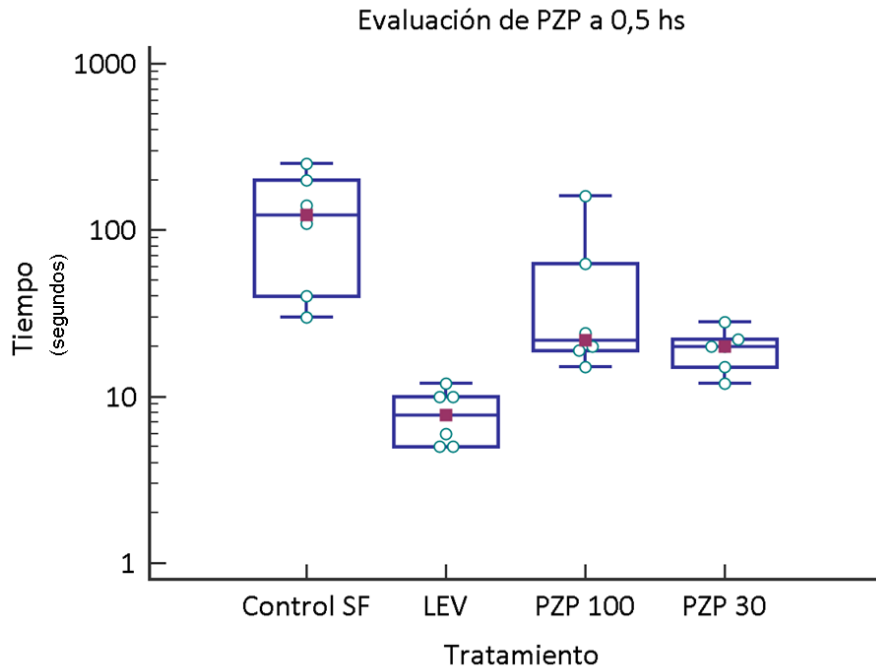


Figura 6.7 *Boxplot* obtenido con los resultados de la evaluación a 0,5 hs de pretratamiento, utilizando ambas dosis de PZP.

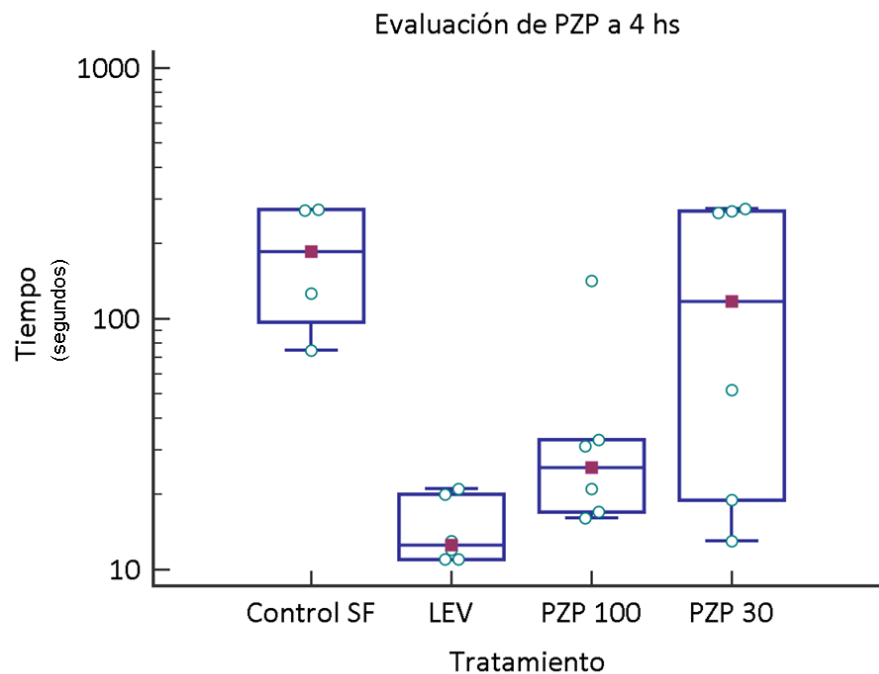


Figura 6.8 *Boxplot* obtenido con los resultados de la evaluación a 4 hs de pretratamiento, utilizando ambas dosis de PZP.



En base a estos resultados, se realizó una evaluación adicional utilizando PZP a una dosis media de 60 mg/kg con un tiempo de pretratamiento de 0,5 hs. Los resultados de dicho ensayo se presentan a continuación en la tabla 6.14:

**Tabla 6.14** Resultados obtenidos con PZP a 0,5 horas, evaluada a dosis de 60 mg/kg. \*Control SF inyectado a 10 ml/kg. Clonus unilat. miembro ant.: clonus unilateral de miembro anterior; Str. Tail: Straub tail; Inmov: inmovilidad.

	Tiempo de crisis (seg)	Tipo de crisis máxima
PZP 60 mg/kg	28	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	22	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	43	Str. tail
	28	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	23	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	19	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
LEV 30 mg/kg	10	Clonus unilat. miembro ant.
	10	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	16	Clonus miembros ant. – Str. tail
	9	-
	10	-
	17	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
Control SF*	19	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	94	Str. tail
	21	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	53	Clonus miembros ant. – Str. tail
	73	Clonus miembros ant.
	77	Str. tail

Para analizar estos resultados experimentales, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, a partir de la cual se obtuvieron los valores de la tabla 6.15, con un estadístico H de 12,03 (p-valor = 0,00236). También se realizaron los gráficos de *boxplot* (Fig. 6.9).



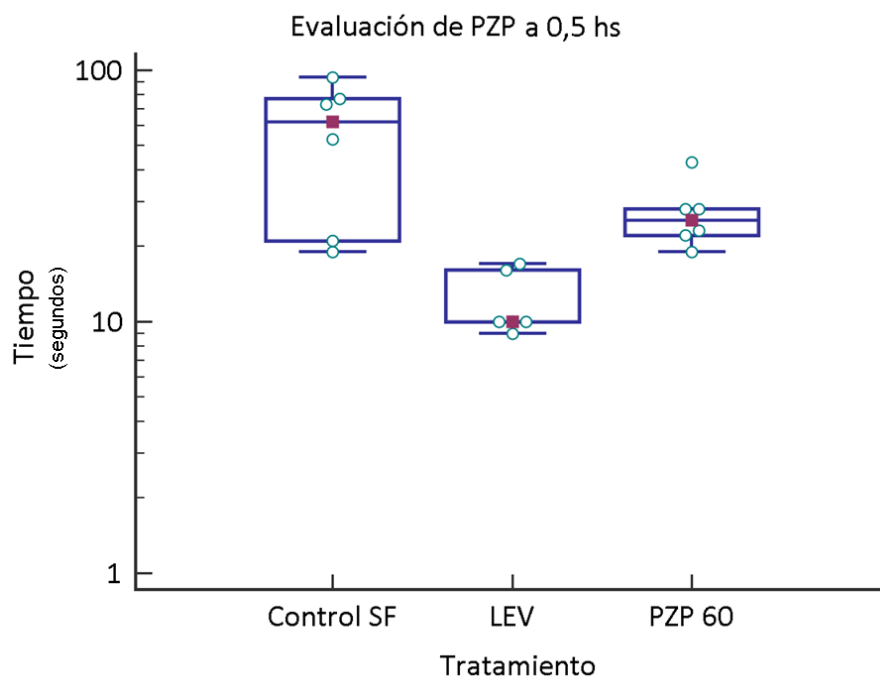
## Capítulo 6

### Estrategia Computacional y Validación Experimental: Resultados

**Tabla 6.15** Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación a 0,5 hs, a una dosis de 60 mg/kg de PZP. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). D.E: desvío estándar.

	N	Medias	D.E	Medianas	Rango promedio	
LEV 30 mg/kg	6	12,00	3,52	10,00	3,50	A
PZP 60 mg/kg	6	27,17	8,52	25,50	11,25	B
Control SF	6	56,17	30,91	63,00	13,75	C

Los valores de las medias, medianas y rango promedio se encuentran expresados en segundos.



**Figura 6.9** Boxplot obtenido con los resultados de la evaluación a 0,5 hs de pretratamiento, utilizando una dosis de 60 mg/kg de PZP.

De acuerdo con estos ensayos, se puede observar que PZP difiere significativamente de LEV. Con ello, se puede concluir que la PZP a las dosis y tiempos de pretratamientos evaluados no presenta efectos protectores frente al modelo de crisis de 6 Hz.





### 6.8.2.2 Triflupromazina

Triflupromazina (TFP) es un inhibidor de los receptores dopaminérgicos D1/D2, con acción adicional sobre los receptores muscarínicos M1/M2 y receptores 5-HT<sub>2B</sub>.

Para llevar a cabo la evaluación experimental, se administraron los animales con dosis de TFP 30 mg/kg y 100 mg/kg, y se observó un efecto proconvulsivante que continuaba exhibiéndose a dosis de 10 mg/kg. Entonces, se decidió administrar dosis aún menores, tales como 0,1 mg/kg y 1 mg/kg, con tiempos de pretratamiento de 0,5 hs y 4 hs (tablas 6.16 y 6.17). Los animales controles fueron administrados con LEV 30 mg/kg y SF 10 ml/kg.



**Tabla 6.16** Resultados obtenidos con TFP a 0,5 horas, evaluada a ambas dosis. \*Control SF inyectado a 10 ml/kg. Clonus unilat. miembro ant.: clonus unilateral de miembro anterior; Str. Tail: Straub tail; Inmov: inmovilidad.

	Tiempo de crisis (seg)	Tipo de crisis máxima
TFP 0,1 mg/kg	125	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	185	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	22	Clonus unilat. miembro ant. - Inmov
	18	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	12	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	14	Clonus unilat. miembro ant.
TFP 1 mg/kg	170	Clonus unilat. miembro ant.
	240	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	18	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	16	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	25	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	19	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
LEV 30 mg/kg	12	Clonus unilat. miembro ant.
	10	Clonus unilat. miembro ant.
	7	Clonus unilat. miembro ant.
	8	Clonus unilat. miembro ant.
	10	Clonus unilat. miembro ant.
	5	-
Control SF*	182	Clonus unilat. miembro ant. – Inmov
	204	Clonus miembros ant. – Inmov
	91	Clonus miembros ant. – Str. tail
	47	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	160	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	171	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail



**Tabla 6.17** Resultados obtenidos con TFP a 4 horas, evaluada a ambas dosis. \*Control SF inyectado a 10 ml/kg. Clonus unilat. miembro ant.: clonus unilateral de miembro anterior; Str. Tail: Straub tail; Inmov: inmovilidad.

	Tiempo de crisis (seg)	Tipo de crisis máxima
TFP 0,1 mg/kg	97	Clonus miembros ant. – Str. tail
	121	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	118	Clonus miembros ant. - Inmov
	30	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	182	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	185	Clonus unilat. miembro ant.
TFP 1 mg/kg	146	Clonus unilat. miembro ant.
	105	Clonus miembros ant. – Str. tail
	33	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	98	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	14	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	12	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
LEV 30 mg/kg	15	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	7	Clonus unilat. miembro ant.
	6	Clonus unilat. miembro ant.
	7	Clonus unilat. miembro ant.
	13	Clonus unilat. miembro ant.
	18	-
Control SF*	194	Clonus unilat. miembro ant. – Inmov
	100	Clonus unilat. miembro ant. – Inmov
	206	Str. Tail - Inmov
	89	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	150	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	146	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail



En las tablas anteriores, puede observarse que los animales tratados con LEV presentaron una breve crisis caracterizada por clonus de uno de los miembros anteriores, mientras que en los animales de los grupos restantes se denota gran variabilidad intragrupo.

Los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, a partir del cual se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas 6.18 y 6.19 para 0,5 hs y 4 hs, respectivamente. Los valores de los estadísticos no paramétricos H a cada tiempo de pretratamiento fueron 14,98 (p-valor=0,0018) y 14,06 (p-valor=0,00281), respectivamente.

**Tabla 6.18** Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación a 0,5 hs, utilizando ambas dosis de TFP. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). D.E: desvío estándar.

	N	Medias	D.E	Medianas	Rango promedio	
LEV 30 mg/kg	6	8,67	2,50	9,00	3,58	A
TFP 0,1 mg/kg	6	62,67	74,07	20,00	12,83	B
TFP 1 mg/kg	6	81,33	98,36	22,00	14,75	B
Control SF	6	142,50	60,39	165,50	18,83	B

Los valores de las medias, medianas y rango promedio se encuentran expresados en segundos.

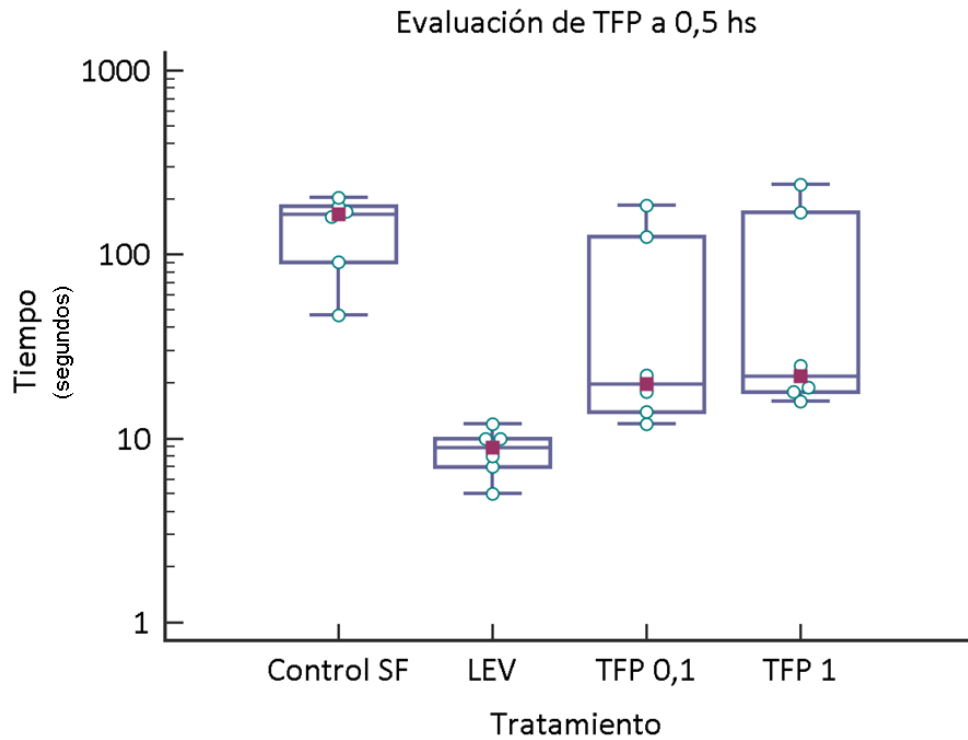
**Tabla 6.19** Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación a 4 hs, utilizando ambas dosis de TFP. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). D.E: desvío estándar.

	N	Medias	D.E	Medianas	Rango promedio	
LEV 30 mg/kg	6	11,00	5,02	10,00	4,33	A
TFP 0,1 mg/kg	6	122,17	57,75	119,50	16,17	B
TFP 1 mg/kg	6	68,00	55,91	65,50	11,08	B
Control SF	6	147,50	47,48	148,00	18,42	B

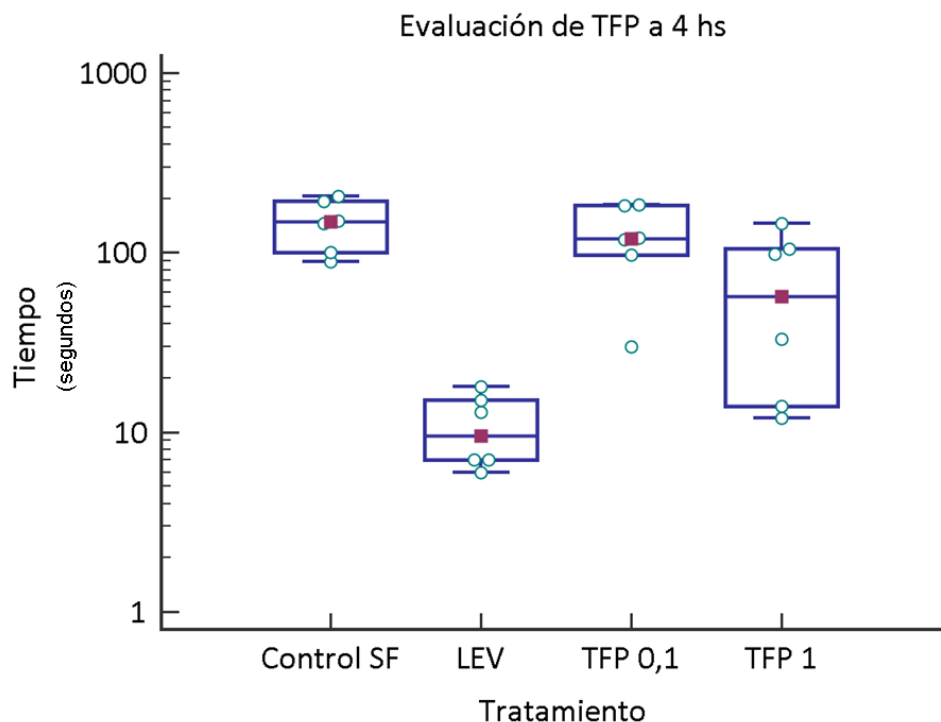
Los valores de las medias, medianas y rango promedio se encuentran expresados en segundos.



En las figuras 6.10 y 6.11 se muestran los diagramas *boxplots*, obtenidos para cada tiempo de pretratamiento.



**Figura 6.10** *Boxplot* obtenido con los resultados de la evaluación a 0,5 hs de pretratamiento, utilizando ambas dosis de TFP.



**Figura 6.11** *Boxplot* obtenido con los resultados de la evaluación a 4 hs de pretratamiento, utilizando ambas dosis de TFP.

Como resultado de la evaluación de TFP frente al ensayo de 6 Hz, se puede concluir que la droga evaluada a 0,1 mg/kg y 1 mg/kg, en los tiempos de pretratamiento ensayados, no presenta efectos anticonvulsivos.

#### 6.8.2.3. 5-Fluorouridina

La 5-fluorouridina (5-FU) es un metabolito de 5-fluorouracilo, un análogo de pirimidina, utilizado en el tratamiento contra el cáncer. Es un inhibidor irreversible de la timidilato sintetasa. Si bien es un compuesto que presenta desventajas en cuanto a su toxicidad como su farmacocinética, fue adquirido con el fin de utilizarlo en la validación experimental.

Durante el ensayo, se administró 5-FU a dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg, a los tiempos de pretratamiento de 0,5 hs y 4 hs. Se utilizaron como controles LEV 30 mg/kg y SF 10 ml/kg. Los resultados se presentan a continuación en las tablas 6.20 y 6.21:



**Tabla 6.20** Resultados obtenidos con 5-FU a 0,5 horas, evaluada a ambas dosis. \*Control SF inyectado a 10 ml/kg. Clonus unilat. miembro ant.: clonus unilateral de miembro anterior; Str. Tail: Straub tail; Inmov: inmovilidad.

	Tiempo de crisis (seg)	Tipo de crisis máxima
5-FU 30 mg/kg	20	Clonus unilat. miembro ant.
	28	Clonus unilat. miembro ant.
	18	Str. tail
	17	Str. tail
	19	Clonus unilat. miembro ant.
	39	Clonus unilat. miembro ant.
5-FU 100 mg/kg	15	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	92	Clonus miembros ant. – Str. tail
	79	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	44	Str. tail
	148	Str. tail
LEV 30 mg/kg	150	Inmov.
	8	Str. tail
	30	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	7	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	5	Clonus unilat. miembro ant.
	12	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	13	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
Control SF*	102	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	21	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	207	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	15	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	114	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	84	Clonus miembros ant. – Str. tail



**Tabla 6.21** Resultados obtenidos con 5-FU a 4 horas, evaluada a ambas dosis. \*Control SF inyectado a 10 ml/kg. Clonus unilat. miembro ant.: clonus unilateral de miembro anterior; Str. Tail: Straub tail; Inmov: inmovilidad.

	Tiempo de crisis (seg)	Tipo de crisis máxima
5-FU 30 mg/kg	12	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	109	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	17	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	47	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	39	Str. tail - Inmov
	33	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
5-FU 100 mg/kg	172	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	23	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	140	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	194	Str. tail - Inmov
	21	Str. tail
	163	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
LEV 30 mg/kg	140	Inmov.
	14	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	14	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	16	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	12	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	8	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
Control SF*	140	Str. Tail - Inmov
	88	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	191	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	140	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	144	Str. tail - Inmov

Si se comparan estos resultados con los tratamientos con PZP y TFP, puede notarse que en los grupos de animales tratados con 5-FU las observaciones presentan





mayor variabilidad intragrupo. Por otra parte, los animales en general presentaron crisis con signos más marcados.

De igual manera que con las otras drogas, se procedió a realizar el análisis de la variable “tiempo” mediante la prueba de Kruskal-Wallis, cuyos resultados se muestran en las tablas 6.22 y 6.23, con tiempos de pretratamiento de 0,5 hs y 4 hs, con valores del estadístico H de Kruskal-Wallis obtenidos de 12,37 (p-valor = 0,0062) y 11,36 (p-valor = 0,0096), respectivamente. Además, se realizaron los gráficos de *boxplot* representados en las figuras 6.12 y 6.13.

**Tabla 6.22** Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación a 0,5 hs, utilizando ambas dosis de 5-FU. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). D.E: desvío estándar.

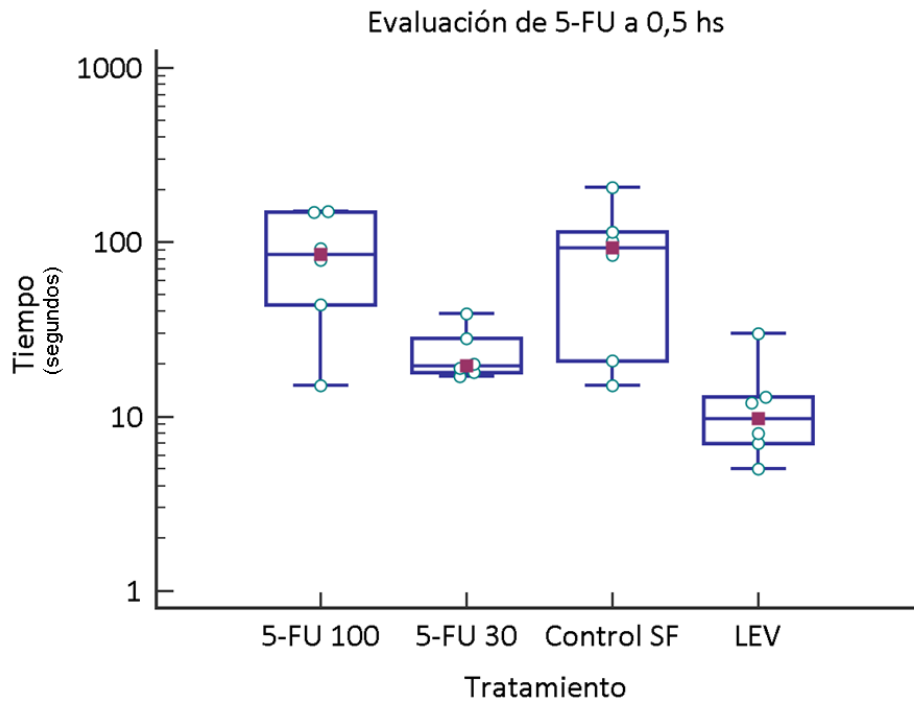
	N	Medias	D.E	Medianas	Rango promedio	
LEV 30 mg/kg	6	12,50	9,09	10,00	4,83	A
5-FU 30 mg/kg	6	23,50	8,55	19,50	11,00	A
5-FU 100 mg/kg	6	88,00	54,42	85,50	17,25	B
Control SF	6	90,50	70,47	93,00	16,92	B

Los valores de las medias, medianas y rango promedio se encuentran expresados en segundos.

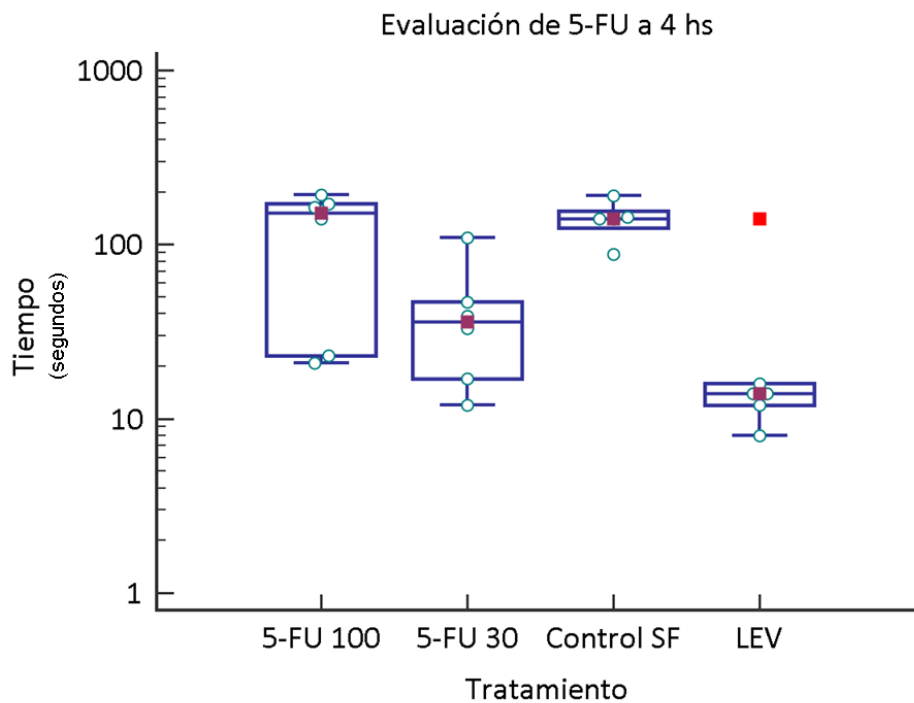
**Tabla 6.23** Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación a 4 hs, utilizando ambas dosis de 5-FU. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). D.E: desvío estándar.

	N	Medias	D.E	Medianas	Rango promedio	
LEV 30 mg/kg	6	34,00	52,00	14,00	5,83	A
5-FU 30 mg/kg	6	42,83	35,00	36,00	9,42	A B
5-FU 100 mg/kg	6	118,83	76,98	151,50	16,25	B
Control SF	5	140,60	36,47	140,00	17,40	B

Los valores de las medias, medianas y rango promedio se encuentran expresados en segundos.



**Figura 6.12** *Boxplot* obtenido con los resultados de la evaluación a 0,5 hs de pretratamiento, utilizando ambas dosis de 5-FU.



**Figura 6.13** *Boxplot* obtenido con los resultados de la evaluación a 4 hs de pretratamiento, utilizando ambas dosis de 5-FU. Nota: el marcador rojo para el tratamiento con LEV denota un outlier.



Los resultados muestran que 5-FU a una dosis de 30 mg/kg se comporta similar a LEV, pero distinto a los controles con SF y a 5-FU a una dosis de 100 mg/kg, para un tiempo de pretratamiento de 0,5 hs. Cuando se administra a los animales con un tiempo de pretratamiento de 4 hs, 5-FU a dosis de 30 mg/kg no difiere significativamente de LEV, pero tampoco de los controles de SF ni de 5-FU a dosis de 100 mg/kg. Esto condujo a realizar un ensayo adicional evaluando 5-FU a 0,5 hs, utilizando una dosis de 60 mg/kg. Los resultados del ensayo experimental se presentan en la tabla 6.24 y los obtenidos a través del análisis empleando la prueba de Kruskal-Wallis, en la tabla 6.25.

**Tabla 6.24** Resultados obtenidos con 5-FU a 0,5 horas, evaluada a una dosis de 60 mg/kg. \*Control SF inyectado a 10 ml/kg. Clonus unilat. miembro ant.: clonus unilateral de miembro anterior; Str. Tail: Straub tail; Inmov: inmovilidad.

	Tiempo de crisis (seg)	Tipo de crisis máxima
5-FU 60 mg/kg	26	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	22	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	15	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	22	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	15	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	23	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
LEV 30 mg/kg	9	-
	10	-
	17	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	10	Clonus unilat. miembro ant.
	10	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	16	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
Control SF*	19	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	94	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	21	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	53	Clonus unilat. miembro ant. – Str. tail
	73	Clonus unilat. miembro ant.
	77	Str. tail

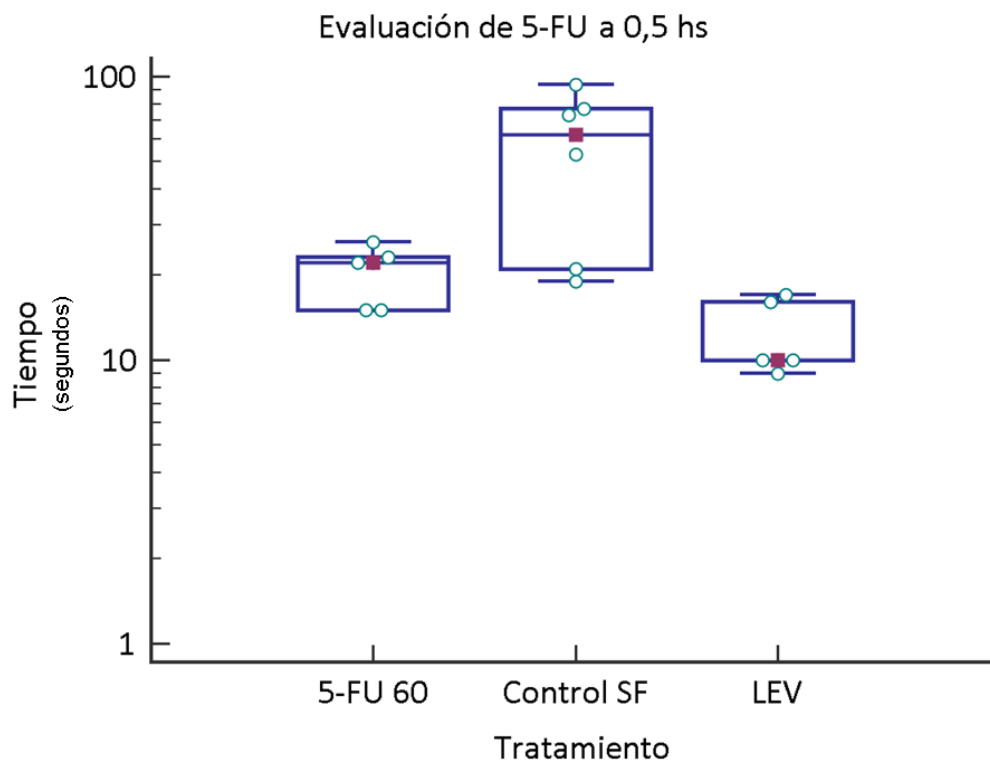


**Tabla 6.25** Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación a 0,5 hs, utilizando una dosis de 60 mg/kg de 5-FU. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). D.E: desvío estándar.

	N	Medias	D.E	Medianas	Rango promedio	
LEV 30 mg/kg	6	12,00	3,52	10,00	4,17	A
5-FU 60 mg/kg	6	20,50	4,51	22,00	10,17	A
Control SF	6	56,17	30,90	63,00	14,17	B

Los valores de las medias, medianas y rango promedio se encuentran expresados en segundos.

El valor del estadístico H no paramétrico fue de 10,67 ( $p$ -valor = 0,00467). El tratamiento con 5-FU 60 mg/kg no difiere significativamente del tratamiento con LEV, mientras que sí lo hace del tratamiento control con SF. Se obtuvo el diagrama *boxplot*, el cual se presenta en la figura 6.14.



**Figura 6.14** *Boxplot* obtenido con los resultados de la evaluación a 0,5 hs de pretratamiento, utilizando una dosis de 60 mg/kg de 5-FU.



Como conclusión, se puede inferir que el tratamiento con 5-FU presenta resultados significativos respecto a la protección de los animales frente al modelo de crisis de 6 Hz.

De acuerdo con el comportamiento farmacocinético de 5-FU, el cual presenta una velocidad de eliminación bastante elevada (semivida de eliminación de 10 – 20 minutos en humanos) (**Jacobs et al., 2019; Sakai et al., 2020**), se puede observar que a 0,5 hs el fármaco presentó actividad anticonvulsiva a dosis de 30 mg/kg y 60 mg/kg; sin embargo, esa actividad no es significativa a un tiempo de 4 hs, donde posiblemente la cantidad remanente de fármaco en sangre corresponde a niveles subeficaces. La respuesta bifásica en modelos animales de crisis epiléptica no es especialmente llamativa, teniendo en cuenta que se ha reportado que muchos FAEs de uso clínico de primera generación, tales como fenitoína o carbamazepina, también muestran actividad anticonvulsivante a dosis bajas y actividad proconvulsivante a dosis elevadas (**Löscher, 1991; Barton et al., 2001**).

### 6.8.3. Ensayo MES

PZP, TFP y 5-FU fueron evaluadas en el ensayo MES. Los resultados se muestran en la tabla 6.26, reportados como número de animales protegidos sobre el total de animales evaluados.

Tal como se observa en la tabla, PZP 30 mg/kg presentó actividad anticonvulsiva frente al ensayo MES, demostrando 100% y 50% de actividad a un tiempo de 0,5 hs y 4 hs, respectivamente. En cuanto a PZP 100 mg/kg, protegió al 50% de los animales a un tiempo de 0,5 hs. Por su parte, 5-FU sólo presentó actividad administrada a una dosis de 100 mg/kg con un tiempo de pretratamiento de 0,5hs. TFP no presentó actividad alguna frente al mencionado ensayo. En el caso de los controles, se reportan el total de animales utilizados en los tres ensayos.



**Tabla 6.26** Resultados obtenidos en el ensayo MES para las drogas seleccionadas.

	Tiempo de pretratamiento		
	0,5 hs	2 h	4 hs
PZP 30 mg/kg	2/2	-	1/2
PZP 100 mg/kg	1/2	-	0/2
TFP 0,1 mg/kg	0/2	-	0/2
TFP 1 mg/kg	2/2	-	0/2
5-FU 30 mg/kg	0/2	-	0/2
5-FU 100 mg/kg	1/2	-	0/2
PHT 15 mg/kg	-	6/6	-
Control SF	0/6	-	0/6

#### 6.8.4. Ensayo PTZsc

PZP, TFP y 5-FU fueron evaluadas en el ensayo PTZsc. Los resultados se muestran en la tabla 6.27, reportados como número de animales protegidos sobre el total de animales evaluados. En este caso, ninguno de los tratamientos utilizados reportó actividad frente al ensayo de PTZsc. Los controles se reportaron como el número de animales protegidos respecto al número total de animales empleados en los tres ensayos.



**Tabla 6.27** Resultados obtenidos en el ensayo PTZ para las drogas seleccionadas.

	Tiempo de pretratamiento	
	0,5 hs	4 hs
PZP 30 mg/kg	0/2	0/2
PZP 100 mg/kg	0/2	0/2
TFP 0,1 mg/kg	0/2	0/2
TFP 1 mg/kg	0/2	0/2
5-FU 30 mg/kg	0/2	0/2
5-FU 100 mg/kg	0/2	0/2
PB 25 mg/kg	6/6	-
Control SF	0/6	0/6

## 6.9. Referencias

Ahsan, M. J., Khalilullah, H., Stables, J. P., *et al.* (2013) 'Synthesis and anticonvulsant activity of 3a,4-dihydro-3H-indeno[1,2-c] pyrazole-2-carboxamide/carbothioamide analogues', *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(3), pp. 644–650. doi: 10.3109/14756366.2012.663364.

Ahsan, M. J., Khalilullah, H., Yasmin, S., *et al.* (2013) 'Synthesis and anticonvulsant evaluation of 2-(substituted benzylidene/ethylidene)-N-(substituted phenyl)hydrazinecarboxamide analogues', *Medicinal Chemistry Research*, 22(6), pp. 2746–2754. doi: 10.1007/s00044-012-0271-z.

Baek, I. H. *et al.* (2013) 'Pharmacokinetic analysis of doxifluridine and its metabolites, 5-fluorouracil and 5-fluorouridine, after oral administration in beagle dogs', *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. Springer, 38(4), pp. 295–299. doi: 10.1007/s13318-013-0130-4.

Barton, M. E. *et al.* (2001) 'Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy', *Epilepsy Research*, 47(3), pp. 217–227. doi: 10.1016/S0920-1211(01)00302-3.

Buenafe, O. E. *et al.* (2013) 'Tanshinone IIA exhibits anticonvulsant activity in zebrafish and mouse seizure models', *ACS Chemical Neuroscience*, 4(11), pp. 1479–1487. doi: 10.1021/cn400140e.

Byrtus, H. *et al.* (2011) 'Synthesis and anticonvulsant activity of new N-Mannich bases derived from 5-cyclopropyl-5-phenyl- and 5-cyclopropyl-5-(4-chlorophenyl)-imidazolidine-2,4-diones',



*Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(20), pp. 6149–6156. doi: 10.1016/j.bmc.2011.08.017.

Coleman, N. *et al.* (2015) 'The Riluzole Derivative 2-Amino-6-trifluoromethylthio-benzothiazole (SKA-19), a Mixed KCa2 Activator and NaV Blocker, is a Potent Novel Anticonvulsant', *Neurotherapeutics*, 12(1), pp. 234–249. doi: 10.1007/s13311-014-0305-y.

Daho, M. E. H. and Chikh, M. A. (2015) 'Combining Bootstrapping Samples, Random Subspaces and Random Forests to Build Classifiers', *Journal of Medical Imaging and Health Informatics*, 5(3), pp. 539to – 544. doi: 10.1166/jmihi.2015.1423.

Dawidowski, M. *et al.* (2011) 'Synthesis and anticonvulsant activity of novel 2,6-diketopiperazine derivatives. Part 1: Perhydropyrrole[1,2-a]pyrazines', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), pp. 4859–4869. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.07.027.

Dawidowski, M. *et al.* (2013) 'Structure-activity relationships of the aromatic site in novel anticonvulsant pyrrolo[1,2-a]pyrazine derivatives', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd, 23(22), pp. 6106–6110. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.09.022.

Dawidowski, M., Lewandowski, W. and Turo, J. (2014) 'Synthesis of new perhydropyrrolo[1,2-A]pyrazine derivatives and their evaluation in animal models of epilepsy', *Molecules*, 19(10), pp. 15955–15981. doi: 10.3390/molecules191015955.

Dawidowski, M. and Turło, J. (2014) 'Multicomponent synthesis and anticonvulsant activity of monocyclic 2,6-diketopiperazine derivatives', *Medicinal Chemistry Research*, 23(4), pp. 2007–2018. doi: 10.1007/s00044-013-0800-4.

Deng, X.-Q. *et al.* (2014) 'Synthesis and Anticonvulsant Evaluation of some New 6-(Substituted-phenyl)thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole Derivatives in Mice', *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, 13(2), p. 459.

Florek-Luszczki, M., Wlaz, A. and Luszczki, J. J. (2014) 'Interactions of levetiracetam with carbamazepine, phenytoin, topiramate and vigabatrin in the mouse 6 Hz psychomotor seizure model - A type II isobolographic analysis', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 723(1), pp. 410–418. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.063.

Gasior, M. *et al.* (2012) 'Clavulanic acid does not affect convulsions in acute seizure tests in mice', *Journal of Neural Transmission*, 119(1), pp. 1–6. doi: 10.1007/s00702-011-0662-1.

Gunia-Krzyżak, A. *et al.* (2017) 'Structure-anticonvulsant activity studies in the group of (E)-N-cinnamoyl aminoalkanols derivatives monosubstituted in phenyl ring with 4-Cl, 4-CH<sub>3</sub> or 2-CH<sub>3</sub>', *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(2), pp. 471–482. doi: 10.1016/j.bmc.2016.11.014.

Hebeisen, S. *et al.* (2015) 'Eslicarbazepine and the enhancement of slow inactivation of voltage-gated sodium channels: A comparison with carbamazepine, oxcarbazepine and lacosamide', *Neuropharmacology*, 89, pp. 122–135. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.09.008.

Jacobs, B. A. W. *et al.* (2019) 'Pharmacokinetics of Capecitabine and Four Metabolites in a Heterogeneous Population of Cancer Patients: A Comprehensive Analysis', *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 8(12), pp. 940–950. doi: 10.1002/psp4.12474.

Kamiński, K., Wiklik, B. and Obniska, J. (2014) 'Synthesis, anticonvulsant properties, and sar analysis of differently substituted pyrrolidine-2,5-diones and piperidine-2,6-diones', *Archiv der Pharmazie*, 347(11), pp. 840–852. doi: 10.1002/ardp.201400179.





- Kamiński, K., Wiklik, B. and Obniska, J. (2015) 'Synthesis and anticonvulsant activity of new N-phenyl-2-(4-phenylpiperazin-1-yl)acetamide derivatives', *Medicinal Chemistry Research*, 24(7), pp. 3047–3061. doi: 10.1007/s00044-015-1360-6.
- Kumar, D. *et al.* (2013) 'Design, synthesis and anticonvulsant activity of some new 5,7-dibromoisatin semicarbazone derivatives', *EXCLI Journal*. Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, 12, p. 628.
- Kumar, P. *et al.* (2012) 'Design, synthesis, and anticonvulsant evaluation of some novel 1, 3 benzothiazol-2-yl hydrazones/acetohydrazones', *Medicinal Chemistry Research*, 21(9), pp. 2428–2442. doi: 10.1007/s00044-011-9768-0.
- Löscher, W. *et al.* (1991) 'The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models', *Epilepsy Research*, 8(3), pp. 171–189. doi: 10.1016/0920-1211(91)90062-K.
- Mishra, R. K. and Baker, M. T. (2012) 'Ortho Substituent effects on the anticonvulsant properties of 4-hydroxy-trifluoroethyl phenols', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd, 22(17), pp. 5608–5611. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.07.001.
- Nahm, F. S. (2016) 'Nonparametric statistical tests for the continuous data: the basic concept and the practical use', *Korean Journal of Anesthesiology*, 69(1), p. 8. doi: 10.4097/kjae.2016.69.1.8.
- Nieoczym, D. *et al.* (2013) 'Effect of sildenafil, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor, on the anticonvulsant action of some antiepileptic drugs in the mouse 6-Hz psychomotor seizure model', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 47, pp. 104–110. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.08.009.
- Obniska, J. *et al.* (2012) 'Synthesis, anticonvulsant activity and 5-HT<sub>1A</sub>/5-HT<sub>7</sub> receptors affinity of 1-[(4-arylpiperazin-1-yl)-propyl]-succinimides', *Pharmacological Reports*, 64(2), pp. 326–335. doi: 10.1016/S1734-1140(12)70772-7.
- Orellana-Paucar, A. M. *et al.* (2013) 'Insights from zebrafish and mouse models on the activity and safety of ar-turmerone as a potential drug candidate for the treatment of epilepsy', *PLoS ONE*, 8(12), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0081634.
- Perez-Llamas, C. and Lopez-Bigas, N. (2011) 'Gitoools: Analysis and Visualisation of Genomic Data Using Interactive Heat-Maps', *PLoS ONE*. Edited by S. Aerts, 6(5), p. e19541. doi: 10.1371/journal.pone.0019541.
- Rivara, M. and Zuliani, V. (2012) 'In vivo screening of diarylimidazoles as anticonvulsant agents', *Medicinal Chemistry Research*, 21(11), pp. 3428–3434. doi: 10.1007/s00044-011-9869-9.
- Roy, K. and Mitra, I. (2011) 'On various metrics used for validation of predictive QSAR models with applications in virtual screening and focused library design.', *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 14(6), pp. 450–74. doi: 10.2174/138620711795767893.
- Sakai, S. *et al.* (2020) 'Assessment of pharmacokinetic variations of capecitabine after multiple administration in rats: a physiologically based pharmacokinetic model', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 85(5), pp. 869–880. doi: 10.1007/s00280-020-04057-5.
- Śałat, K. *et al.* (2017) 'Novel, highly potent and in vivo active inhibitor of GABA transporter



subtype 1 with anticonvulsant, anxiolytic, antidepressant and antinociceptive properties', *Neuropharmacology*, 113, pp. 331–342. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.10.019.

Shaikh, M. F., Tan, K. N. and Borges, K. (2013) 'Anticonvulsant screening of luteolin in four mouse seizure models', *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 550, pp. 195–199. doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.065.

Shandra, A. *et al.* (2013) 'Synergism of lacosamide with established antiepileptic drugs in the 6-Hz seizure model in mice', *Epilepsia*, 54(7), pp. 1167–1175. doi: 10.1111/epi.12237.

Shekh-Ahmad, T. *et al.* (2014) 'Enantioselective pharmacodynamic and pharmacokinetic analysis of two chiral CNS-active carbamate derivatives of valproic acid', *Epilepsia*, 55(12), pp. 1944–1952. doi: 10.1111/epi.12857.

Tomaciello, F., Leclercq, K. and Kaminski, R. M. (2016) 'Resveratrol lacks protective activity against acute seizures in mouse models', *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 632, pp. 199–203. doi: 10.1016/j.neulet.2016.09.002.

Toropova, A. P. and Toropov, A. A. (2017) 'CORAL: Binary classifications (active/inactive) for drug-induced liver injury', *Toxicology Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 268, pp. 51–57. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.01.011.

Tosh, D. K. *et al.* (2012) 'Structural sweet spot for A1 adenosine receptor activation by truncated (N)-methanocarba nucleosides: Receptor docking and potent anticonvulsant activity', *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(18), pp. 8075–8090. doi: 10.1021/jm300965a.

Tripathi, L. and Kumar, P. (2013) 'Augmentation of GABAergic neurotransmission by novel N-(substituted)-2-[4-(substituted)benzylidene]hydrazinocarbothioamides - A potential anticonvulsant approach', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 64, pp. 477–487. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.04.019.

Truchon, J.-F. and Bayly, C. I. (2007) 'Evaluating Virtual Screening Methods: Good and Bad Metrics for the "Early Recognition" Problem', *J. Chem. Inf. Model*, 47(2), pp. 488–508. doi: 10.1021/ci600426e.

Ugale, V. G. and Bari, S. B. (2016) 'Structural Exploration of Quinazolin-4(3H)-ones as Anticonvulsants: Rational Design, Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Molecular Docking Studies', *Archiv der Pharmazie*, 349(11), pp. 864–880. doi: 10.1002/ardp.201600218.

Ulloora, S. *et al.* (2013) 'Synthesis, anticonvulsant and anti-inflammatory studies of new 1,4-dihydropyridin-4-yl-phenoxyacetohydrazones', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 70, pp. 341–349. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.10.010.

Vyškovský, R. *et al.* (2016) 'Random Subspace Ensemble Artificial Neural Networks for First-episode Schizophrenia Classification', in *Proceedings of the 2016 Federated Conference on Computer Science and Information Systems*, pp. 317–321. doi: 10.15439/2016F333.

Wang, D. D. *et al.* (2012) 'Minocycline- and tetracycline-class antibiotics are protective against partial seizures in vivo.', *Epilepsy & behavior: E&B*. Elsevier B.V., 24(3), pp. 314–318. doi: 10.1016/j.yebeh.2012.03.035.

Wlaz, A. *et al.* (2015) 'Synergistic interaction of levetiracetam with gabapentin in the mouse 6 Hz psychomotor seizure model – a type II isobolographic analysis', *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 28(3), pp. 204–207. doi: 10.1515/cipms-2015-0073.



Zolkowska, D. *et al.* (2014) 'Anticonvulsant potencies of the enantiomers of the neurosteroids androsterone and etiocholanolone exceed those of the natural forms', *Psychopharmacology*, 231(17), pp. 3325–3332. doi: 10.1007/s00213-014-3546-x.



# CAPÍTULO 7

## CONCLUSIONES





## Capítulo 7: Conclusiones

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, se construyeron modelos lineales basados en el ligando, capaces de discriminar entre compuestos activos e inactivos en el modelo de crisis de 6 Hz, uno de los modelos incluidos en el screening primario del Programa ETSP. Dado que los modelos individuales no demostraron una capacidad predictiva enteramente satisfactoria, se generó un ensamble con los mejores modelos clasificatorios, según se comenta en los párrafos que siguen, y el mismo se aplicó en una campaña prospectiva de SV sobre las bases de datos DrugBank 5.0 y SweetLead. A partir de ello, priorizando costos y accesibilidad, fueron seleccionados tres compuestos para la validación experimental de las predicciones del modelo, evaluándose en el modelo animal de crisis de 6 Hz.

Un primer punto que vale la pena señalar es el tamaño limitado del set de datos compilado a partir de una búsqueda bibliográfica inicial (tan sólo 90 compuestos en total). Sin embargo, la notable diversidad molecular del set de datos, sumada a la estrategia de muestreo representativo basado en agrupamiento, condujeron a modelos con un dominio de aplicación amplio, compatible con su aplicación al cribado de grandes bibliotecas químicas.

A partir de esta base de datos, se obtuvieron 1.000 modelos clasificatorios lineales, basados en descriptores independientes de la conformación, de bajo costo computacional y alta reproducibilidad en su cálculo. Según los resultados de las instancias de validación *in silico*, sin embargo, los modelos no demostraron, de manera individual, una capacidad predictiva adecuada. Esto podría estar vinculado a la complejidad de la respuesta modelada (que es, en definitiva, una respuesta biológica en un modelo *in vivo*, que depende de factores múltiples, tales como la farmacocinética de los compuestos evaluados o la interacción de estos con múltiples blancos moleculares). Por poner un ejemplo, se ha demostrado que el levetiracetam interactúa simultáneamente y con similar afinidad, con SV2A y con canales iónicos operados por voltaje). La heterogeneidad de los datos experimentales y la complejidad de la respuesta



justifican el uso de modelos clasificadores, por un lado, y de técnicas de modelado más complejas, tales como el aprendizaje por ensamblado.

El desempeño de los modelos individuales fue mejorado mediante el empleo de técnicas de ensamblado, según surge de las métricas de enriquecimiento calculadas en las campañas de cribado retrospectivo. La combinación de los 29 mejores modelos individuales mediante el operador MINIMO presentó los mejores valores de enriquecimiento. Para la selección del valor de un valor de corte óptimo del *score* del ensamble, se analizaron los gráficos de superficie de PPV (una técnica desarrollada en nuestro grupo de trabajo), seleccionando un valor que maximice el Valor Predictivo Positivo. Se seleccionó un valor de corte asociado a un PPV de 44,10 para un rendimiento de activos de 0,01; según este análisis teórico, sería necesario evaluar 44 *hits* para que uno de ellos confirme la actividad predicha en el ensayo experimental.

Esta combinación de modelos se aplicó en el SV de las bases de datos DrugBank 5.0 y SweetLead para la selección de potenciales candidatos activos frente al modelo de crisis de 6 Hz. Los resultados arrojaron un total de 57 compuestos con valores de *score* por encima del valor de corte seleccionado, de los cuales sólo 28 corresponden a fármacos aprobados. Con excepción de 3 compuestos, los *hits* pertenecían invariablemente al dominio de aplicación del modelo, lo que sugiere que, pese al tamaño limitado del set de datos, la diversidad molecular del mismo y la estrategia de muestreo representativo resultaron en modelos con un dominio de aplicación amplio. De acuerdo con el costo y accesibilidad, se adquirieron 3 compuestos: triflupromazina (TFZ), pirenzepina (PZP) y 5-fluorouracilo (5-FU), a fin de validar experimentalmente la capacidad predictiva de nuestro protocolo de cribado.

Ninguno de los *hits* evaluados presentó neurotoxicidad (ataxia o sedación) en el ensayo del Rotorod. Al analizar los resultados de las evaluaciones en el modelo animal de crisis de 6 Hz, se demostró que uno de los tres *hits* evaluados, 5-FU, demostró actividad anticonvulsiva. Se pudo observar que a 0,5 hs, este compuesto administrado a 30 mg/kg no difiere significativamente de LEV, mientras que sí lo hace de la dosis de 100 mg/kg y de los controles con SF. A tiempo de 4 hs, la dosis de 30 mg/kg no difiere significativamente de los controles con LEV, pero tampoco difiere de a dosis de 100



mg/kg ni de los controles con SF. Estos resultados sugirieron que 5-FU tiende a presentar efectos anticonvulsivos, por lo que se realizó un ensayo adicional a una dosis de 60 mg/kg a 0,5 hs. De allí, se obtuvo que el compuesto no difiere significativamente del LEV, mientras que presentó diferencias significativas con la administración con SF.

Como analizamos en el Capítulo 6, si bien 5-FU presenta perfiles farmacocinéticos y de seguridad desfavorables, nos fue de utilidad para demostrar experimentalmente la validez de la combinación de modelos *in silico* para seleccionar candidatos frente al modelo de crisis de 6Hz, y eventualmente podría servir como andamiaje estructural novedoso para el diseño de análogos con perfiles de seguridad y farmacocinético adecuados.

Con respecto a los resultados experimentales obtenidos con PZP, puede observarse que la media de la duración de la convulsión para el control positivo (LEV) es la más baja a ambos tiempos de pretratamiento, mientras que la media para el control negativo (SF) presenta el comportamiento opuesto (es la más alta de todos los grupos). Los valores para PZP, sin diferir estadísticamente de ninguno de los dos controles, se encuentran contenidos entre ambos extremos. Esto es, cuando se administra PZP a dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg la duración de la crisis pareciera asimilarse a la duración de crisis con LEV (aunque no sea tan efectivo), pero sin diferir significativamente del comportamiento con SF. Asimismo, cuando se administra PZP a una dosis de 60 mg/kg, la media obtenida difiere significativamente de ambos controles, presentando un comportamiento comprendido entre ambos extremos.

Finalmente, al analizar los resultados experimentales, se observa que la predicción teórica basada en el SV retrospectivo (44%) se aproxima muy bien a la que observamos en la validación experimental del screening prospectivo (33%, correspondiente a un *hit* confirmado experimentalmente (5-FU) de tres compuestos analizados, o 66% si consideramos la leve tendencia a proteger de PZP) y teniendo en cuenta además, que por cuestiones de disponibilidad de recursos trabajamos con un número de *hits* validados pequeño; consideramos que los resultados de la campaña de SV han sido muy satisfactorios.





Como mencionamos en el Capítulo 4, estas metodologías han sido a la fecha escasamente exploradas y explotadas en el campo de la epilepsia y destacamos como conclusión general del trabajo de tesis la importancia de utilizar metodologías como el cribado virtual y el reposicionamiento de fármacos asistido por computadoras, las cuales son aproximaciones útiles para abordar de manera sistemática la búsqueda de nuevos usos terapéuticos de fármacos aprobados e incluso fármacos discontinuados o abandonados.

## Publicaciones, Congresos y Becas

Durante el trabajo de tesis doctoral se realizaron 9 presentaciones a congresos (2 nacionales y 7 internacionales) y 6 publicaciones en revistas científicas con referato.

En el año 2016 se obtuvo una beca de IBRO LARC Travel Grant Program de la International Brain Research Organization (IBRO) y otra beca de la International League Against Epilepsy (ILAE) para asistir al IX Congreso Latinoamericano de Epilepsia en Cancún, México. En el año 2017, la ILAE otorgó una beca de asistencia y alojamiento para concurrir a XII Latin American Summer School on Epilepsy (LASSE) en San Pablo, Brasil. En el año 2019 se obtuvo por concurso un subsidio de jóvenes investigadores de la Universidad Nacional de La Plata.

A continuación, se detallan las publicaciones realizadas durante el transcurso del trabajo de tesis;

1.- Morales JF, Chuguransky S, Alberca LN, Alice JI, Goicoechea S, Ruiz ME, Bellera CL, Talevi A. Positivity Predictive Value surfaces as a complementary tool to assess the performance of virtual screening methods. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2020 (In press). doi: 10.2174/1871525718666200219130229.

2.- Goicoechea S, Sbaraglini ML, Chuguransky SR, Morales JF, Ruiz ME, Talevi A, Bellera CL. Application of Machine Learning Approaches to Identify New Anticonvulsant Compounds Active in the 6 Hz Seizure Model. *Communications in Computer and Information Science* 2019: 3-11. doi:10.1007/978-3-030-36636-0\_16.-

3.- Enrique AV, Di Ianni ME, Goicoechea S, Lazarowski A, Valle-Dorado MG, López Costa JJ, Rocha L, Girardi E, Talevi A. New anticonvulsant candidates prevent P-glycoprotein (P-gp) overexpression in a pharmaco-resistant seizure model in mice. *Epilepsy & Behavior* 2019:106451. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.106451

4.- Palestro PH, Enrique N, Goicoechea S, Villalba ML, Sabatier LL, Martín P, Milesi V, Bruno Blanch LE, Gavernet L. Searching for New Leads To Treat Epilepsy: Target-Based Virtual Screening for the Discovery of Anticonvulsant Agents. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2018;58(7):1331-1342. doi: 10.1021/acs.jcim.7b00721

5.- Enrique A, Goicoechea S, Castaño R, et al. New model of pharmacoresistant seizures induced by 3-mercaptopropionic acid in mice. *Epilepsy Research* 2017; 129:8-16. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2016.10.012

6.- Villalba ML, Enrique AV, Higgs J, et al. Novel sulfamides and sulfamates derived from amino esters: Synthetic studies and anticonvulsant activity. *European Journal of Pharmacology* 2016; 774:55-63. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.02.001.



# MATERIAL SUPLEMENTARIO

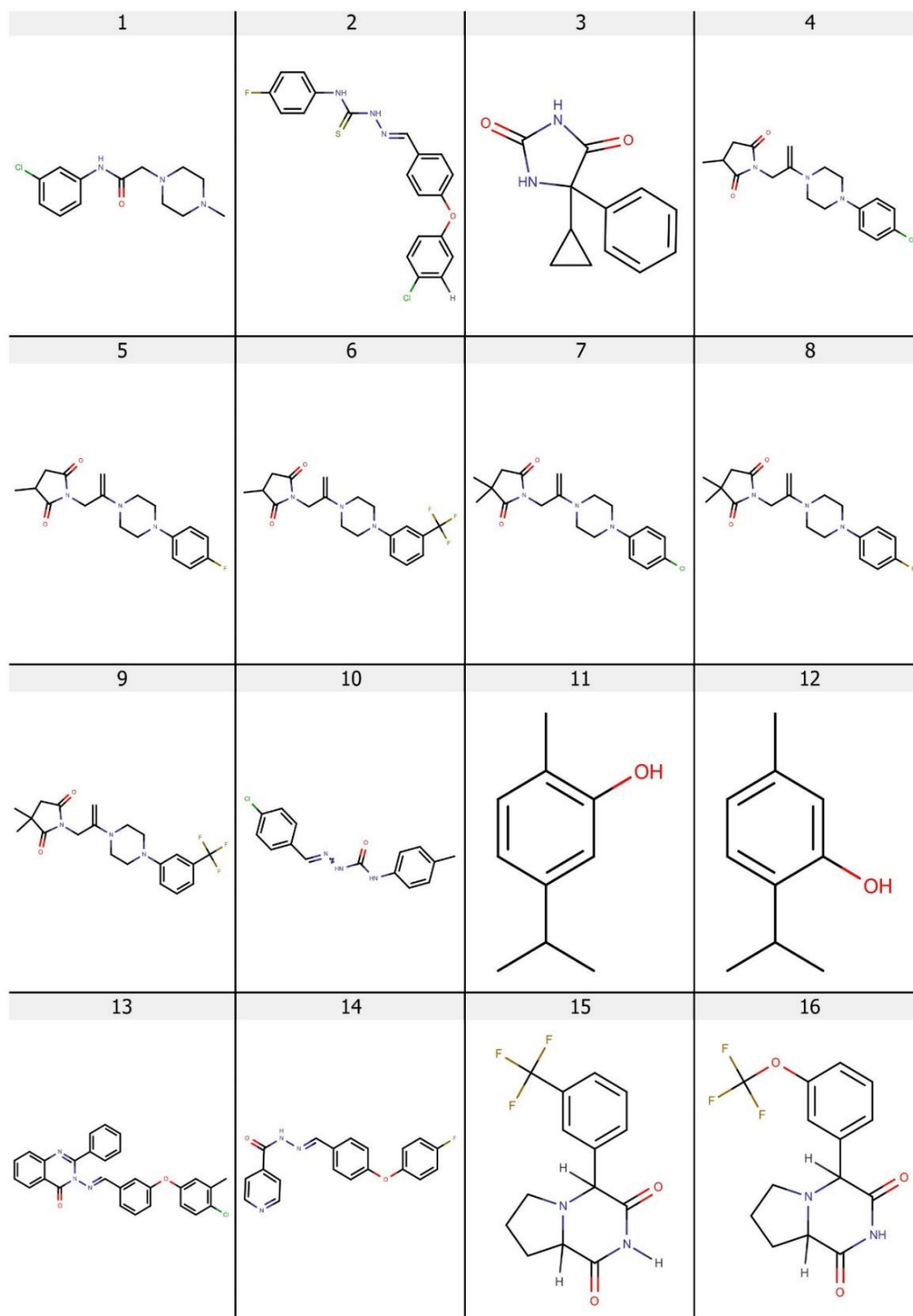




## Material Suplementario

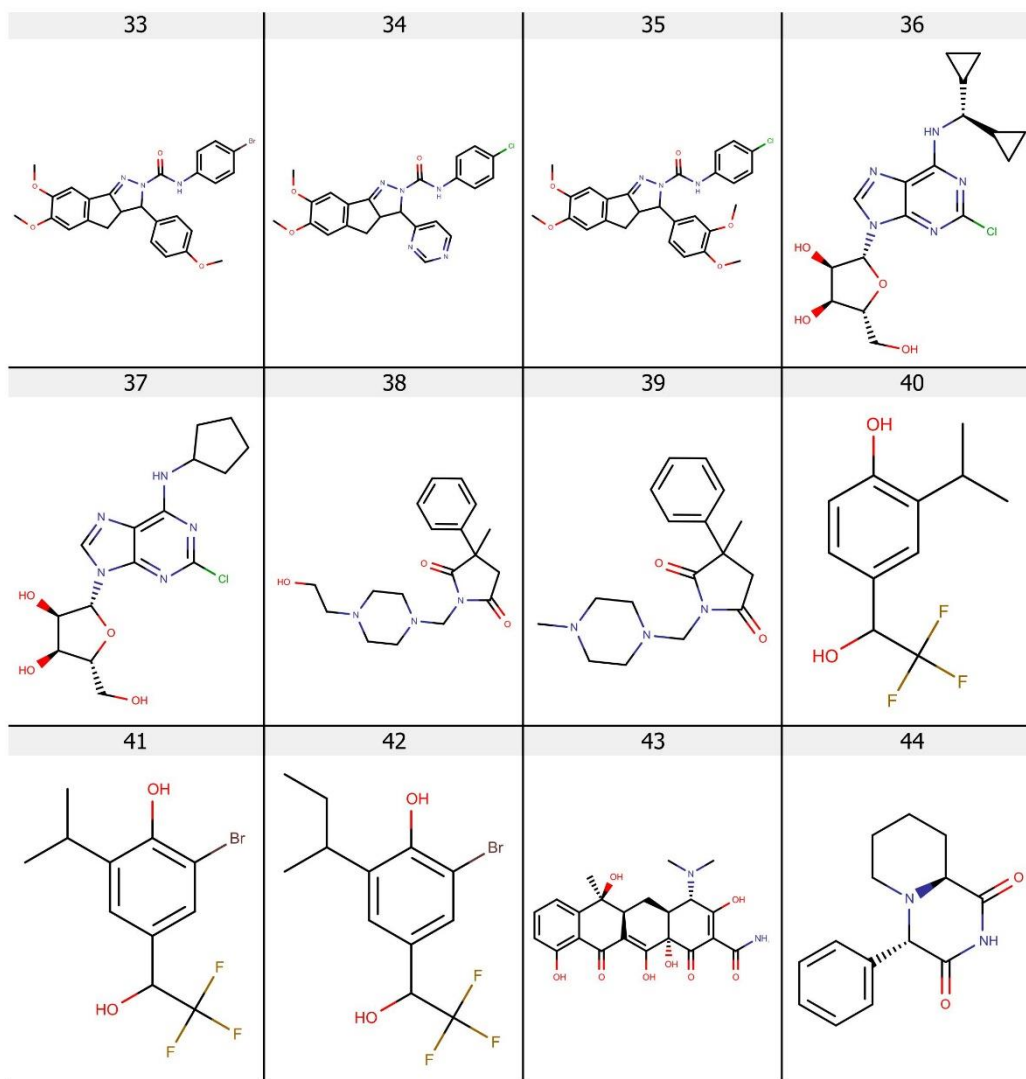
### Anexo 1

#### 1.1. Estructuras de los compuestos activos que conforman la base de datos.





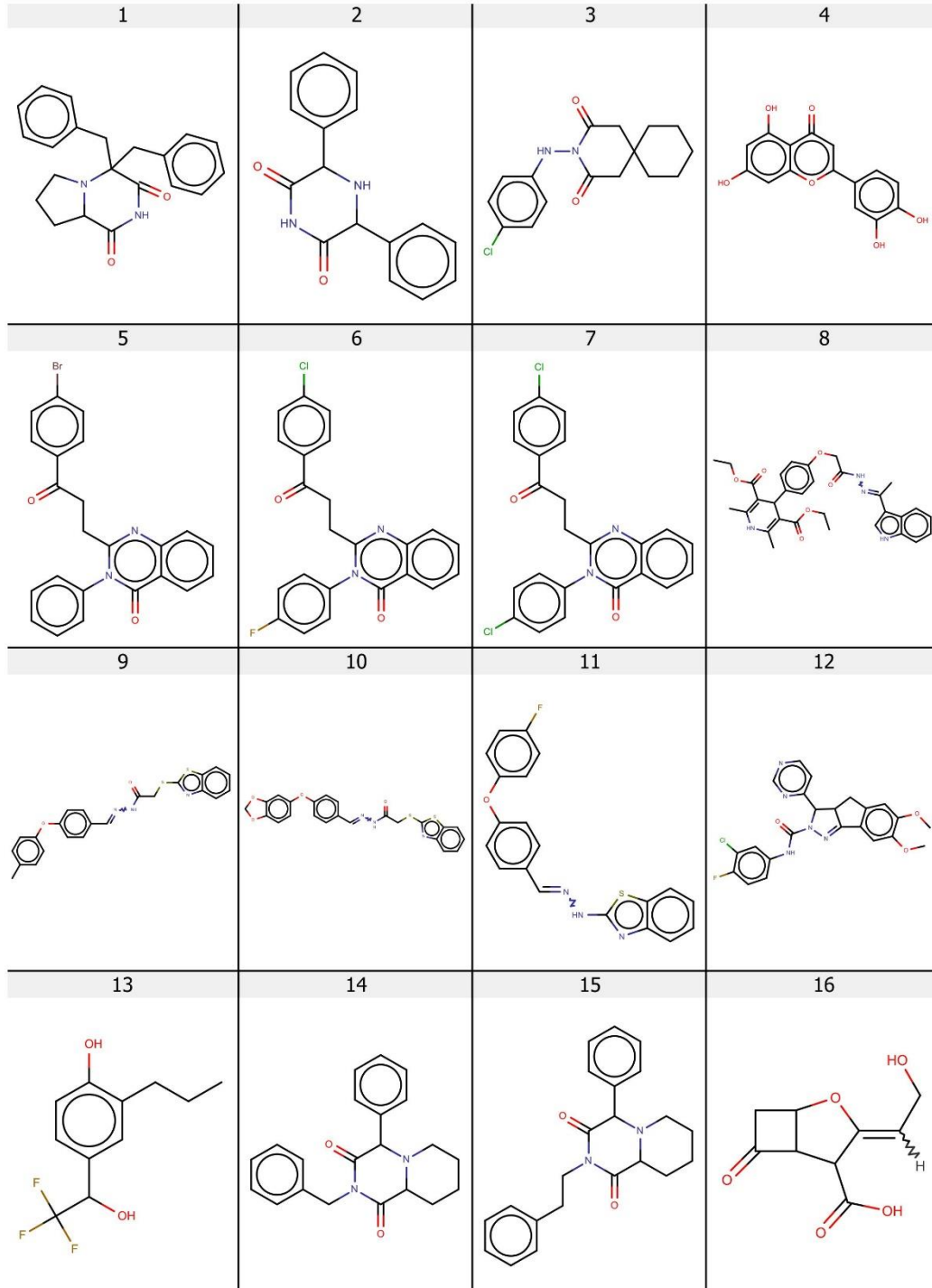
17	18	19	20
21	22	23	24
25	26	27	28
29	30	31	32

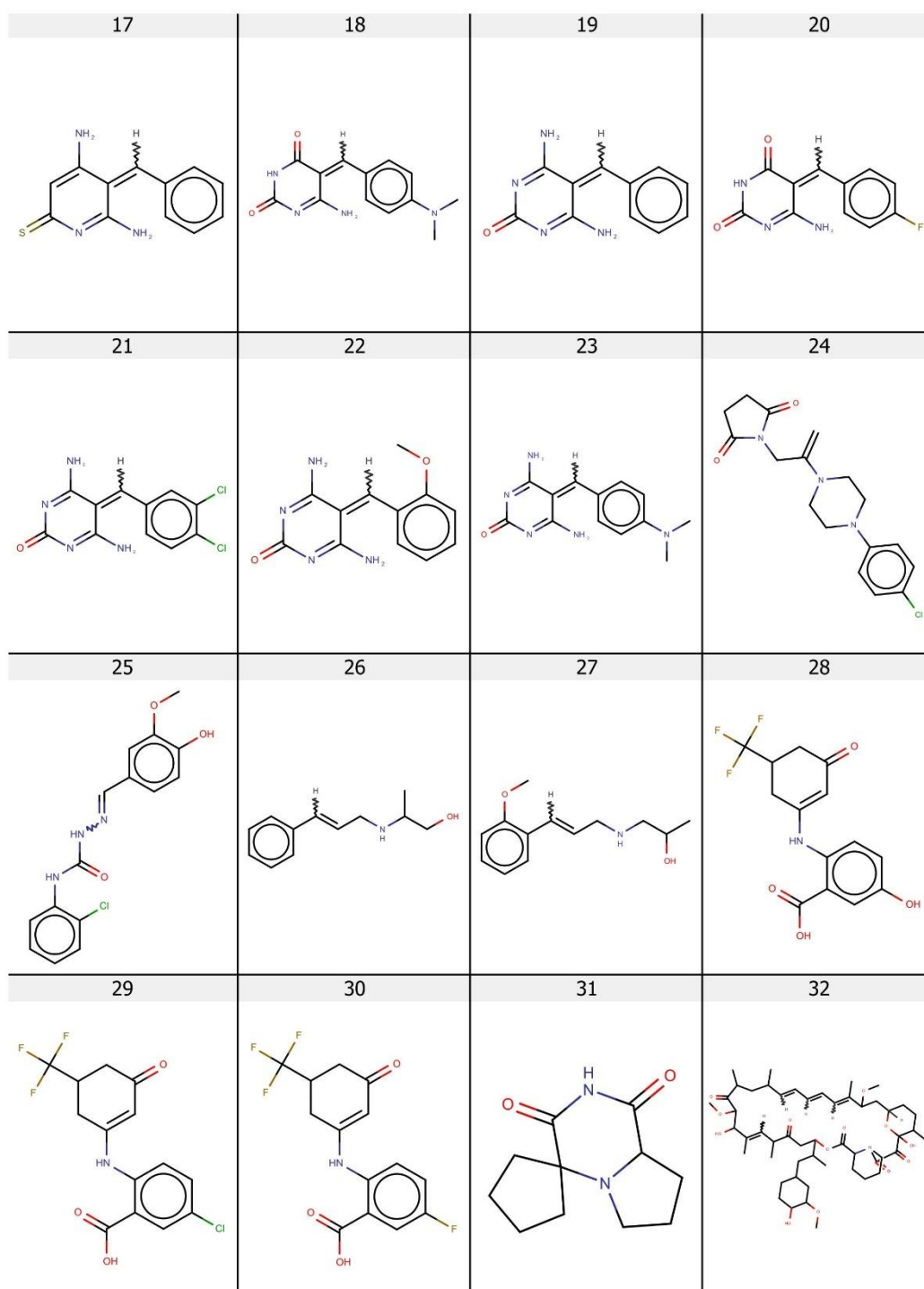





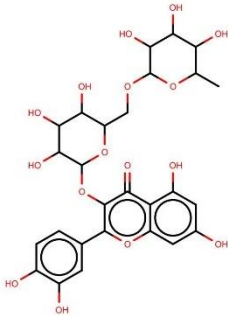
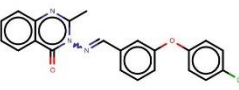
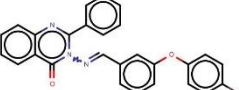
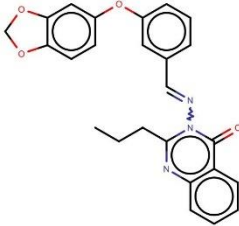
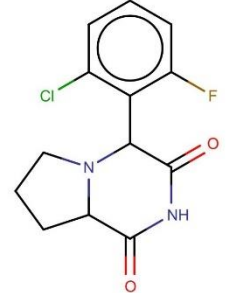
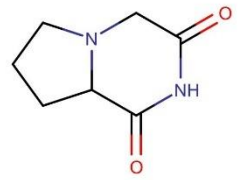
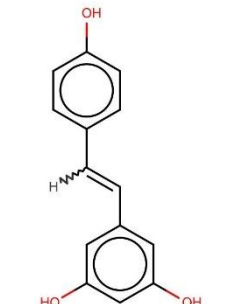
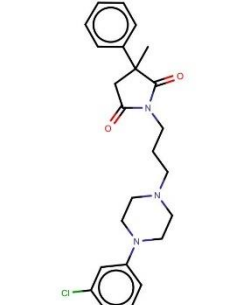
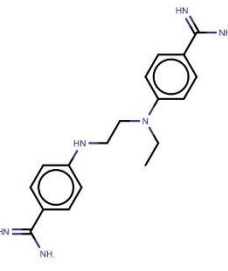
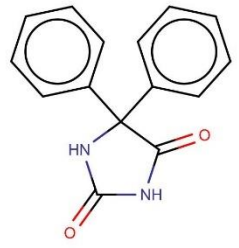
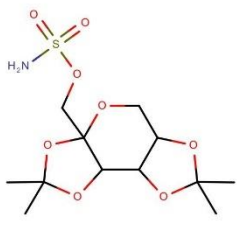
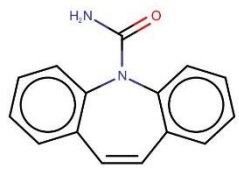
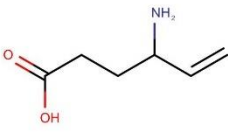


## 1.2. Estructuras de compuestos inactivos que conforman la base de datos.







33 	34 	35 	36 
37 	38 	39 	40 
41 	42 	43 	44 
45 	46 		



## Anexo 2

### Scripts utilizados

En esta sección se presentan los scripts utilizados en este trabajo de tesis.

#### 2.1. Script utilizado para el muestreo de 1.000 subespacios aleatorios de 200 descriptores cada uno

```
conjuntos.descriptores <- function(archivo="Dtraining.csv",conjuntos=1000,
descrip.conjunto=200, semilla=125)
{is.installed <- function(mypkg) { is.element(mypkg, installed.packages()[,1]) }
if (is.installed("data.table") == FALSE) {install.packages("data.table")}
if (is.installed("caret") == FALSE) {install.packages("caret")}
library(data.table)
library(caret)
set.seed(semilla)
df <- as.data.frame(fread(input = archivo, check.names = TRUE))
df <- df[, apply(df, 2, function(x) !any(is.na(x)))]
df <- df[, -nearZeroVar(df)]
n <- conjuntos
j <- c(1:ncol(df))
k <- j[-c(1,2)]
dflist <-list()
for(i in 1:n) {dflist[[i]] <- df[, c(2,sample(k,descrip.conjunto))]}
dflist
```

#### 2.2. Script utilizado para la generación de 1.000 modelos individuales

```
forward.stepwise.testF.lm <- function(tabla.conjunto,punto.corte=0.05,steps=6)
df<- as.data.frame(tabla.conjunto)
null<-lm(clase ~1,data = df, na.action = na.omit)
full<-lm(clase~.,data = df, na.action = na.omit)
repeat {
paso<-add1(null,scope=formula(full),test="F", na.action = na.omit)
menor.probabilidad<-which.min(paso$`Pr(>F)`)
elegido <- noquote(row.names(paso)[menor.probabilidad])
formulacion <- paste(".".~, "+", elegido)
if ( paso$`Pr(>F)`[menor.probabilidad] >= punto.corte ) {
break}
null<-update(null, formula. = formulación)
test <- anova(null)
if (any(test$`Pr(>F)` >= punto.corte, na.rm = TRUE)) {
formulacion2<- paste(".".~, "-",paste(noquote(rownames(test)[which(test$`Pr(>F)`>=
punto.corte)]),collapse = " - "))
null<-update(null, formula. = formulacion2)
if (length(null$coefficients) >= steps + 1)
result <-null
```



result

## 2.3. Script utilizado para la combinación de modelos por el operador mínimo

```
combinacion.modelos.minimo <- function (x = tabla.AUC.ordenadas, cant.modelos = 10,
remove.NA = FALSE) {
is.installed <- function(mypkg) { is.element(mypkg, installed.packages()[,1]) }
if ( is.installed("OptimalCutpoints") == FALSE) {install.packages("OptimalCutpoints")}
if( is.installed("data.table") == FALSE) {install.packages("data.table")}
library(OptimalCutpoints)
library(data.table)
mejores.segun.AUC <- as.numeric(x[c(1:cant.modelos),"modelo"])
lista.mejores.modelos <- lista.modelos[mejores.segun.AUC] lista.predicciones.mejores.modelos
<- lapply( lista.mejores.modelos , predict, type = "response")
tabla.valores.prediccion<-data.frame(matrix(unlist(lista.predicciones.mejores.modelos), nrow=
length(lista.predicciones.mejores.modelos[[1]]), byrow=FALSE))
score.mejor.modelo.individual <- tabla.valores.prediccion[,1]
minimo<-apply(tabla.valores.prediccion,1,min, na.rm= remove.NA)
p <- lista.conjuntos2[[1]]
clase <- p[, "clase"]
q <- factor(clase)
ROC.ensemble.minimo <- roc(predictor = minimo, response = q, direction = "<" , ci = TRUE , auc
= TRUE , conf.level=0.95 , ci.method = "delong", boot.n = 2000, boot.stratified = TRUE,
reuse.auc=TRUE)
AUC.ROC.ensemble.minimo <- ROC.ensemble.minimo$auc[[1]]
int.conf.95.AUC.ROC <- ROC.ensemble.minimo$ci
ROC.mejor.individual<- roc(predictor = score.mejor.modelo.individual, response = q, direction =
"<" , ci = TRUE , auc = TRUE , conf.level=0.95 , ci.method = "delong", boot.n = 2000,
boot.stratified = TRUE, reuse.auc=TRUE)
test.AUC <- roc.test(roc1 = ROC.ensemble.minimo , roc2 = ROC.mejor.individual , method =
"delong" , alternative = "two.sided")
df <- data.frame(cbind(clase,minimo))
punto.corte <- OptimalCutpoints::optimal.cutpoints (X = "minimo", status="clase",
tag.healthy=0, data=df,methods="MaxSp", direction = "<")
punto.corte2 <-
data.frame(OptimalCutpoints::summary.optimal.cutpoints(punto.corte)$p.table$Global$MaxSp)
p["cutoff",]
predicciones <- ifelse( minimo > punto.corte2, yes = 1,no = 0) tabla.bien.mal.clasificados <-
table(predicciones,clase, dnn = c("clase predicha", "clase real"), useNA = "ifany")
bien.clasificados <- predicciones == clase
porcentaje.bien.clasificados <- 100*sum(bien.clasificados, na.rm =
TRUE)/length(bien.clasificados)
resultado.final <- list("AUC de la curva ROC", AUC.ROC.ensemble.minimo,"Int Confianza AUC
ROC" ,int.conf.95.AUC.ROC , "Comparación AUC ROC ensemble vs AUC ROC mejor modelo
individual" , test.AUC , "punto de corte", punto.corte2, "% bien clasificados training
set",porcentaje.bien.clasificados,"Classification Matrix", tabla.bien.mal.clasificados)
resultado.final
```



## 2.4. Script utilizado para la combinación de modelos por el operador promedio

```

combinacion.modelos.promedio <- function (x = tabla.AUC.ordenadas, cant.modelos = 10,
remover.NA = FALSE) {
is.installed <- function(mypkg) { is.element(mypkg, installed.packages()[,1]) }
if ( is.installed("OptimalCutpoints") == FALSE) {install.packages("OptimalCutpoints")}
if( is.installed("data.table") == FALSE) {install.packages("data.table")}
library(OptimalCutpoints)
library(data.table)
mejores.segun.AUC <- as.numeric(x[c(1:cant.modelos),"modelo"])
lista.mejores.modelos <- lista.modelos[mejores.segun.AUC]
lista.predicciones.mejores.modelos <- lapply( lista.mejores.modelos , predict, type =
"response")
tabla.valores.prediccion <- data.frame(matrix(unlist(lista.predicciones.mejores.modelos), nrow=
length(lista.predicciones.mejores.modelos[[1]]), byrow=FALSE))
score.mejor.modelo.individual <- tabla.valores.prediccion[,1]
promedio <- apply(tabla.valores.prediccion,1,mean, na.rm= remover.NA)
p <- lista.conjuntos2[[1]]
clase <- p[, "clase"]
q <- factor(clase)
ROC.ensemble.promedio <- roc(predictor = promedio, response = q, direction = "<" , ci = TRUE ,
auc = TRUE , conf.level=0.95 , ci.method = "delong", boot.n = 2000, boot.stratified = TRUE,
reuse.auc=TRUE)
AUC.ROC.ensemble.promedio <- ROC.ensemble.promedio$auc[[1]] int.conf.95.AUC.ROC <-
ROC.ensemble.promedio$ci
ROC.mejor.individual <- roc(predictor = score.mejor.modelo.individual, response = q, direction =
"<" , ci = TRUE , auc = TRUE , conf.level=0.95 , ci.method = "delong", boot.n = 2000,
boot.stratified = TRUE, reuse.auc=TRUE)
test.AUC <- roc.test(roc1 = ROC.ensemble.promedio , roc2 = ROC.mejor.individual , method =
"delong" , alternative = "two.sided")
df <- data.frame(cbind(clase,promedio))
punto.corte <- OptimalCutpoints::optimal.cutpoints (X = "promedio", status="clase",
tag.healthy=0, data=df,methods="MaxSp", direction="<")
punto.corte2 <-
data.frame(OptimalCutpoints::summary.optimal.cutpoints(punto.corte)$p.table$Global$MaxSp)
p["cutoff",]
predicciones <- ifelse( promedio > punto.corte2, yes = 1,no = 0)
tabla.bien.mal.clasificados <- table(predicciones,clase, dnn = c("clase predicha", "clase real"),
useNA = "ifany")
bien.clasificados <- predicciones == clase
porcentaje.bien.clasificados <- 100*sum(bien.clasificados, na.rm =
TRUE)/length(bien.clasificados)
resultado.final <- list("AUC de la curva ROC", AUC.ROC.ensemble.promedio, "Int Confianza AUC
ROC" ,int.conf.95.AUC.ROC , "Comparación AUC ROC ensemble vs AUC ROC mejor modelo
individual" , test.AUC , "punto de corte", punto.corte2, "% bien clasificados training
set",porcentaje.bien.clasificados,"Classification Matrix", tabla.bien.mal.clasificados)
resultado.final

```



## 2.5. Script utilizado para la combinación de modelos por el operador ranking

```
combinacion.modelos.ranking <- function (x = tabla.AUC.ordenadas, cant.modelos = 10,
remover.NA = FALSE) {
is.installed <- function(mypkg) { is.element(mypkg, installed.packages()[,1])
if ( is.installed("OptimalCutpoints") == FALSE) {install.packages("OptimalCutpoints")}
if( is.installed("data.table") == FALSE) {install.packages("data.table")}
library(OptimalCutpoints)
library(data.table)
mejores.segun.AUC <- as.numeric(x[c(1:cant.modelos),"modelo"])
lista.mejores.modelos <- lista.modelos[mejores.segun.AUC]
lista.predicciones.mejores.modelos <- lapply( lista.mejores.modelos , predict, type =
"response")
tabla.valores.prediccion <- data.frame(matrix(unlist(lista.predicciones.mejores.modelos),
nrow=length(lista.predicciones.mejores.modelos[[1]]), byrow=FALSE))
ranking <- apply(-tabla.valores.prediccion,2,rank, na.last= "keep", ties.method = "first")
score.mejor.modelo.individual <- ranking[,1]
promedio.ranking <- apply(ranking, 1, mean, na.rm = remover.NA)
p <- lista.conjuntos2[[1]]
clase <- p[, "clase"]
q <- factor(clase)
ROC.ensemble.promedio.ranking <- roc(predictor = promedio.ranking, response = q, direction =
">" , ci = TRUE , auc = TRUE , conf.level=0.95 , ci.method = "delong", boot.n = 2000,
boot.stratified = TRUE, reuse.auc=TRUE)
AUC.ROC.ensemble.promedio.ranking <- ROC.ensemble.promedio.ranking$auc[[1]]
int.conf.95.AUC.ROC <- ROC.ensemble.promedio.ranking$ci
ROC.mejor.individual <- roc(predictor = score.mejor.modelo.individual, response = q, direction =
">" , ci = TRUE , auc = TRUE , conf.level=0.95 , ci.method = "delong", boot.n = 2000,
boot.stratified = TRUE, reuse.auc=TRUE)
test.AUC <- roc.test(roc1 = ROC.ensemble.promedio.ranking , roc2 = ROC.mejor.individual ,
method = "delong" , alternative = "two.sided")
df <- data.frame(cbind(clase,promedio.ranking))
punto.corte <- OptimalCutpoints::optimal.cutpoints (X = "promedio.ranking", status="clase",
tag.healthy=0, data=df,methods="MaxSp", direction=">")
punto.corte2 <-
data.frame(OptimalCutpoints::summary.optimal.cutpoints(punto.corte)$p.table$Global$MaxSp)
p["cutoff",]
predicciones <- ifelse( promedio.ranking < punto.corte2, yes = 1,no = 0)
tabla.bien.mal.clasificados <- table(predicciones,clase, dnn = c("clase predicha", "clase real"),
useNA = "ifany") ## hago la tabla para ver las clasificaciones
bien.clasificados <- predicciones == clase
porcentaje.bien.clasificados <- 100*sum(bien.clasificados, na.rm =
TRUE)/length(bien.clasificados)
resultado.final <- list("AUC de la curva ROC", AUC.ROC.ensemble.promedio.ranking,"Int
Confianza AUC ROC" ,int.conf.95.AUC.ROC,"Comparación AUC ROC ensemble vs AUC ROC mejor
modelo individual" , test.AUC , "punto de corte", punto.corte2, "% bien clasificados training
set",porcentaje.bien.clasificados,"Classification Matrix", tabla.bien.mal.clasificados)
resultado.final
```





## 2.6. Script utilizado para la combinación de modelos por el operador voto

```

combinacion.modelos.voto <- function (x = tabla.AUC.ordenadas, cant.modelos = 10,
remover.NA = FALSE) {
is.installed <- function(mypkg) { is.element(mypkg, installed.packages()[,1]) }
if ( is.installed("OptimalCutpoints") == FALSE) {install.packages("OptimalCutpoints")} if(
is.installed("data.table") == FALSE) {install.packages("data.table")} library(OptimalCutpoints)
library(data.table)
mejores.segun.AUC <- as.numeric(x[c(1:cant.modelos),"modelo"])
lista.mejores.modelos <- lista.modelos[mejores.segun.AUC]
lista.predicciones.mejores.modelos <- lapply( lista.mejores.modelos , predict, type =
"response")
tabla.valores.prediccion <- data.frame(matrix(unlist(lista.predicciones.mejores.modelos),
nrow=length(lista.predicciones.mejores.modelos[[1]]), byrow=FALSE))
ranking <-apply(-tabla.valores.prediccion,2,rank, na.last= "keep", ties.method = "first")
entero <- as.data.frame(apply(ranking, 2, function (i) round (11-
i/(0.02*nrow(tabla.valores.prediccion))))))
entero[entero<0]<-0
score.mejor.modelo.individual <- entero[,1]
promedio.voto <- apply(entero, 1, mean, na.rm = remover.NA)
p <-lista.conjuntos2[[1]]
clase <-p[,"clase"]
q <- factor(clase)
ROC.ensemble.promedio.voto <- roc(predictor = promedio.voto, response = q, direction = "<" ,
ci = TRUE , auc = TRUE , conf.level=0.95 , ci.method = "delong", boot.n = 2000, boot.stratified =
TRUE, reuse.auc=TRUE)
AUC.ROC.ensemble.promedio.voto <- ROC.ensemble.promedio.voto$auc[[1]]
int.conf.95.AUC.ROC <- ROC.ensemble.promedio.voto$ci
ROC.mejor.individual<- roc(predictor = score.mejor.modelo.individual, response = q, direction =
"<" , ci = TRUE , auc = TRUE , conf.level=0.95 , ci.method = "delong", boot.n = 2000,
boot.stratified = TRUE, reuse.auc=TRUE)
test.AUC <- roc.test(roc1 = ROC.ensemble.promedio.voto , roc2 = ROC.mejor.individual ,
method = "delong" , alternative = "two.sided")
df <- data.frame(cbind(clase,promedio.voto))
punto.corte <- OptimalCutpoints::optimal.cutpoints (X =
"promedio.voto",status="clase",tag.healthy=0, data=df,methods="MaxSp", direction="<")
punto.corte2 <-
data.frame(OptimalCutpoints::summary.optimal.cutpoints(punto.corte)$p.table$Global$MaxSp)
p["cutoff",]
predicciones <- ifelse( promedio.voto > punto.corte2, yes = 1,no = 0)
tabla.bien.mal.clasificados <- table(predicciones,clase, dnn = c("clase predicha", "clase real"),
useNA = "ifany")
bien.clasificados <- predicciones == clase
porcentaje.bien.clasificados <- 100*sum(bien.clasificados, na.rm =
TRUE)/length(bien.clasificados)
resultado.final <- list("AUC de la curva ROC", AUC.ROC.ensemble.promedio.voto, "Int Confianza
AUC ROC" ,int.conf.95.AUC.ROC, "Comparación AUC ROC ensemble vs AUC ROC mejor modelo
individual" , test.AUC , "punto de corte", punto.corte2, "% bien clasificados training
set",porcentaje.bien.clasificados,"Classification Matrix", tabla.bien.mal.clasificados)
resultado.final

```





## 2.7. Script utilizado para la validación cruzada (k-fold cross validation)

```
k.fold.CV.lm <- function (modelo , punto.corte.optimizado = 0.5, archivo.con.datos = "training
set.csv", folds = 10 , repeticiones = 1) {
is.installed <- function(mypkg) { is.element(mypkg, installed.packages()[,1]) }
if (is.installed("data.table") == FALSE) {install.packages("data.table")}
if (is.installed("plyr") == FALSE) {install.packages("plyr")}
if (is.installed("caret") == FALSE) {install.packages("caret")}
library(data.table)
library(plyr)
library(caret)
df <- as.data.frame(fread(input = archivo.con.datos, check.names = TRUE))
pb <- txtProgressBar(min = 0, max = repeticiones, style = 3)
acc <- matrix(nrow = folds , ncol = repeticiones)
for(j in 1:repeticiones) {
set.seed(j)
index <- createFolds( y = factor(df$clase) , k = folds , list = TRUE , returnTrain = FALSE)
for(i in 1:folds) {
train <- df[-index[[i]], ]
test <- df[index[[i]], ]
model <- update( object = modelo, formula. = . ~ ., data = train)
results_prob <- predict(object = model, newdata = test,type='response')
results <- ifelse(test = results_prob > punto.corte.optimizado, yes = 1 ,no = 0 )
answers <- test$clase
misClasificError <- mean(answers != results)
acc[i,j] <- 1-misClasificError}
setTxtProgressBar(pb, j)}
porcentaje.buenas.clasificaciones <- mean(colMeans(acc))*100
close(pb)
porcentaje.buenas.clasificaciones}
```

## Anexo 3

Los descriptores incluidos en los 5 mejores modelos se describen en la siguiente lista:

Nombre	Descripción	Bloque
<b>ATSC2e</b>	Autocorrelación centrada de Broto-Moreau de segundo grado ponderado por electronegatividades de Sanderson	Autocorrelaciones 2D
<b>ATSC5e</b>	Autocorrelación centrada de Broto-Moreau de quinto grado ponderado por electronegatividades de Sanderson	Autocorrelaciones 2D
<b>B02[O-O]</b>	Presencia/ausencia del par O - O a una distancia topológica 2	Par de átomos 2D
<b>B03[F-Cl]</b>	Presencia/ausencia del par F - Cl a una distancia topológica 3	Par de átomos 2D



<b>B03[N-N]</b>	Presencia/ausencia del par N – N a una distancia topológica 3	Par de átomos 2D
<b>CATS2D_00_DD</b>	Par de átomos Donor - Donor CATS2D a una distancia de 0	CATS2D
<b>CATS2D_00_PP</b>	Par de átomos Positivo – Positivo CATS2D a una distancia de 0	CATS2D
<b>F02[O-O]</b>	Frecuencia del par O – O a una distancia topológica 2	Par de átomos 2D
<b>F07[N-O]</b>	Frecuencia del par N – O a una distancia topológica 7	Par de átomos 2D
<b>GATS2i</b>	Autocorrelación de Geary de segundo grado ponderado por el potencial de ionización	Autocorrelaciones 2D
<b>MATS2i</b>	Autocorrelación de Moran de segundo grado ponderado por el potencial de ionización	Autocorrelaciones 2D
<b>MATS1v</b>	Autocorrelación de Moran de primer grado ponderado por el volumen de van der Waals	Autocorrelaciones 2D
<b>SM13_EA(dm)</b>	Momento espectral de orden 13 desde la matriz de adyacencia de borde ponderado por momento dipolar	Índices de adyacencia de bordes
<b>SsNH2</b>	Suma de los estados electrónicos de sNH2	Índice de estado E tipo átomo
<b>TPSA(Tot)</b>	Área de superficie polar topológica usando las contribuciones polares de N, O, S, P	Propiedades moleculares

- **ATSC2e**, **ATSC5e**, **GATS2i**, **MATS2i** y **MATS1v** pertenecen al bloque de descriptores “Autocorrelaciones 2D”.
- **B02[O-O]**, **B03[F-Cl]**, **B03[N-N]**, **F02[O-O]** y **F07[N-O]** pertenecen al grupo de descriptores “Par de átomos 2D”.
- **CATS2D\_00\_DD** y **CATS2D\_00\_PP** pertenecen al grupo de descriptores “CATS2D – Chemically Advanced Template Search 2D”.
- **SM13\_EA(dm)** pertenece al bloque de descriptores “Índices de adyacencia de bordes”.
- **SsNH2** pertenece al grupo de descriptores “Índice de estado E tipo átomo”.
- **TPSA(Tot)** pertenece al grupo de descriptores “Propiedades Moleculares”.

### AUTOCORRELACIONES 2D

El descriptor de autocorrelación es un descriptor molecular que codifica tanto la estructura molecular como las propiedades fisicoquímicas atribuidas a los átomos como un vector.

Estos descriptores generan histogramas de distancias de pares de átomos dentro de una molécula, que se encuentren por encima de un cierto valor de corte de distancia. Las



distancias se miden en términos del número de uniones entre un par de átomos conectados. La ecuación general se muestra a continuación:

$$\text{Autocorrelación } (r_a, r_b) = \sum_i^n \sum_j^n \delta(r_a \leq r_{ij} < r_b) P_i P_j$$

Donde  $r_{ij}$  es la distancia entre los átomos  $i$  y  $j$ , y  $n$  es el número total de átomos presentes en la molécula.  $P_i$  y  $P_j$  son las propiedades atómicas de los átomos  $i$  y  $j$  utilizadas para ponderar la autocorrelación.  $r_a$  y  $r_b$  definen los límites inferior y superior de cada distancia consecutiva.

Tales descriptores pueden describirse más allá de las características geométricas de una molécula, ponderando las distancias de los pares de átomos respecto a las propiedades de los átomos como carga parcial, electronegatividad, etc.

#### Autocorrelación 2D de Broto-Moreau

También conocidos como Autocorrelación de una Estructura Topológica (Autocorrelation of a Topological Structure, ATS), **ATSC2e** y **ATSC5e** pertenecen a esta categoría de descriptores y fueron incluidos en las funciones discriminantes obtenidas en esta tesis. Estos describen cómo una propiedad es distribuida a lo largo de la estructura topológica. Es una autocorrelación espacial de un grafo molecular definido como:

$$ATS_d = \sum_{i=1}^A \sum_{j=1}^A \delta_{ij} * (w_i * w_j)_d = \mathbb{W}^T * \mathbb{B}^m * \mathbb{W}$$

Donde  $w$  es alguna propiedad atómica;  $A$  es el número total de átomos;  $d$  es la distancia topológica;  $\delta_{ij}$  es la delta de Kronecker, que es una función de dos variables, la cual toma valores de 0 si son diferentes o de 1 si son iguales;  $\mathbb{B}^m$  es una matriz dispersa binaria de orden  $m$  (matriz cuyos elementos son iguales a 1 solo para los vértices  $v_i$  y  $v_j$  a una distancia  $m$ ); y  $\mathbb{W}$  es el vector dimensional  $A$  de propiedades atómicas.

Para cada propiedad  $w$ , la autocorrelación está definida por todas las distancias presentes en el grafo y es el descriptor ATS.



**ATSC2e** indica la autocorrelación centrada de Broto-Moreau de segundo grado ponderado por electronegatividades de Sanderson. Por su parte, el descriptor **ATSC5e** describe la autocorrelación centrada de Broto-Moreau de quinto grado ponderado por electronegatividades de Sanderson.

#### Autocorrelación 2D de Moran

Es un índice de correlación espacial definido por:

$$I_{(d)} = \frac{\frac{1}{\Delta} * \sum_{i=1}^A \sum_{j=1}^A \delta_{ij} * (w_i - \bar{w}) * (w_j - \bar{w})}{\frac{1}{A} * \sum_{i=1}^A (w_i - \bar{w})^2}$$

Donde  $w_i$  es una propiedad atómica y  $\bar{w}$  es el valor promedio de aquella propiedad en toda la molécula;  $A$  es número de átomos,  $d$  es la distancia topológica;  $\Delta$  es la suma de las deltas de Kronecker, es decir, el número de los pares de vértices a una distancia  $d$ .

Dentro de esta categoría se encuentran los descriptores **MATS2i** y **MATS1v** que están incluidos en algunos de los modelos clasificatorios. El primer descriptor está basado en la autocorrelación de Moran de segundo grado ponderado por el potencial de ionización, mientras que el descriptor **MATS1v** se basa en la autocorrelación de Moran de primer grado ponderado por el volumen de van der Waals.

#### Autocorrelación 2D de Geary

Este descriptor está definido por:

$$c_{(d)} = \frac{\frac{1}{2\Delta} * \sum_{i=1}^A \sum_{j=1}^A \delta_{ij} * (w_i - w_j)^2}{\frac{1}{A-1} * \sum_{i=1}^A (w_i - \bar{w})^2}$$

Donde  $w_i$  es una propiedad atómica y  $\bar{w}$  es el valor promedio de aquella propiedad en toda la molécula;  $A$  es número de átomos;  $\Delta$  es la suma de las deltas de Kronecker, es decir, el número de los pares de vértices a una distancia  $d$ .

**GATS2i** es un descriptor basado en la autocorrelación de Geary, de segundo grado ponderado por el potencial de ionización. Este descriptor está incluido en algunas de las funciones discriminantes.

#### PAR DE ÁTOMOS 2D



Los descriptores del bloque de pares de átomos 2D codifican todos los pares de átomos presentes en una molécula junto con la longitud de la unión más corta entre ellos. Cada átomo está representado por el nombre de su elemento con el número de átomos diferentes al hidrógeno que están unidos a él y su número de electrones  $\pi$  de unión.

Dentro de esta categoría, los descriptores **B02[O-O]**, **B03[F-Cl]**, **B03[N-N]**, **F02[O-O]** y **F07[N-O]** fueron incluidos en los modelos clasificatorios. Los descriptores **B02[O-O]**, **B03[F-Cl]** y **B03[N-N]** describe la presencia y/o ausencia del par oxígeno – oxígeno a una distancia topológica de 2, del par flúor – cloro a una distancia topológica de 3 y del par nitrógeno – nitrógeno a una distancia topológica de 3, respectivamente. Los descriptores **F02[O-O]** y **F07[N-O]** indican la frecuencia del par oxígeno – oxígeno a una distancia topológica de 2 y del par nitrógeno – oxígeno a una distancia topológica de 7, respectivamente.

### **ÍNDICE DE ESTADO E TIPO ÁTOMO**

Los índices del estado E o electrotopológicos están determinados para cada átomo. Éstos dependen del estado intrínseco de un átomo  $I_i$  (Ecuación 1). Este estado involucra las características electrónicas y topológicas de los átomos. Los efectos de las interacciones con otros átomos se determinan por el número de uniones entre el átomo  $i$  y cada uno de los otros átomos  $j$ .

$$I_i = \frac{(\delta_i^v + 1)}{\delta_i} \quad (\text{Ecuación 1})$$

El estado E para un átomo está dado por la suma del estado intrínseco  $I_i$  y la perturbación  $\Delta I_{ij}$  que se origina por la interacción, definida en la ecuación 2.

$$\Delta I_{ij} = \sum_j \frac{I_i - I_j}{r_{ij}^2} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Para una longitud de trayectoria  $r_{ij}$ .

Algunos modelos clasificatorios incorporaron el descriptor **SsNH2**, que refleja la suma de los estados electrónicos de los grupos -NH2.

### **CATS2D – CHEMICALLY ADVANCED TEMPLATE SEARCH 2D**



Estos descriptores consideran la distancia topológica (independiente de la conformación) entre dos tipos de puntos farmacofóricos de interés, determinando el número de veces que se encuentra en la molécula aquel par de puntos teniendo en cuenta esa distancia.

De manera habitual, en los modelos farmacofóricos se incluyen cinco posibles puntos farmacofóricos: donador de puentes de hidrógeno (D), aceptor de puentes de hidrógeno (A), ionizables o cargados positivamente (P), ionizables o cargados negativamente (N), y lipofílico (L). Un átomo puede no pertenecer a alguno de los 5 tipos (por lo que no se considera) o ser asignado a más de uno.

Para cada molécula, el número de ocurrencias de los 15 pares posibles (DD, DA, DP, DN, DL, AA, AP, AN, AL, PP, PN, PL, NN, NL, LL) es determinado y luego asociado con el número de enlaces intervinientes entre los dos puntos considerados, con la menor distancia.

**CATS2D\_00\_DD** indica el número de pares de átomos Donor-Donor CATS2D a una distancia topológica de 0. **CATS2D\_00\_PP** indica el número de pares de átomos ionizables Positivo-Positivo a una distancia topológica de 0.

### ÍNDICES DE ADYACENCIA DE BORDES

La matriz de adyacencia de borde en gráficos moleculares simples se define como una matriz cuadrada y simétrica E, donde las filas y columnas corresponden a los bordes (enlaces) de la gráfica. El índice se calcula considerando las moléculas como gráficos ponderados, donde los elementos del conjunto de bordes son sustituidos por el orden de enlace entre los átomos conectados, según la siguiente ecuación:

$$\epsilon(\rho) = \sum_s [\delta(e_i)\delta(e_j)]_s^{-1/2}$$

Donde  $\delta(e_i)$  es la sumatoria de los órdenes de enlaces asociados a todas las uniones adyacentes con el enlace  $e_i$ .

**SM13\_EA(dm)** pertenece a este grupo de descriptores; es el momento espectral de orden 13 desde la matriz de adyacencia de borde ponderado por momento dipolar.

### PROPIEDADES MOLECULARES



**TPSA(Tot)** pertenece a este grupo de descriptores y describe el área de superficie polar topológica usando las contribuciones polares de N, O, S, P.

## Anexo 4



La Plata, 10 de Julio de 2017

It is hereby certified that the Institutional Animal Care and Use Committee of the Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata dependence, has reviewed the protocol and procedure for the care and use of laboratory animals entitled "**6 Hz seizure model**" and submitted by Luis Bruno-Blanch (Andrea Enrique as alternative researcher). This Committee has found that the above procedures are in agreement with local guidelines for vertebrate animal welfare as well as with US Public Health Service and/or European Union policy on this matter (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, and/or European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU).


The above project is approved, effective on the above date.

**Protocol Number 004-23-17**

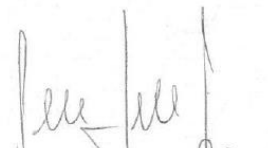
Se deja constancia que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata evaluó el protocolo de utilización de animales presentado por Luis Bruno-Blanch (Andrea Enrique como responsable alterno), titulado "**Modelo de crisis epiléptica 6 Hz**". Este comité considera que el mencionado protocolo se ajusta a las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica y por tanto lo aprueba en el día de la fecha (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, y/o Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU).

La aprobación del protocolo será vigente desde la fecha antes indicada y por el lapso de cuatro años.

**Número de Protocolo: 004-23-17**

  
Natalia Lousada

  
Andrea Enrique

  
Pablo F. Pérez

**PROCOLO 004-23-17**  
**"Modelo de crisis epiléptica 6 Hz"**  
Responsable: Luis Bruno-Blanch  
Responsable Alterno: Andrea Enrique  
Válido hasta 10 de Julio de 2021





La Plata, 5 de Julio de 2016

It is hereby certified that the Institutional Animal Care and Use Committee of the Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata dependence, has reviewed the protocol and procedure for the care and use of laboratory animals entitled "**In vivo evaluation of the anticonvulsant activity of new molecules obtained by molecular screening or rational design**" and submitted by Luis Bruno-Blanch (Alan Talevi as alternative researcher). This Committee has found that the above procedures are in agreement with local guidelines for vertebrate animal welfare as well as with US Public Health Service and/or European Union policy on this matter (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, and/or European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU).

The above project is approved, effective on the above date.

**Protocol Number 014-06-15**

Se deja constancia que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata evaluó el protocolo de utilización de animales presentado por Luis Bruno-Blanch (Alan Talevi como responsable alterno), titulado "**Evaluación in vivo de la actividad anticonvulsiva de nuevas moléculas obtenidas por cribado molecular o por diseño racional**". Este comité considera que el mencionado protocolo se ajusta a las normas éticas de tratamiento humanitario locales e internacionales que deben aplicarse a los animales vertebrados que se utilizan en investigación biomédica y por tanto lo aprueba en el día de la fecha (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010, y/o Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU).

La aprobación del protocolo será vigente desde la fecha antes indicada y por el lapso de cuatro años.

**Número de Protocolo: 014-06-15**

*Fernando diudo*

*PABLO F. PÉREZ*

*J. HOZBOR*

*Natalia Lausado*

NATALIA LAUSADO

**PROTOCOLO 014-06-15**

**"Evaluación in vivo de la actividad anticonvulsiva de nuevas moléculas obtenidas por cribado molecular o por diseño racional"**

**Responsable: Luis Bruno-Blanch**

**Responsables Alternos: Alan Talevi**

**Válido hasta 22 de Junio de 2019**





