Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Sulfamatos y Sulfamidas alifáticos:

Su acción anticonvulsiva. Diseño, síntesis y actividad farmacológica.

Por

Lic. Ivana A. Barrios

Año 2006

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor

Director:
Prof. Dr. Luis Enrique Bruno-Blanch

"La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos."

Albert Einstein

Agradezco a todos aquellos que de alguna manera me acompañaron haciendo más fácil éste camino,

especialmente a Pablo F. A.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi Director Luis por iniciarme en el camino de la investigación y haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo. Por su paciencia, dedicación y darme ánimo en los momentos difíciles.

A Guillermina, Silvina y a mis compañeros del Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata:, Luciana, Mariana, Juan, Sung, Valentina, Gisela, Rubén, Marcela, Julián, y Alán, con los que compartí muchas horas trabajo, y también momentos de diversión.

A Luciana especialmente por su ayuda, y estar siempre que la necesité.

A Mariana, Mónica, Marcela, Melina y Rubén que fueron los que realizaron los ensayos biológicos de los compuestos diseñados y sintetizados que se presentan en este trabajo.

También quisiera agradecer al Profesor Dr. Pelayo Camps García y al Dr. Diego Muñoz-Torrero de la Universidad de Barcelona, España, quienes contribuyeron en mi formación en Química Orgánica, durante los años 2001-2003, antes de iniciar este trabajo de Tesis. Y no me quiero olvidar de mis compañeros de laboratorio y amigos de la hermosa Barcelona, Elena, Xavi, Laura, Jose, Rosa y Eva. Especialmente agradecer a Manolita quién estuvo siempre a mi lado con su cariño y compresión.

A Laura y a Araceli quienes con su calidez me hicieron sentir como en casa.

Pido perdón por aquellos a los que sin querer olvido mencionar.

Agradecer especialmente a Pablo F. A., quién me acompañó y apoyo durante este arduo camino.

A mi familia. A mi tía Silvia y a mi amiga Susana.

Por último a la Universidad Nacional de La Plata, por otorgarme la Beca de Perfeccionamiento y permitirme concluir esta etapa de mi formación.

Dedico este trabajo a mi "*Nonno Marino*"

Indice

- Prefacio.....1
- Resumen y Conclusiones.....3
- Introducción.....9
- Objetivos.....11
- **Capítulo 1:** Diseño de Nuevas Estructuras Anticonvulsivas

1. Por qué buscar nuevos FAEs?.....13
2. Perfil farmacológico buscado.....14
3. Ligandos y su Mecanismo de Acción.....14
4. Diseño Racional de Compuestos.....16
   4.1. Estrategias teóricas para el Descubrimiento de nuevos Fármacos.....16
   4.2. Método Seleccionado: Método Indirecto.....16
5. Farmacóforos propuestos para Compuestos anticonvulsivos con distintos mecanismos de acción.....17
6. Extensión del Farmacóforo: 3D-QSAR-CoMFA.....22
7. Funcionalización de la Porción Polar: Bioisosterismo.....25
8. Estudio electrónico de los grupos sulfamato y sulfamida en los compuestos diseñados.....26
9. Metodología Empleada.....28
   9.1. Características Electrónicas.....29
   9.2. Análisis de Superposición.....29
10. Resultados.....30
11. Discusión de los Resultados.....32

Referencias.....34

- **Capítulo 2:** Síntesis Química

1. Introducción.....37
2. Planificación de Síntesis.....37
3. Sustancias de Partida.....39
4. Tipo de estructuras sintetizadas
   4.1. Sulfamatos y Sulfamidas.....39
5. Química de Sulfamidas y sulfamatos.....40
   5.1. Ácido sulfámico.....40
   5.2. Preparación de Ácido sulfámico.....41

5.3. Sulfamidas.....43
5.3.1. Sulfamidas primarias y *N*-(tert-butil)-*N'*-sulfamidas.....44
5.3.2. Sulfamidas Cíclicas.....47
6. Sulfamatos.....47
6.1. Química de Sulfamatos.....48
7. Metodología.....51
7.1. Obtención de Sulfamidas.....51
7.1.1.Preparación de sulfamidas simétricas.....51
7.1.2.Preparación de sulfamoil carbamatos.....52
7.1.3.Obtención de sulfamidas *N*-mono y *N,N*-disustituidas.....52
7.2. Obtención de Sulfamatos.....53
7.2.1.Preparación de sulfamatos a partir de los correspondientes alcoholes alifáticos.....53
8. Resultados.....55
9. Discusión de los Resultados.....57
10. Sección Experimental: Síntesis Química.....58
- *N,N,N'N'*-tetrapropilsulfamida, **1**.....59
- *N,N,N'N'*-tetrabutilsulfamida, **2**.....61
- *N, N'*-di-propilsulfamida, **3**.....62
- *N, N'*-di-feniletilsulfamida, **4**.....64
- *N*-butil- *N'*-(*tert*-butoxicarbonil) sulfamida, **5**.....66
- *N,N*-dibutil-*N'*-(*tert*-butoxicarbonil)-sulfamida, **6**.....68
- *N,N*-di-butilsulfamida, **7**.....69
- *N*-butilsulfamida, **8**.....71
- n-butilsulfamato, **9**.....72
- n-pentilsulfamato, **10**.....74
- n-hexilsulfamato, **11**.....76
- 2-propilpentilsulfamato, **12**.....78
- Espectros ^{1}H-RMN ,^{13}C-RMN e IR.....81
11. Referencias.....101
- **Capítulo 3:** Ensayos Farmacológicos
1. Introducción
1.1. Ensayos Biológicos.....107
2. Descripción de la metodología de Evaluación Anticonvulsiva y neurotóxica.....108

3. Preparación y Administración de las drogas..... 111
4. Ensayos MES y PTZ..... 113
5. Resultados..... 117
6. Discusión de los Resultados..... 124
Referencias..... 129

- **Anexo 1**: Descubrimiento de Nuevos Líderes

1. Introducción..... 131
2. La evolución en las tecnologías.....131
3. Qué es un líder?.....134
4. La industria farmacéutica y el descubrimiento de nuevos líderes..... 135
   4.1. Costos
5. Dificultades actuales en el descubrimiento de nuevos líderes.....135
6. Metodologías empleadas en el descubrimiento de nuevos lideres.....136
   6.1. Descubrimiento de nuevos líderes a partir del ligando.....136
      6.1.1. Productos Naturales.....137
      6.1.2. Descubrimiento por azar o serendipity..... .141
      6.1.3. Ensayos biológicos *in vivo* e *in vitro*.....143
      6.1.4. Barrido farmacológico de alta performance (HTS o uHTs)..... 144
      6.1.5. Combinatoria Química.....144
      6.1.6. Aproximación Racional.....147
         Optimización de una estructura Líder.....147
         Desarrollo de compuestos "semejantes a".....147
         De péptidos a peptidomiméticos..... 148
         Optimización de Efectos Secundarios.....150
         Profármacos y Fármacos Blandos.....151
         Enantiómeros y Compuestos quirales.....153
         Metabolitos Activos: Rescatando Malos Líderes..... 154
         Diseño Racional Asistido por computadoras
         Química Computacional 154
         Farmacóforo.....155
         QSAR y QSAR 3D: CoMFA.....156
         Evaluaciones Virtuales.....156
   6.2 Métodos Directos: Metodologías de diseño basadas en el conocimiento del receptor.....158

7. Estrategias utilizadas en el desarrollo de nuevos Fármacos Antiepilépticos....159
8. Estrategias en el desarrollo de drogas para la epilepsia farmacorresistente...160
Referencias.....162
- **Anexo 2** . Epilepsia : El objetivo Terapéutico
1. Qué es la epilepsia?.....167
2. Un poco de Historia.....168
3. Datos Estadísticos.....169
4. A quiénes afecta y cuando se manifiesta?.....170
5. Clasificación de las convulsiones..... 170
6. Tipos de epilepsia..... 174
7. Causas de los episodios epilépticos..... 175
8. El Sistema Nerviosos Central..... 176
9. Diagnóstico de la epilepsia.....177
10. Tratamientos.....180
11. Nuevas perspectivas sobre la epilepsia..... 186
Referencias 188
- **Anexo 3**. Mecanismo de las Convulsiones
1. Introducción..... 191
2. Fisiopatología.....192
3. Mecanismos involucrados en el control de la epilepsia.....192
3.1. Modulación de canales iónicos.....192
3.1.1. Canales de Sodio..... 193
3.1.2. Descripción del Canal de Sodio.....193
3.1.3. Modulación del canal..... 196
3.1.4. Biología Molecular de los canales de sodio.....196
3.1.5. Mecanismo de Acción fisiológico.....196
3.1.6. Mecanismo de FAEs bloqueantes de Canales de sodio.....197
3.1.7. Estudio Funcional: *Binding* a canales de sodio.....199
3.1.8. Canales de Calcio: Mecanismo de Acción Fisiológico..... 200
3.1.9. Mecanismo de FAEs antiepilépticos.....200
3.1.10. Canal de Potasio 201
3.1.11. Estructura del Canal de Potasio.....202
3.2. Inhibición Sináptica mediada por GABA.....202
3.3. Disminución de la excitación mediada por glutamato.....205
3.4. Proteína de la vesícula sináptica SV2A.....206

4. Drogas con múltiples mecanismos.....207
Referencias..... 209
• **Anexo 4**. Fármacos útiles en el tratamiento de la Epilepsia
1. Introducción.....215
2. FAEs en uso clínico..... 216
3. Actualización en el tratamiento Farmacológico de la Epilepsia.....217
4. Datos preclínicos de nuevos FAEs en uso clínico y en desarrollo.....220
5. Eficacia de FAEs de segunda generación.....223
6. Cuándo utilizar FAEs nuevos?.....223
7. Efectos Adversos de los nuevos FAEs.....223
7.1. Principales desventajas de los nuevos FAEs.....224
7.2. Influencia en el peso.....224
7.3. Teratogénesis.....225
7.4. Sobredosis.....225
8. Farmacocinética.....225
8.1. Unión a proteínas.....225
8.2. Eliminación hepática y renal.....226
8.3. FAEs y el citocromo P450.....226
8.4. Metabolismo no hepático.....226
8.5. Glucorunización hepática.....227
9. Resistencia..... 227
10. FAEs que empeoran las crisis epilépticas.....228
11. Conclusiones.....229
Referencias.....231
• **Anexo 5**. Modelos animales usados para la evaluación de drogas anticonvulsivas.....233
Referencias.....238
• **Anexo 6**. Programa de Evaluación de drogas antiepilépticas.
1. Introducción.....241
2. Elección del ensayo.....241
3. Programa de Evaluación de drogas anticonvulsivas del NHI.....242
4. Fase I.....244
5. Fase II..... 244
6. Tratamiento estadístico de los datos.....245
Referencias..... ...248

- **Anexo 7.** Sulfamatos y Sulfamidas: su potencial terapéutico

1. Introducción.....249
2. Antibióticos..... 249
3. Antivirales.....250
4. Anticancerígenos..... 251
5. Inhibidores de la Anhidraza Carbónica.....253
6. Anticonvulsivos.....254
7. Anti-obesidad.....256
8. Hiperlipidemia y asterrosclerosis.....256
9. Anti-artritis y osteoporosis.....257
10. Sulfamidas.....257

Referencias.....260

- **Anexo 8.** 2D y 3D-QSAR

1. Introducción.....265
2. 2D-QSAR..... 266
3. 3D-QSAR.....267
4. CoMFA vs 2D-QSAR.....273

Referencias.....275

- **Anexo 9.** Bioisosterismo.....277

Referencias..... 279

Prefacio

En este trabajo de Tesis Doctoral se pretende contribuir modestamente desde la perspectiva de la *química medicinal* al desarrollo de nuevos fármacos para controlar a una de las enfermedades mentales que afecta al 1-2% de la población mundial: *la epilepsia*.

Cómo leer la presente Tesis.

El lector encontrará dos tipos de contenidos. Las tareas originales realizadas en este trabajo figuran como Capítulos, lo que permite entrar de manera directa a la parte original.
Se podrá acceder por medio de los Anexos que figuran en el texto a una lectura más profunda sobre cada tema en particular.
Estos Anexo dan un marco teórico más detallado al trabajo realizado. Se analizan y discuten temas directamente relacionados con el tema de investigación.

La presente Tesis consta de:

- Resumen y Conclusiones
- Introducción
- Objetivos

- Capítulo 1: Diseño y/ selección de nuevas estructuras con actividad antiepiléptica.
- Capítulo 2: Síntesis Química
- Capítulo 3: Ensayos Farmacológicos

- Anexo 1: Descubrimiento de nuevos líderes: El Diseño Racional como herramienta.
- Anexo 2: Epilepsia: El objetivo Terapéutico.
- Anexo 3: Mecanismo de las convulsiones.
- Anexo 4: Fármacos útiles en el tratamiento de la epilépsia.
- Anexo 5:. Modelos animales en la evaluación de Drogas Antiepilépticas.
- Anexo 6: Programa de Evaluación de Drogas Antiepilépticas
- Anexo 7: Sulfamatos y sulfamidas: su potencial terapéutico
- Anexo 8: QSAR- 2D y 3D: CoMFA
- Anexo 9: Bioisósteros.

Sulfamatos y Sulfamidas alifáticos: su acción anticonvulsiva. Diseño, síntesis y actividad farmacológica.

Por

Ivana A. Barrios

Resumen y Conclusiones

Entre los diversos procesos adversos asociados al Sistema Nervioso Central (SNC) la convulsión epiléptica continúa siendo uno de los temas principales de investigación. La razón fundamental es que afecta a 50 millones de personas en el mundo con marcada incidencia en los países en desarrollo.[1, ,2, 3] Se estima que en los próximos años 100 millones de personas en el mundo tendrán una crisis epiléptica en algún momento de sus vidas. A pesar de los numerosos avances logrados en este campo en los últimos años, aún el 25-40%[2,4] de la población afectada por la epilepsia no responde a los tratamientos basados en los medicamentos disponibles en el mercado.[5]

La necesidad del desarrollo de nuevos anticonvulsivos no sólo se asocia a este hecho, sino también a la cantidad de efectos adversos vinculados a la administración de los tradicionalmente usados en clínica tales como: ácido valproico (VPA), fenitoína (PHEN), carbamacepina (CZ), Oxacarbamacepina (OXC), Lamotrigina (LMT), Topiramato (TOP) entre otros, que varían desde somnolencia, ataxia, variación en el peso, perdida de memoria, caída de pelo, hepatotoxicidad hasta teratogenicidad.[6,7] Esto se agrava por tratarse de un tratamiento por tiempo prolongado.[8,9, 10]

Con el objetivo centrado en contribuir al desarrollo de un nuevo fármaco antiepiléptico, la presente Tesis Doctoral presenta un enfoque original en el estudio teórico: electrónico-estructural; experimental: síntesis química y evaluación antiepiléptica de compuestos estructuralmente sencillos, funcionalizados como sulfamatos y sulfamidas.

Su acción en el SNC cumple con el farmacóforo de compuestos anti-MES asociado al mecanismo de bloqueo de canales de sodio voltaje dependiente.[11]

En el año 2001 en nuestro grupo de trabajo se planteó al grupo funcional sulfamato como una funcionalización importante para la actividad antiepiléptica.[12]

En el año 2004 se retomó el estudio de dicha funcionalización asociada a la región polar del farmacóforo. Se diseñaron las estructuras presentadas en este trabajo, funcionalizadas como sulfamatos y sulfamidas. Estas se sintetizaron y evaluaron farmacologicamente.

El grupo funcional sulfamida no se había evaluado con anterioridad frente a la actividad anticonvulsiva por lo que resulta ser un nuevo prototipo anticonvulsivo.

Esta metodología de investigación interdisciplinaria, basada en el *diseño racional*, permitió obtener dos compuestos noveles y diez estructuras preexistentes nunca evaluados como antiepilépticos. Su perfil farmacológico resultó ser muy prometedor según se expone a continuación:

- Diez de los doce compuestos preparados son activos frente al MES test. Nueve de los diez compuestos se clasifican como Clase I frente al ensayo MES siendo activos a 30 mg/kg como es el caso de n-hexilsulfamato,**11-HSU** y 2-propilpentilsulfamato, **12-VPS** respectivamente. [Capítulo **3**]

- Comparando la potencia del ácido valproico (ED_{50}=1008 μmol/kg) con la de **12-VPS** (ED_{50} = 224 μmol/kg) y la de **4-DPHS** (ED_{50} = 263 μmol/kg) nos encontramos frente a compuesto 4 veces más activos que el primero.

- Se presenta un análisis Relación Estructura Actividad (SAR) de los requerimientos estructurales básicos para la actividad anti-MES, si bien es reducido el número de compuestos analizados.

- Es interesante destacar el caso de n-butilsulfamato, **9-BSU** que resultó ser un potente convulsivante. Este compuesto y n-pentilsulfamato, **10-PSU** han sido estudiados por el grupo de Supuran et. al. presentando actividad inhibitoria de anhidraza carbónica.[13]

- Si bien los compuestos preparados fueron diseñados, sintetizados y evaluados como antiepilépticos no se descarta la posibilidad de que presenten otras acciones farmacológicas asociadas al *grupo funcional sulfamato* tales como: actividad antiviral, antibiótica, anticancerígena, inhibidores de anhidraza carbónica, edulcorante, anti-obesidad, para el tratamiento de la osteporosis y anti-artritis, hiper-lipidemia, artereclorosis.[14]

  Asociadas al *grupo funcional sulfamida*: inhibidoras de la proteasa HIV[15,16] agonista de los receptores 5-HTID[17], componentes activos de análogos de

epinefrina[18], peptidomiméticos no hidrolizables[19], y también inhibidores de anhidraza carbónica.[20, 21, 22, 23]

En el mes de enero de 2006, durante la redacción de este trabajo, el grupo de Maryanoff y col. patentaron una serie de sulfamatos y sulfamidas con actividad anti-MES.[24]

Los compuestos preparados en este trabajo de Tesis son estructuralmente sencillos y novedosos con respecto a su actividad ya que no fueron ensayados como anticonvulsivos con anterioridad.

Referencias

[1] World Health Organization 2006. Epilepsy: Etiology, epidemiology and prognosis; Fact sheet N°165, Revised February **2001**. Sitio Web: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/en/

[2] Jain, S., *Epilepsia* , **2005**, *46*, 46–47.

[3] M.T. Medina, R.M. Duron, L. Martinez, J.R. Osorio, A.L. Estrade, C. Zuniga, K.R. Holden. *Epilepsia* , **2005**, *46* 124–131.

[4] White, H.S. *Epilepsia*, **2003**, *44 (Suppl.7)*, 2-8.

[5] Kwan,S. *J.Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **2004**, *75*, 1376-1381.

[6] White, H.S. *Epilepsia*, **1999**, *40 (5)*, S2-S10.

[7] Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levyd, R.H.; Perucca, E.; Tomsonf, T.*Epilepsy Research*, **2004**, *61*, 1–48.

[8] Estrada, E.; Peña A. *Bioorg. & Med. Chem.*, **2000**, *8*, 2755-2770.

[9] Collaborative Group for Epidemiology of Epilepsy. *Epilepsia*, 1988;29:787– 93.

[10] Rianne, R.; Aldenkamp, A.P.; De Krom, M. *Epilepsy & Behavior*, **2004**, *5*,S66–S76.

[11] Tasso, S.M.; Moon, S.Ch.; Bruno-Blanch, Estiú, G.L. Bioorg. Med.Chem., **2004**, *12*, 3857.

[12] Barrios, I.A.; Bruno-Blanch, L.E.; Estiú, G.L.*J. Mol.Struct.*(Theochem), **2002**, *580*, 243-250.

[13] Winum, J-Y; Vullo, D.; Casini, A.; Montero, J-L; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5471-5477.

[14] Winum, J-Y.; Scozzafava, A.; Montero, J-L.; Supuran, C.T. *Med. Review Research*, **2005**, *25*, 168-228.

[15] Bäckbro, K.; Lowgren, S.; Osterlund, K.; Atepo, J.; Unge, T.; Hulten J.; Bonham N. M.; Schaal, W.; Hallberg, A. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 898-902.

[16] Hulten, J.; Bonham, N. M.; Nillroth, U.; Hansson, T.; Zuccarello, G.; Bouzide, A.; Aqvist, J.; Classon, B.; Danielson, U. H.; Karlen, A.; Kvarnstrom, I.; Samuelsson, B.; Hallberg, A. *J. Med Chem.* **1997**, *40*, 885-897.

[17] Castro, J. L.; Baker, R.; Giublin, A. R.; Hobbs, S. C.; Jenkins, M. R.; Rusell, M. G. N.; Beer, M. S.; Stanton, J. A.; Scholey, K.; Hargreaves, R. J. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3023-3032.

[18] Acheson, R. M.; Bite, M. G.; Kemp, J. E. G. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1300-1304.

[19] Dougherty, J. M.; Probs, D. A.; Robinson, R. E.; Moore, J. D.; Klein, T. A.; Snelgrove, K. A.; Hanson, P.R. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9781-9790.

[20] Abbate, F.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Orioli, P.; Stubbs, M. T.; Klebe, G. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3583-3587.

[21] Winum, J.-Y.; Innocenti, A.; Nasr, J.; Montero,J.-L.; Scozzafava, A.; Vullo D.; Supuran C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2353-2358.

[22] Casini, A.; Winum, J.-Y.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 837-840.

[23] Klinger, A.L.; McComsey, V.; Smith-Swintosky, R.P.; Shank, R.P.; Maryanoff, B.E.*J.Med.Chem.*, **2006**, *49*, 3496-3500.

[24] McComsey, D.; Parker, M.; Reitz, A.B.; Maryanoff, B.E. International Publication Number: WO 2006/007435 A1., **2006**, US.

Introducción de la Presente Tesis

La metodología utilizada para abordar el presente trabajo está basada en el Diseño Racional de fármacos [Anexo 1-Diseño Racional]. Dentro de las varias formas que figuran en bibliografía para abordar el descubrimiento de un nuevo fármaco, se pueden diferenciar dos grandes grupos, aquellos que abordan el estudio a partir del conocimiento de las características del sitio receptor y aquellas que se basan en la comparación de diferentes ligandos que interaccionan con él. (Anexo1)

Esta investigación utilizó una metodología basada en el estudio de los ligandos, debido a que no se conoce la estructura tridimensional (3D) del sitio receptor postulado, canales de Na^+ voltaje dependientes. En estos casos se consideran a los ligandos que se unen al sitio de interés como las estructuras activas respecto a los procesos de interacción ligando-receptor. Estudios estructurales posteriores permiten verificar las características comunes generando el *patrón farmacofórico*. (Anexo 1)

La secuencia de etapas del presente trabajo son las siguientes:

- Diseño y/o selección basados en el patrón farmacofórico de compuestos funcionalizados como Sulfamatos y Sulfamidas.
- Estudio estructural y electrónico de la porción polar de los compuestos elegidos y su comparación con la porción polar propuesta en el farmacóforo.
- Síntesis de sulfamatos y sulfamidas como nuevas entidades anticonvulsivas.
- Evaluación preclínica como anticonvulsivantes hasta Fase II del Programa de Evaluación de Drogas Antiepilépticas del NIH[1] de las moléculas sintetizadas y análisis de los resultados.

Estas etapas incluyen resultados derivados de diferentes disciplinas íntimamente vinculadas:

- Química Computacional: estudio teórico de los requerimientos y propiedades moleculares de las drogas.

- Química Orgánica: Síntesis de los compuestos diseñados, que abarca la planificación de la síntesis, síntesis propiamente dicha empleando diversas técnicas experimentales, aislamiento, purificación y caracterización por métodos fisicoquímicos de los compuestos preparados.

[1] National Institute of Health, Estados Unidos.

- Farmacología: Elección del modelo experimental para la evaluación de los compuestos preparados, evaluación farmacológica, análisis estadístico de los resultados.

Objetivos de la Presente Tesis

El ***objetivo general*** puede condensarse en el logro de un fármaco de óptimo índice terapéutico, el cual refleja la selectividad y margen de seguridad, a través de la relación entre actividad y toxicidad. La naturaleza compleja de esta definición sencilla se vincula a la variedad de procesos que determinan la toxicidad, que no sólo incluye efectos farmacológicos de la droga misma sino también de sus metabolitos y/o intermediarios reactivos que resultan en las distintas etapas de interacción de la droga. Este objetivo puede asociarse al *logro de un nuevo fármaco* que reúna las condiciones que definen el control de la epilepsia, es decir:

- capaz de suprimir el ataque epiléptico,

- capaz de impedir la progresión de la enfermedad,

- capaz también de no generar farmacoresistencia.

- capaz de no generar metabolitos tóxicos ni efectos secundarios

Se busca (aportar nuevas estructuras que por sus acciones permitan) además comprender los mecanismos que conducen a la epilepsia, a fin de lograr la prevención de la enfermedad.

Objetivos específicos:

1. Realizar el ***diseño*** y la ***síntesis*** de compuesto que manifiesten la actividad buscada. Se busca siempre un aumento de actividad con disminución de efectos colaterales, en una investigación orientada al diseño de drogas de potencial uso clínico.
Se propone sintetizar derivados estructuralmente sencillos derivados de alcoholes y aminas alifáticos funcionalizados como sulfamatos y sulfamidas. Estas estructuras fueron diseñadas a partir del conocimiento del *patrón farmacofórico* de anticonvulsivos que actúan por bloqueo de canales de Na^+ voltaje dependiente, lo que ha permitido definir los requerimientos estructurales asociados a esta acción farmacológica.

2. ***Evaluación de la actividad anticonvulsiva*** de las estructuras seleccionadas, Fase I y Fase II del *Program of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke*, NIH-USA. El mismo se realiza en el Bioterio del

Área Diseño de Fármacos, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, por investigadores especialmente entrenados.

3. *Análisis de los resultados*. Relación Estructura –actividad cualitativa.

Capítulo 1

Diseño de Nuevas Estructuras Anticonvulsivas.

1. Introducción

1. 1 Por qué buscar nuevos fármacos con actividad anticonvulsivante?

La búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos (FAEs) sigue siendo uno de los temas principales e imperiosos de investigación entre las afecciones del Sistema Nervioso Central.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, la epilepsia afecta en promedio a 70 de cada 10 mil personas en el mundo, sin discriminación de edad, sexo o limites geográficos. La incidencia, puede variar entre los países desarrollados (50 personas/10 mil) y en vías de desarrollo (100 personas/10 mil) debido a que en estos últimos hay mayor riesgo de infecciones y enfermedades que ocasionen daños cerebrales que puedan traer aparejado este tipo de desordenes[1]. Esto representa que al menos 50 millones de personas en el mundo tienen epilepsia.

En la provincia de Buenos Aires, según datos del Ministerio de Salud se estima que 480 mil paciencias sufren de epilepsia.[2] Esto es 130 de cada 10.000 personas. De acuerdo a estos valores estaríamos por encima de los valores mundialmente establecidos por la OMS.

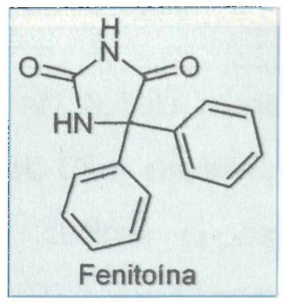
Existen principalmente cuatro formas de tratar la epilepsia: 1) Medicamentos; 2) Cirugía; 3) Dieta Cetogénica, 4) Dispositivos especiales. (Anexo 2) Los medicamentos son el tratamiento que dan mejor resultado, el más usado y de primera elección.[1] Sin embargo, a pesar de los numerosos avances logrados, aún el 25-40% de la población epiléptica no responde a los tratamientos basados en los medicamentos existentes en el mercado.[3, 4, 5] Los fármacos antiepilépticos clásicos y los de nueva generación, surgidos en la década de los `90, presentan una serie de efectos adversos que van desde urticarias, trastornos gastrointestinales, hasta problemas hepáticos y renales[6, 7] que se agravan aún más por tratarse de un tratamiento a largo plazo. (Anexo 2)

Motivados en estas necesidades en nuestro grupo de trabajo nos interesamos en el desarrollo de nuevos FAEs, más seguros, menos tóxicos y con mayor eficacia frente a pacientes refractarios.[8, (Anexo 4)]

En el presente capítulo se describe la metodología utilizada para el diseño de compuestos anticonvulsivantes activos frente al ensayo de Electrochoque Máximo (MES test), a los que se les asocia principalmente el mecanismo de acción por bloqueo de canales de sodio voltaje dependiente (BCSVD). [9, 10]

2. Perfil Farmacológico buscado

Nuestro interés se centra en el diseño y/o selección de nuevas estructuras anticonvulsivantes con un perfil farmacológico semejantes a Fenitoína activas frente al ensayo MES e inactivas frente a la inducción química con pentilentetrazol (PTZ).[11] Como ya se mencionó, el mecanismo de acción asociado a compuestos anti-MES es el bloqueo de canales de sodio neuronales voltaje dependiente.[9,12]



Fenitoína

3. Ligandos y su Mecanismo de acción asociado.

Bloqueantes de canales de Sodio.

Los FAEs se pueden clasificar según su mecanismo de acción, aunque muchos de ellos tienen varios mecanismos asociados, y a otros no se les conoce el mecanismo por el cuál ejercen su acción. [Anexo 3] Entre los posibles mecanismos de acción que presentan las drogas antiepilépticas se encuentra la interacción con canales iónicos responsables directos de los cambios en la excitación neuronal.

El bloqueo de los canales de sodio neuronales ha demostrado ser un mecanismo común a varias drogas antiepilépticas estructuralmente diversas.[13] Este ha sido uno de los primeros mecanismos estudiados en relación a los fármacos antiepilépticos.

Las razones fundamentales para la elección del estudio de ligandos o fármacos que inhiben los episodios epilépticos por este mecanismo se fundamentan además de lo expuesto en el punto 2:

1. Los compuestos anticonvulsivos BCSVD [Anexo 3 y 4] son útiles en el tratamiento de pacientes con *epilepsia generalizada y generalizadas secundaria,* son aquellas que evolucionan secundariamente a convulsiones tónico

clónicas generalizadas. (Anexo 2, 3 y 4) Estos compuestos, por ejemplo Lamotrigina, Fenitoína, Carbamacepina son importantes porque actúan con mayor eficacia sobre los canales de sodio de células afectadas por una crisis convulsiva o isquemia.[14] Estas células se caracterizan por mantener una despolarización sostenida durante segundos (Anexo 3) a diferencia de las normales.[15]

Otras actividades asociadas a compuestos, con este perfil, presentan distintas acciones farmacológicas como antiarrítmicos (mexitilene) o los anestésicos locales (lidocaína).[16]

2. El influjo excesivo de iones Na^+ a través de CSVD causa despolarización celular dando lugar a una crisis. A su vez este influjo contribuye a ocasionar un gran número de funciones celulares indeseables como: apertura de canales de Ca^{++} y de canales de Ca^{++} asociados a glutamato, apertura de canales de K^+, bloqueo de receptores NMDA dependientes de Mg^+.[16] Una alta concentración de Na^+ citoplasmático causa otros detrimentos asociados como: disminución de ATP almacenado, reversión del transportador Na^+/Ca^{++}, y de otros neurotransmisores. Esto contribuye a acelerar otros procesos como isquemia. Debido a la gran cantidad de efectos adversos asociados al excesivo influjo a través de estos canales abordar el estudio de anticonvulsivos bloqueantes de canales de sodio tiene una ventaja adicional sobre otros mecanismos tales como el bloqueo de canales de Ca^{++} , antagonismo de aminoácidos excitatorios, u otros que alteran la función normal del cerebro.

3. Estudios en modelos animales han demostrado que compuestos que modulan los canales de Na^+ voltaje dependientes son neuroprotectores en modelos de hipoxia, isquemia y trauma cerebral.[16]

4. El desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos basado en el diseño racional, más que en la evaluación virtual (Anexo 1) de drogas, se basa en el conocimiento de los mecanismos que regulan las funciones normales del cerebro y la actividad anormal asociada con los desordenes o las crisis epilépticas. La modulación de la actividad de los canales iónicos voltaje dependiente es la base molecular de la acción de muchos fármacos antiepilépticos (Anexo 3) y es una estrategia efectiva para el desarrollo de nuevos anticonvulsivos. [17]

5. El conocimiento actual sobre el canal de sodio, indica que pueden existir varias isoformas del mismo en el cerebro con diferentes propiedades funcionales así como diferentes expresiones en regiones del cerebro. (Anexo 3) Con esto se podrían diseñar estructuras selectivas para un subtipo de canal particular. Estas drogas podrían actuar semejante a Fenitoína.[18]

6. En el Laboratorio de Química Medicinal se ha postulado un patrón farmacofórico para FAEs que actúan por bloqueo de canales de sodio voltaje dependiente. Este permitió diseñar nuevos prototipos activos como valpramidas que resultaron ser activas frente al MES test. Ensayos de **binding** *in vitro,* de los compuestos más activos, demostraron que estas son capaces de bloquear canales de sodio voltaje dependiente [19] validando el patrón farmacofórico postulado.

4. Diseño Racional de Compuestos:

4. 1 Estrategias teóricas para el descubrimiento de nuevos fármacos.

Entre las estrategias para el descubrimiento de un nuevo fármaco incluidas dentro del Diseño Racional, existen dos aproximaciones diferentes cuyo objetivo es diseñar nuevas estructuras con mayor actividad farmacológica y disminución de los efectos adversos.[20]

Las nuevas estructuras pueden ser modeladas utilizando *"métodos directos"* basados en el conocimiento de las características del sitio receptor, o *"métodos indirectos"* derivados del estudio de diferentes ligandos que se unen a un mismo sitio receptor o manifiestan la misma acción farmacológica. (Anexo 1)

4.2 Método seleccionado: Método Indirecto

Si bien se a avanzado mucho sobre el conocimiento de los canales de sodio voltaje dependiente aún no se conocen con exactitud la estructura tridimensional del sitio activo en el receptor. (Anexo 3) Es por eso que se emplea una metodología *indirecta* en el presente trabajo. Sólo se dispone de la información asociada a varias drogas que producen la misma respuesta biológica[21].

El método indirecto se basa en la comparación de diferentes ligandos seleccionados entre aquellos que interactúan en el mismo sitio receptor o conducen a la misma respuesta biológica. Los pasos a seguir son:



- Primero se seleccionan las estructuras que se conoce que actúan por el mismo mecanismo o manifiestan la misma respuesta biológica.

- Se determina por metodologías de Modelado Molecular asociadas al análisis conformacional la conformación activa de cada una de las estructuras.

- Se estudian las características 3D de los compuestos activos y se determinan las características estructurales de éstos empleando técnicas de superposición gráfica o analítica, lo que permite obtener los requerimientos estructurales, electrónicos y conformacionales comunes a la serie estudiada definido como *patrón farmacofórico o farmacóforo*. En nuestro caso el *patrón farmacofórico* de compuestos activos frente al MES test.

- Una vez identificado el farmacóforo o patrón farmacofórico se pueden diseñar y/o seleccionar nuevas estructuras teniendo en cuenta este requisito. Estos compuestos son sometidos a distintos tipos de análisis entre los cuáles se determina si son capaces de adoptar la conformación del farmacóforo y por lo tanto ser potenciales compuestos biológicamente activos. (Anexo 1)

- El primer paso del diseño Racional utilizando una metodología indirecta es la identificación del *farmacóforo*.

El análisis QSAR[1] (Relación cuantitativa Estructura-Actividad o Propiedad-propiedad) permite cuantificar la variación de la actividad relacionada a una modificación estructural dada. (Anexo 8)

5. Farmacóforos propuestos para Compuestos Anticonvulsivos para distintos mecanismos de Acción.

La mayor dificultad que se encuentra al tratar de definir un farmacóforo es disponer de un conjunto relativamente importante de compuestos estructuralmente disímiles. En la actualidad se han postulado varios modelos de farmacóforos. En su mayoría, derivan del estudio de compuestos estructuralmente relacionados.[22]

❖ [1] QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship.

Así podemos presentar el modelo planteado para derivados de N-bencilamidas del ácido γ-hidroxibutírico[23] donde la actividad esta asociada a la presencia de un fragmento N-Bencilamida, un anillo aromático distante y un grupo donor de un enlace H (capaz de formar puente H), localizado entre ellos (Figura 1).

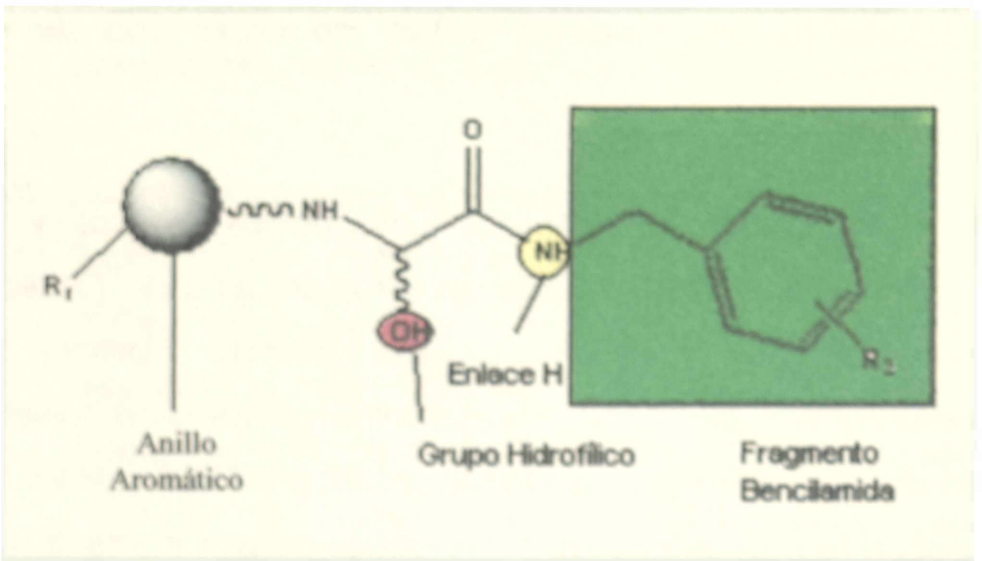


Figura 1. Modelo farmacofónco propuesto para la actividad anticonvulsiva de compuestos relacionados a derivados de N-bencilamidas del ácido γ-hidroxibutírico.

El patrón farmacofónico derivado del estudio de ureas y semicarbazonas[24] postula la existencia de un sitio capaz de formar puente H localizado entre dos áreas hidrofóbicas. Para el caso de semicarbazonas el sitio capaz de generar un puente hidrógeno se disocia en un sitio donor/aceptor de H y un grupo donor de electrones (Figura 2). El análisis computacional[25] también contribuyó en el diseño de nuevos ligandos antiepilépticos pero el estudio siempre estuvo limitado en general a una determinada familia estructural.

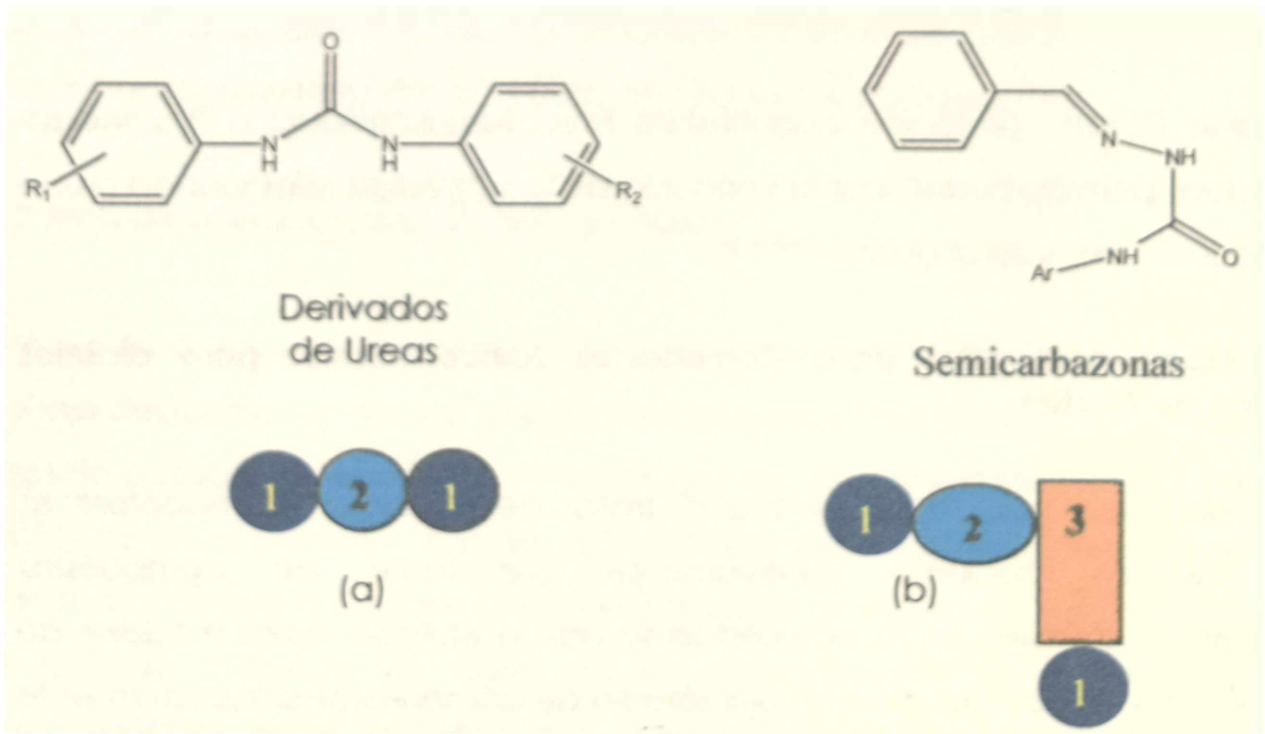


Figura 2. (a) Representación esquemática del modelo farmacofórico sugerido para la actividad anticonvulsivante de compuestos derivados de ureas. **(b)** Representación

esquemática y farmacóforo propuesto para la actividad anticonvulsivante de compuestos relacionados a semicarbazonas.[22] **1**:Regiones hidrofóbicas; **2**: Sitio aceptor / donor de hidrógeno; **3**: Grupo donor de electrones.

Recientemente se postularon diversos farmacóforos para distintos mecanismos de acción. Por ejemplo el estudiado para estructuras derivadas de 6,7- dimetoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas[26] que actúan como ***antagonistas de receptores AMPA*** (Figura 3).

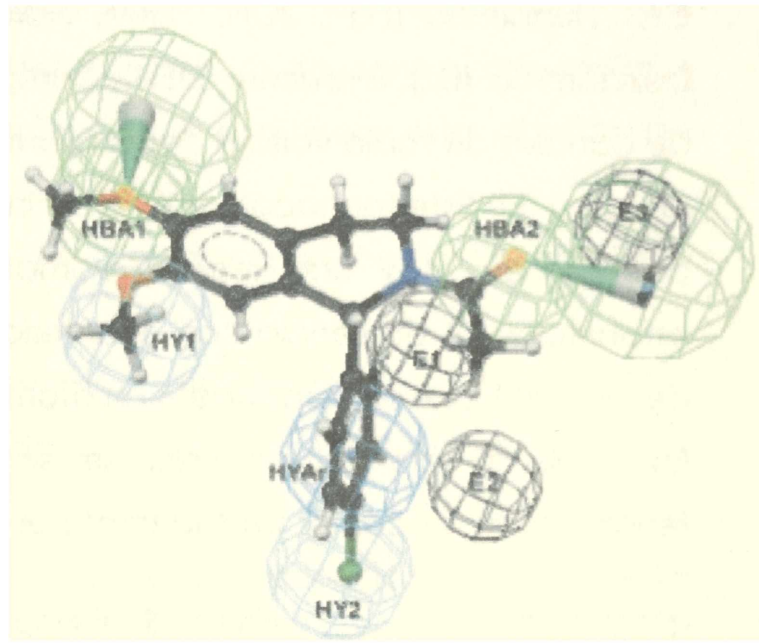


Figura 3. Farmacóforo postulado para compuestos derivados de 1,2,3,4- tetrahidroisoquinolinas .Las regiones en verde corresponden a enlaes H aceptores (HBA1 y HBA2) ; en azul región hidrofóbica aromática (HYAr); en celeste grupos hidrofóbicos (HY1 y HY2); en negro zonas donde los grupos voluminosos disminuyen la actividad (E1,E2,E3). Figura tomada de: De Luca,L.et al. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2006**, 339, 388-400.

Hasta el momento, según nuestro conocimiento, se han postulado tres farmacóforos para compuestos ***bloqueantes de canales de sodio*** a partir de fármacos antiepilépticos estructuralmente disímiles.

Uno de los modelos propuesto[27] se basa en la comparación estructural de CZ, PHE, LAM, ZON y rufinamida (RUF). Este último compuesto se encuentra en la etapa de ensayos clínicos. (Anexo FAES) Basados en este análisis se identificaron tres grupos con diferentes características que deben estar presentes a una distancia bien definida. Estos grupos diferentes incluyen un anillo aromático (R), un átomo donor de electrones (D), cercano a un grupo NH, que define una unidad HAD donora /aceptora de un enlace hidrógeno según las distancias indicadas en la Figura 4.

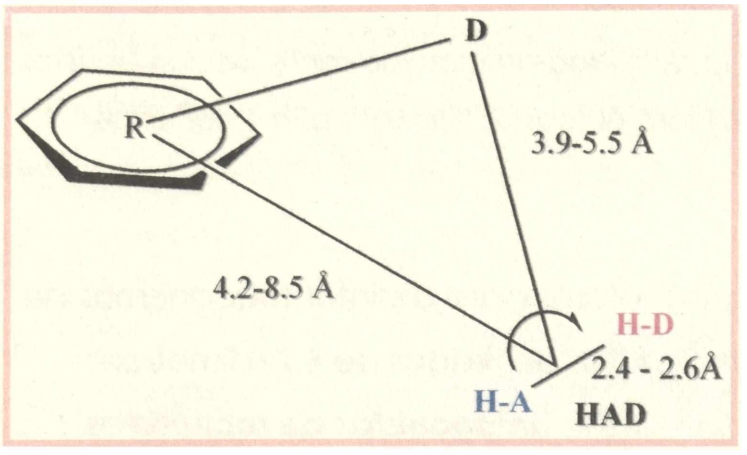


Figura 4. *Patrón farmacofórico* para compuestos bloqueantes de canales de sodio propuesto por Unverferth et.al. Tomada de: Unverferth,K.; Engel, J.; Hjgen,N.; Rostock, A.; Gunther, R.; Lankau, H.; Menzer,M.; Rolfs, A.; Liebscher, J.; Muller, B.; Hofmann, H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 63-73.

Recientemente se planteó un patrón farmacofórico que surgió del análisis de PHE, CZ, Flunarizina (FL) , ZON, LAM, Nafimidona (NA), RUF, Remacemida (RAM), Dezinamida (DZ), Denzimol (DEN), compuestos se sabe que actúan por bloqueo de canales de sodio voltaje dependiente. El farmacóforo propuesto se nuestra en la Figura 5.[28] Este farmacóforo está definido por dos grupo: un grupo (HA/D) donor aceptor de H; y una región aromática (Aro) separada por una distancia establecida. A diferencia con el anterior (Figura 4), no es necesaria la presencia del grupo D que corresponde a un átomo donor de electrones.

En base a este farmacóforo se sintetizaron y evaluaron un conjunto de fenilacetamidas con actividad frente al MES test.[25]

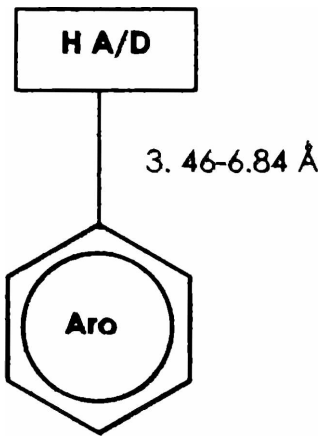


Figura 5. Farmacóforo propuesto para la actividad anticonvulsivante.

H A/D : Grupo donor/aceptor de H.

Aro.: Grupo aromático.Tomado de: Shindikar, A.V., Khan,F.; Viswanathan, C.L. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, *41*, 786–792.

En nuestro laboratorio, estudios que comenzaron hace mas de 10 años, en el cual se utilizaron distintas metodologías, como análisis QSAR (Relación cuantitativa estructura- actividad)[Anexo 1 y 9], cálculo computacional y análisis de similaridad se permitió postular un *patrón farmacofórico de* fármacos anti-MES.[19, 29, 30, 31, 32, , 33]

Dicho estudio comenzó con un análisis 2D-QSAR, en el que se relacionaron descriptores como log P, descriptores del efecto electrónico, cargas, efecto estérico con la ED_{50} de cada uno de los compuestos. Se encontró que el efecto lipofílico es importante para que estos compuestos atraviesen la Barrera Hematoencefálica (BHE), pero el análisis estadístico no fue suficiente para

cuantificar la actividad anticonvulsiva.[36] Estos resultados orientaron a que la limitación descriptiva se podía originar en la conformación molecular.

Por tal motivo, se realizo un estudio conformacional electrónico de un conjunto de valpramidas N-sustituidas seguido de un análisis de similaridad para encontrar las características comunes responsables de la actividad.[34] De esta manera se postulo un farmacóforo, definido por la superposición de los análogos rígidos PHE y CZ, el cual proponía una región polar y una región lipofílica. Esta conformación se tomó como punto de partida para la superposición de compuestos con actividad anti-MES utilizando diversos programas computacionales.[37]

El análisis QSAR reveló la importancia de las características electrónicas del farmacóforo. La cuál se confirmó por posteriores estudios de cargas, con distintos niveles de cálculo, sobre los grupos funcionales que definen esta porción del farmacóforo, representado en la Figura 6 .[35, 36, 39, 41,42]

- Dos centros cargados negativamente (1 y 2) unidos a un centro de densidad positiva (3).
- Un resto hidrocarbonato de por lo menos 3 átomos de C (átomos 5 a 7) acoplado a la región polar por medio de un átomo con hibridación sp^3.

Los requisitos conformacionales están asociados a la orientación espacial de la porción hidrofóbica con respecto a la porción polar que se define por el valor de los ángulos dihedros $\tau 1 = -64°$; $\tau 2 = -152°$; $\tau 3 = 180°$. La distancia del grupo polar al grupo hidrofóbico tomada desde el átomo 1 al 7 es de 5-5.5 Å.

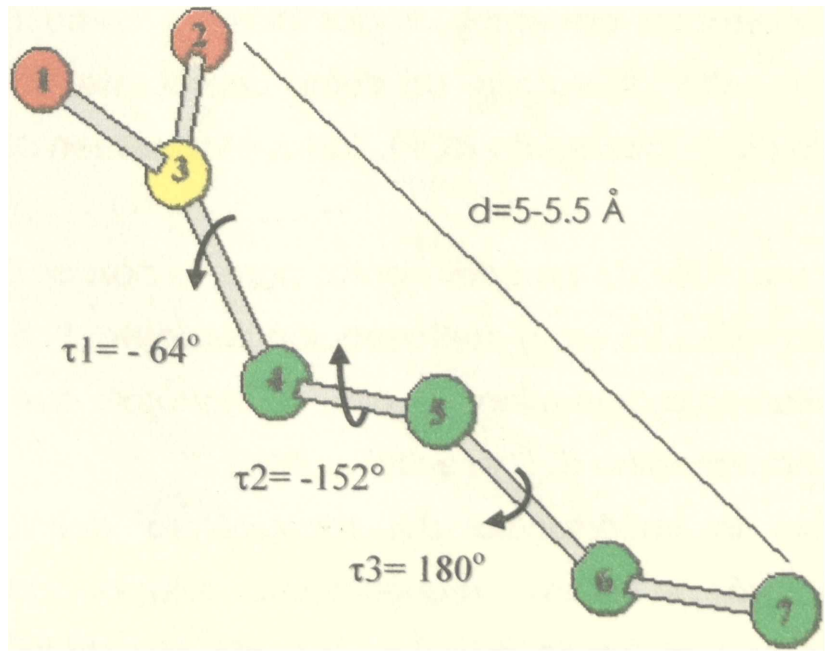


Figura 6. Patrón Farmacofórico para compuestos con actividad anti-MES definido por nuestro grupo de trabajo. 1, 2, 3 átomos que definen la región polar (en rojo cargas negativas en amarillo positiva) átomos 4 -7 definen la región lipofílica.

Con el objeto de validar el patrón farmacofórico postulado se amplió el conjunto de estructuras, incluyendo compuestos que presentan grupos funcionales sulfamato y sulfonamida con actividad anti-MES. Se estudió un conjunto de 14 estructuras entre ellas, anticonvulsivos de uso clínico como Topiramato y estructuras diseñadas y sintetizadas en nuestro laboratorio.[32] Mediante un estudio conformacional, basado en cálculos químicos-cuánticos y análisis de similaridad se validó el farmacóforo[27] definido anteriormente (Figura 6).

Si bien este farmacóforo resultó útil para diseñar nuevas estructuras activas, se observó que muchas otras que cumplían con los requerimientos de éste no presentaban actividad.

Para entender más profundamente la interacción ligando- receptor es necesario considerar las interacciones tridimensionales. Es así que se planteó extender la validez del farmacóforo utilizando una metodología 3D-QSAR.[33]

El análisis 3D-QSAR (Anexo 8) es una metodología que nos permite identificar características espaciales compartidas por las moléculas activas. Su aplicación nos facilitó obtener un farmacóforo que cumpliera las características espaciales.[32, 37]

6. Extensión del Farmacóforo: 3D-QSAR - CoMFA

El patrón farmacofórico postulado por nuestro grupo de trabajo [31] fue validado y extendido a través de un análisis Comparativo de Campos Moleculares (CoMFA) (Anexo 9). El conjunto de prueba se amplió incluyendo 27 estructuras diversas con actividad anti-MES representado a 13 familias estructurales (Figura 7).[33]

En el conjunto de prueba estaban presentes drogas clásicas como PHE, CZ, valpramidas diseñadas en nuestro laboratorio, así como compuestos de nueva generación ZON, Felbamato (FLB), Topiramato (TOP). Todas ellas poseen actividad frente al MES test. [38,39,40,41,42]

El estudio CoMFA requiere una serie de procedimientos para su aplicación entre ellos: 1) la alineación de las moléculas en su conformación bioactiva. Para ello se utilizó la conformación previamente determinada por el farmacóforo que genera de la superposición de Carbamacepina (CZ) y Fenitoína (PHE) .[31]

El estudio 3D-QSAR reveló la importancia del farmacóforo definido con anterioridad[19] y se incorporó un nuevo requerimiento relacionado a un sustituyente voluminoso (Figura 8 a), unido a uno de los extremos de la porción polar del farmacóforo definiendo un ángulo diedro con respecto a la porción polar $\tau 4 = 0°$.

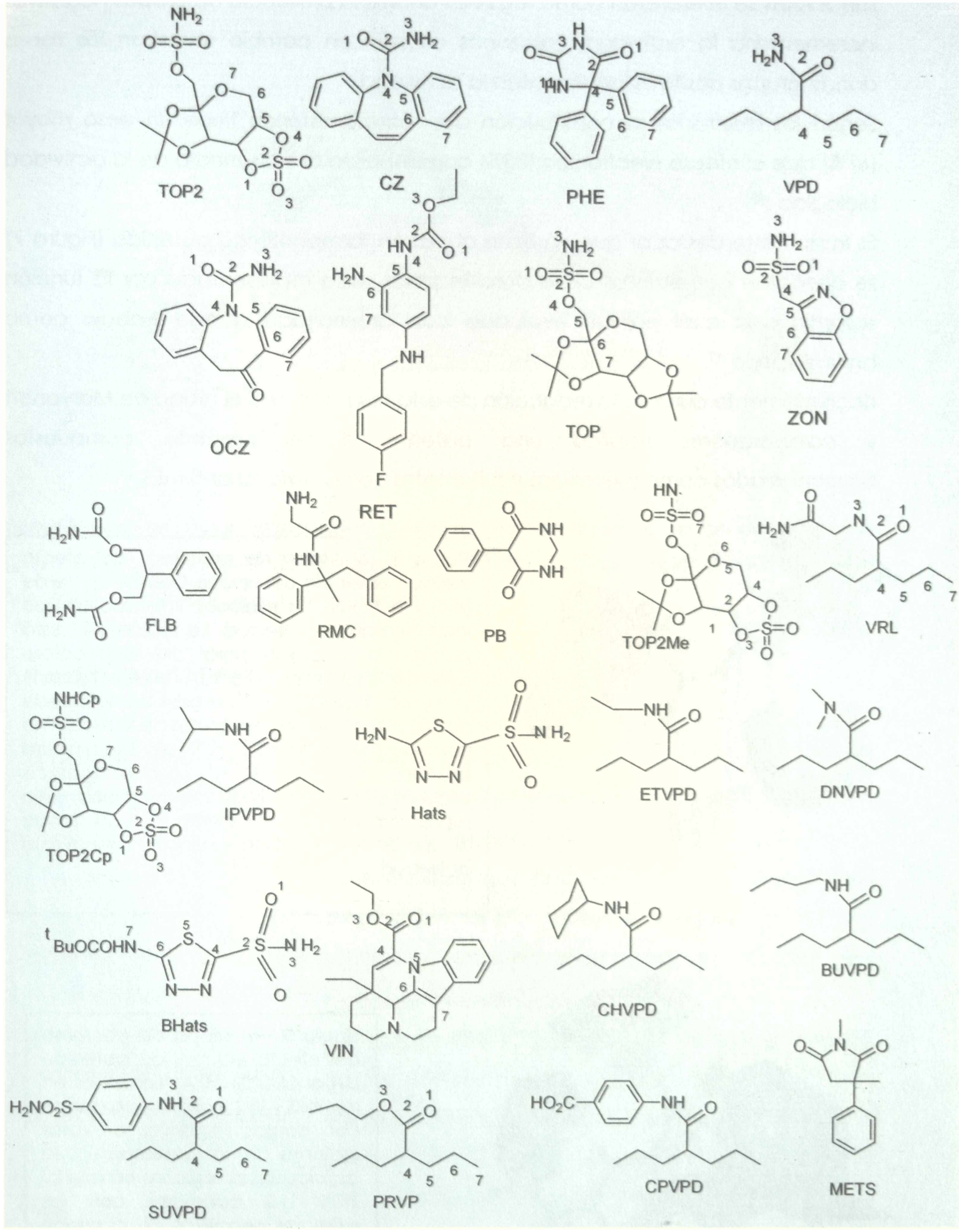


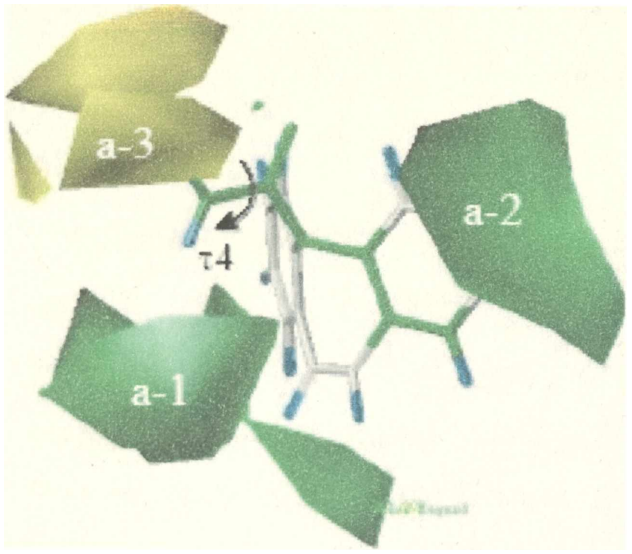
Figura 7. FAES analizados para la obtención del farmacóforo 3D-QSAR.

En el mapa de contornos correspondiente al efecto electrónico (Figura 8 (b)) las zonas rojas se interpretan como regiones donde la presencia de grupos negativos incrementaría la actividad. Las zonas en azul en cambio muestran las zonas donde grupos positivos incrementan la actividad.

Según los resultados la contribución del efecto estérico tiene un peso mayor (67%) que el efecto electrónico (33%) con respecto al incremento de la actividad biológica .[32]

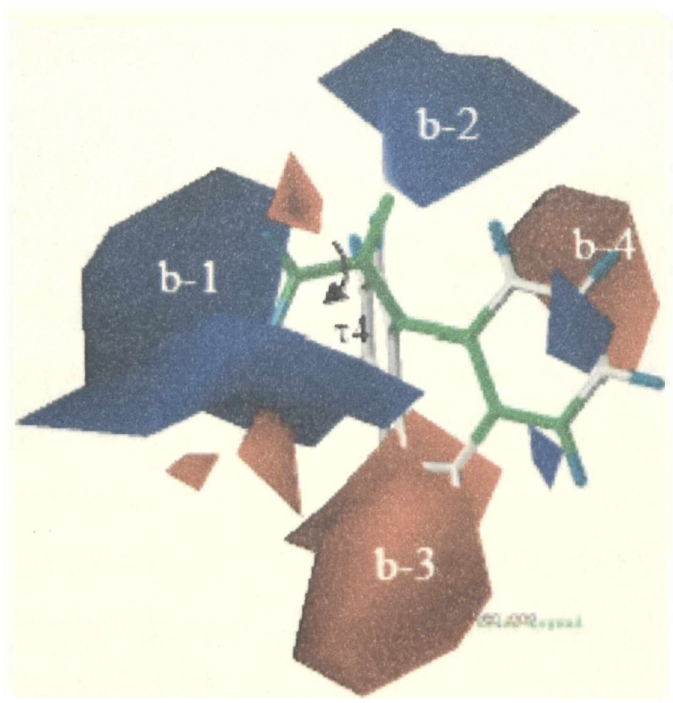
Es importante destacar que en base al patrón farmacofórico obtenido (Figura 7) se diseñaron compuestos cuya porción polar esta representada por la función *sulfamida*, la cuál no fue evaluada con anterioridad a este trabajo como antiepiléptico [32].

Recientemente durante la redacción de esta Tesis Doctoral el grupo de Maryanoff y colaboradores publicó una patente donde presenta compuestos funcionalizados como sulfamidas y sulfamatos con actividad anti-MES.[43]



(a)

Figura 8. (a) Mapa de contorno del efecto estérico obtenido del análisis CoMFA. En verde (a-1 y a-2) las dos regiones voluminosas que incrementan la actividad. La región a-1 está próxima a la región polar del farmacóforo definiendo el ángulo diedro τ4. (Ver Figura 9) Es la más importante. La región a-2 se puede considerar como una extensión de la región no polar del farmacóforo. En la figura 9 se muestra el largo mínimo de la porción lipofílica requerido para la actividad anticonvulsiva. La región amarilla a-3 representa la zona donde el aumento del efecto estérico disminuye la actividad.



(b)

Figura 8. (b) Mapa de contorno del efecto electrónico obtenido del análisis CoMFA . Las zonas en rojo b-3 y b-4 indican que grupos con cargas negativas en estas regiones incrementan la actividad. Las regiones en azul b-1 y b-2 coinciden con los extremos negativos de la región polar del farmacóforo(Figura 9, átomos 1 y 3).

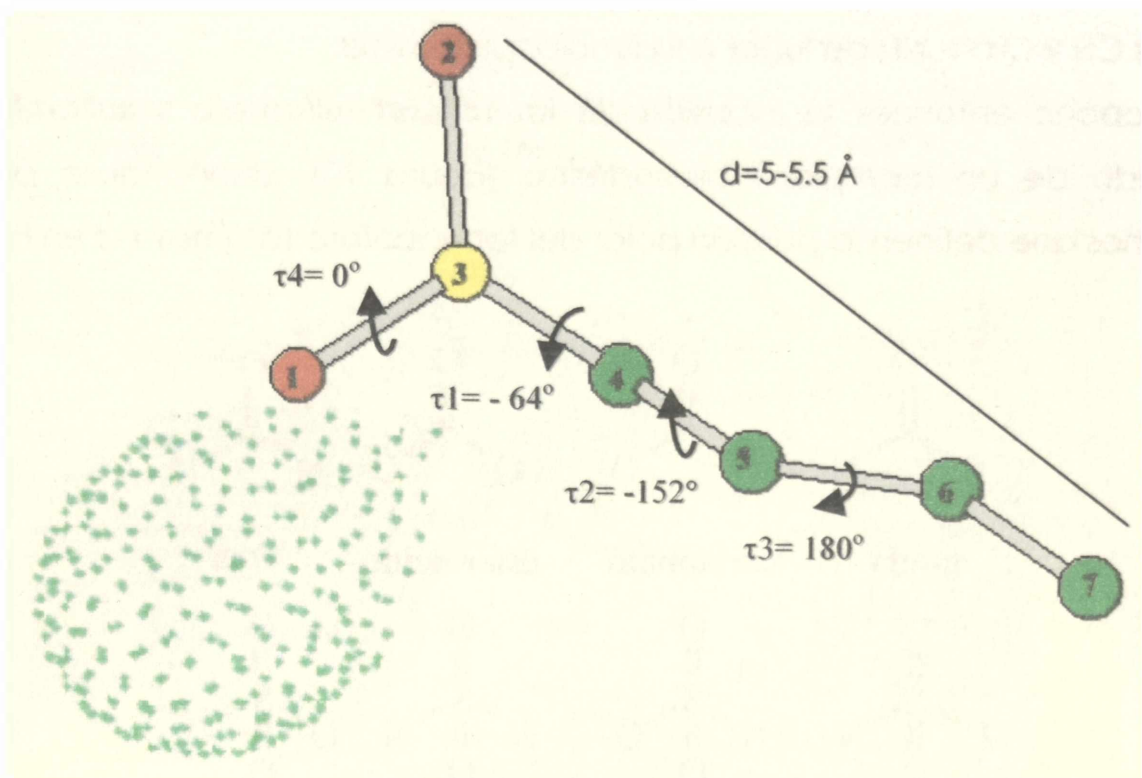


Figura 9. Representación esquemática del farmacóforo extendido obtenido del análisis 3D-QSAR. La región en verde muestra el requerimiento estérico adicional. τ=0° define su orientación con respecto a la porción polar.

7. Funcionalización de la porción polar: Bioisosterismo.

El *bioisosterismo* es una aproximación usada en química medicinal para la modificación de compuestos líderes en agentes más seguros y clínicamente más efectivos.
A menudo este concepto es considerado cualitativo e intuitivo.

Teniendo en cuenta los requerimientos de la porción polar del farmacóforo postulado[33] (Figura 9) se inspeccionaron anticonvulsivos de uso clínico, observándose que éste está presente en funciones *urea, éster, ácido, amida, carbamato, sulfato, sulfamato y sulfonamida* (Figura 7) de los compuestos analizados.

Los grupos NH, CH_2 y O son bioisósteros clásicos (según la ley de desplazamiento de Grimm); mientras que los grupos sulfóxidos y sulfatos son bioisósteros no clásicos capaces de reemplazar al grupo carbonilo[44]. Por lo tanto, las funciones que constituyen la parte polar del farmacóforo cumplen con el requisito de ser bioisósteras. [Anexo 9]

El reemplazo de la función carbonilo por un grupo sulfóxido y la sustitución de los grupos CH y O por NH da lugar a la función *sulfamida*.

Se propone entonces la inclusión de la función *sulfamato* y *sulfamida* como resultado de un reemplazo bioisostérico (Figura 10), diseñándose así nuevas funciones que definen la porción polar del farmacóforo (átomos 1-3 en Figura 9).

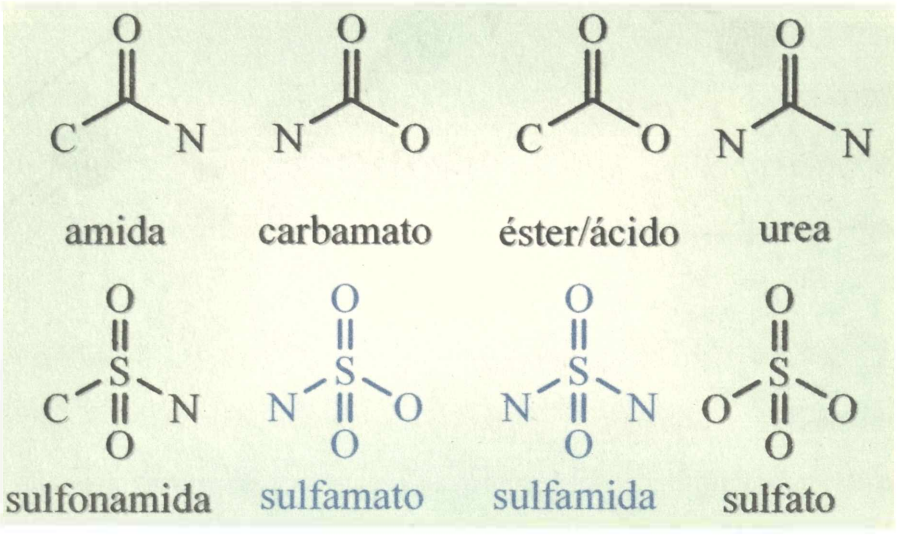


Figura 10. Funciones bioisósteras de drogas antiepilépticas. Corresponden a la porción polar del farmacóforo (en negro). Se resalta la función sulfamato y se incluye la función sulfamida (en azul) como bioisósteros de éstas.

Los compuestos nuevos diseñados y/o seleccionados quedan entonces representados por:

- *Grupo polar*: Sulfamatos y sulfamidas.
- *Porción lipofílica*: Cadenas hidrocarbonadas de tres (3) a seis (6) átomos de carbono. Se incluyen grupos voluminosos en la región próxima al grupo polar que cumplan con el requerimiento estérico adicional planteado en el farmacóforo (Figura 9).

Las estructuras de los compuestos diseñados y/o seleccionados se muestran en la Figura 11. Estas incluyen sulfamidas simétricas di- y tetra- sustituidas, sulfamidas primarias, sulfamidas N-(*tert*butoxicarbonil)-N´-sulfamoil- mono y disustituidas; y cuatro sulfamatos primarios de distinta cadena hidrocarbonada.

8. Estudio electrónico de los grupos *sulfamato y sulfamida* en los compuestos diseñados.

Definidas las funciones *sulfamato* y *sulfamida, por reemplazo bioisotérico,* de la porción polar del farmacóforo, esta aproximación se evaluó mediante la descripción electrónica haciendo uso de métodos químico-cuánticos.

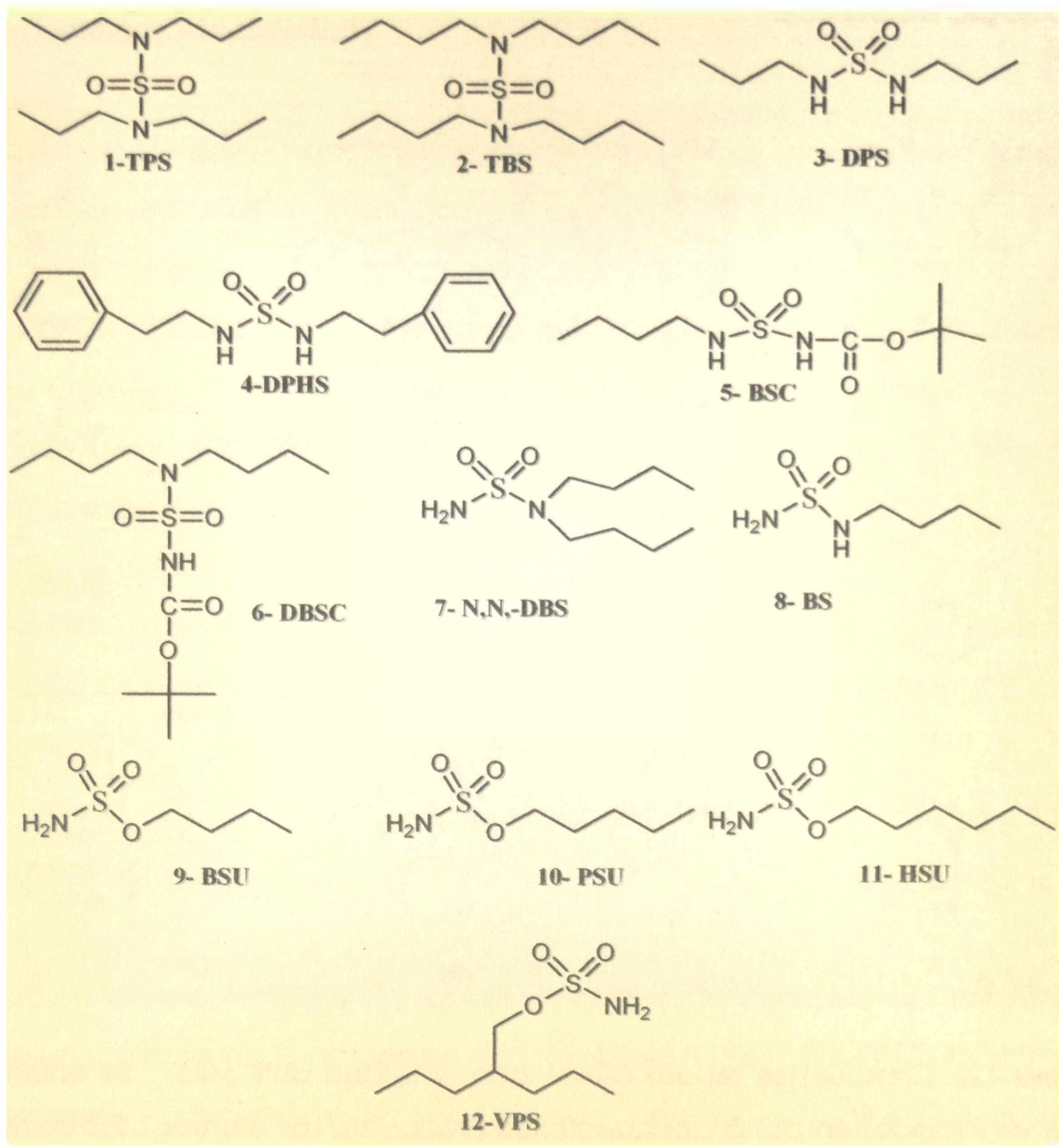


Figura 11. Compuestos diseñados en este trabajo.

Para tal fin, se realizó un calculo de cargas para justificar el cambio biosisoterico observando la influencia de la cadena lipofílica en el calculo de las mismas (Figura 11). Los valores de las cargas sobre los átomos Q1, Q2, Q3 (Ver Figura 4) que definen la porción polar del farmacóforo se compararon con aquellas drogas de uso clínico utilizadas en la definición del farmacóforo (Figura 9: átomos 1, 2, 3). En el estudio de la porción polar se consideraron compuestos incluidos en el *training set* usado para definir el farmacóforo (Fig. 12). Se eligió al menos un compuesto representativo de cada grupo funcional para cubrir todas las funciones bioisosteras con actividad anti-MES. En los casos donde hay más de un compuesto, para un determinado grupo funcional, se eligió aquel cuya ED_{50} frente al MES test es menor, por lo tanto el más potente.

También se incluyeron compuestos derivados del ácido valproico, cuyas actividades anticonvulsivas fueron determinadas en nuestro grupo de trabajo[19], con el objeto de tener mayor diversidad estructural.

9. Metodología empleada

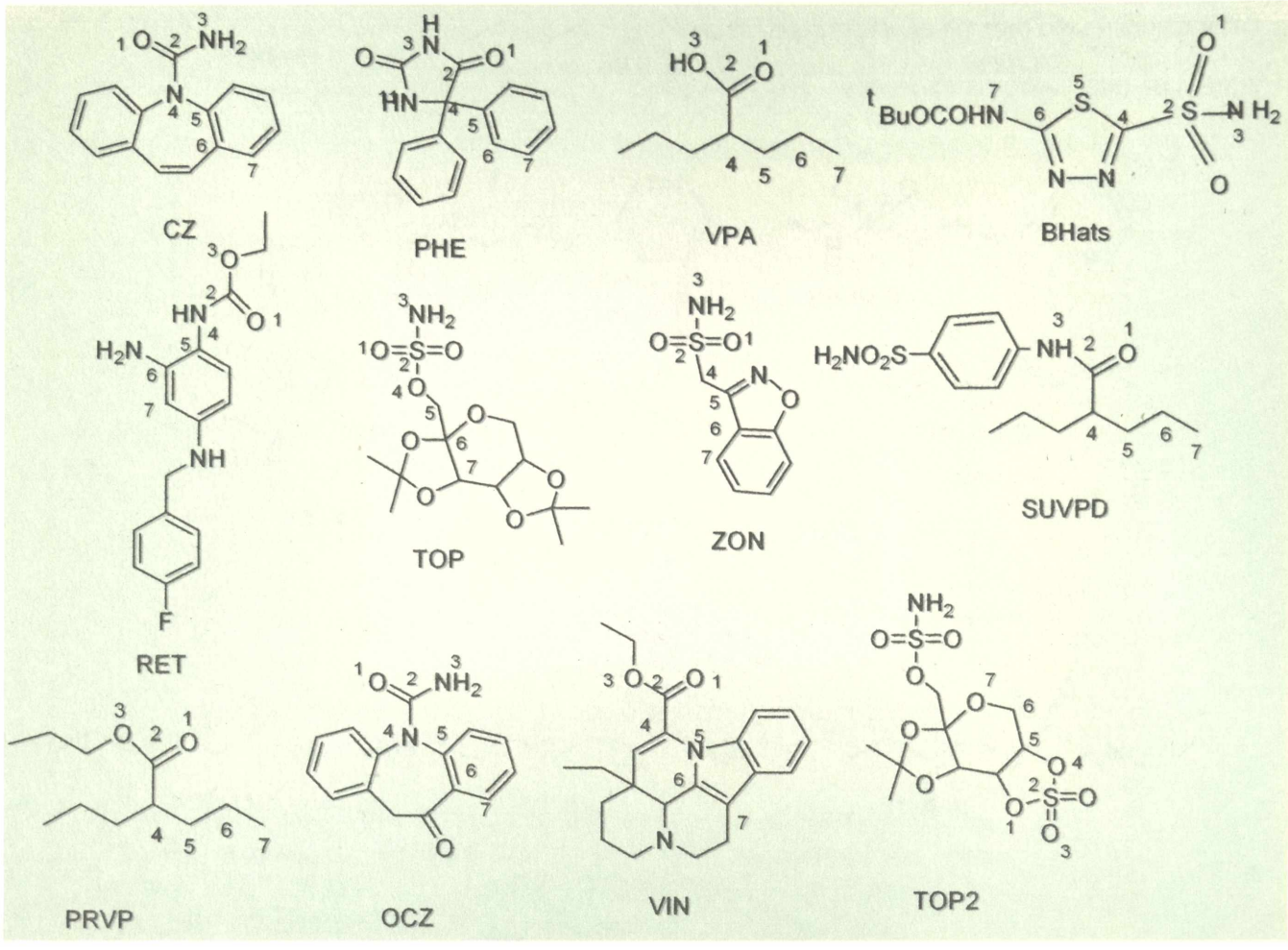


Figura 12. Compuestos de uso clínico con actividad anti- Mes. Se enumeran los átomos incluidos en patrón farmacofórico propuesto. Los átomos 1,2,3 corresponden a la porción polar del farmacóforo.

En el estudio electrónico-estructural de las compuestos diseñados y/o seleccionados se utilizaron diversos programas de química computacional:

- HyperChem 7.01[45]
- Gaussian 98[46]
- Sybyl 6.3[47]

Las estructuras 3D de partida se construyeron mediante el uso del programa HyperChem 7.01. Todas las optimizaciones así como la determinación de la distribución electrónica fueron realizadas por métodos de funcionales de densidad (B3LYP) con bases 6-31G** (G98)[42] utilizando el programa Gaussian 98. El Programa Sybyl 6.3 se utilizó para realizar el análisis de superposición de los compuestos diseñados en base al *patrón farmacofórico* postulado.

9.1 Características electrónicas

En la primer etapa previa a la determinación de la distribución electrónica cada una de las 12 estructuras diseñadas así como el conjunto de estructuras de la Figura 12, se optimizó su geometría utilizando cálculos químico-cuánticos, empleando funcionales de la densidad (B3LYP) con bases 6-31G**, utilizando el programa Gaussian 98, y se buscó la conformación de menor energía.

Para el cálculo de la distribución de cargas, las moléculas se alinean en la conformación activa determinada en un análisis previo.[33]

Las cargas alrededor de los centros atómicos se calculó de densidades de funcionales GAUSSIAN 98 (G98)[47] usando funcionales B3LYP con bases 6-31+ G (d,p).La distribución electrónica se obtiene de calcular potenciales electrostáticos (Chelp G, G98)[48].

9.2 Análisis de superposición

La conformación más estable de cada uno de los 12 compuestos se obtiene por medio de un Cálculo de Funcionales de Densidad (G9839 B3LYP/6-31G**)[47].

Las estructuras optimizadas se superponen con la estructura restringida del farmacóforo utilizando el programa Sybyl[48] versión 6.6 que se corrió en un Workstation Silicon Graphics Octane. La herramienta utiliza para tal fin es *fit atoms*.

Los átomos que definen el *template* se enumeran de 1 a 7 en la Figura 14.

En la superposición con el *template* las estructuras rígidas del *conjunto de prueba* CZ y PHE determinan las características de la conformación bioactiva (Figura 13).

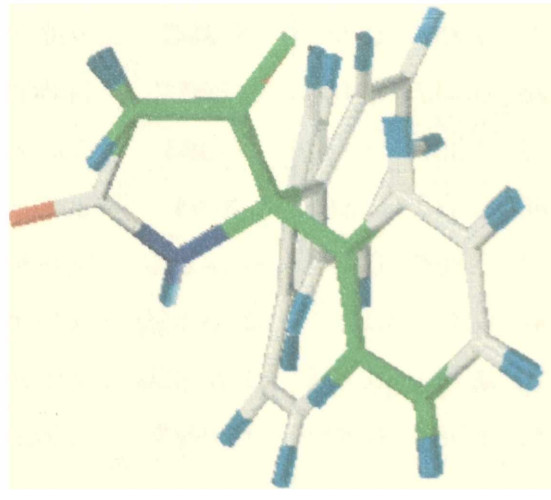


Figura 13. Superposición de los análogos rígidos CZ Y PHE, en verde átomos que definen el farmacóforo.

RMS (Root- Mean- Square).

Cómo medida de la habilidad de las moléculas de adoptar la conformación activa, la impuesta por el patrón farmacofórico, se obtienen los valores de RMS de la superposición de éstas con la estructura del farmacóforo propuesto[33] (Tabla 2).

Definición matemática de RMS

$$RMS = [\Sigma\, d/\, n]^{1/2}$$

d:distancia entre dos átomos superpuestos.

n: número de pares considerados en la superposición.

10. Resultados

Análisis electrónico

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se detallan los átomos de las funciones orgánicas que corresponden a la porción polar del farmacóforo.

Las estructuras que se muestran corresponden a los compuestos de uso clínico que forman parte del conjunto de prueba en la definición del farmacóforo y los compuestos derivados del diseño.

	Función	Q_1	Q_2	Q_3		Función	Q_1	Q_2	Q_3
CZ	Urea	-0.563	0.905	-0.928	**1-TPS**	Sulfamida	-0.464	0.897	-0.437
PHE	Amida	-0.488	0.568	-0.652	**2-TBS**	Sulfamida	-0.464	0.897	-0.437
VPA	Acido	-0.559	0.633	-0.535	**3-DPS**	Sulfamida	-0.466	1.021	-0.729
TOP	Sulfamato	-0.551	1.433	-1.043	**4-DPHS**	Sulfamida	-0.496	0.931	-0.724
ZON	Sulfonamida	-0.481	0.957	-0.870	**5-BSC**	Sulfamida	-0.460	0.925	-0.575
VIN	Ester	-0.518	0.742	-0.468	**6-DBSC**	Sulfamida	-0.454	0.942	-0.639
OCZ	Urea	-0.542	0.850	-0.940	**7-DBS**	Sulfamida	-0.486	0.947	-0.805
BHATS	Sulfonamida	-0.440	0.873	-0.865	**8-BS**	Sulfamida	-0.489	1.014	-0.868
RET	Carbamato	-0.561	0.886	-0.497	**9- n-BSU**	Sulfamato	-0.478	1.135	-0.866
SUVPD	Amida	-0.547	0.717	-0.711	**10- n-PSU**	Sulfamato	-0.480	1.126	-0.858
PRVPD	Ester	-0.516	0.724	-0.496	**11-n-HSU**	Sulfamato	-0.457	1.069	-0.817
TOP2	Sulfato	-0.441	1.064	-0.336	**12-VPS**	Sulfamato	-0.487	1.161	-0.876

Tabla 1. Densidades locales de carga (Q_i) sobre los átomos que definen la porción polar del famacóforo. Los valores provienen del calculo de los potenciales electrostáticos usando B3LYP/6-31G**. Izquierda: grupo de 12 compuestos con probada actividad anti-MES que representan a los distintos grupos funcionales. Derecha: 12 sulfamatos y sulfamidas diseñados en este trabajo.

Análisis de Superposición

En la figura 14 se muestran el conjunto de las 12 estructuras diseñadas superpuestas en la conformación establecida por el farmacóforo.

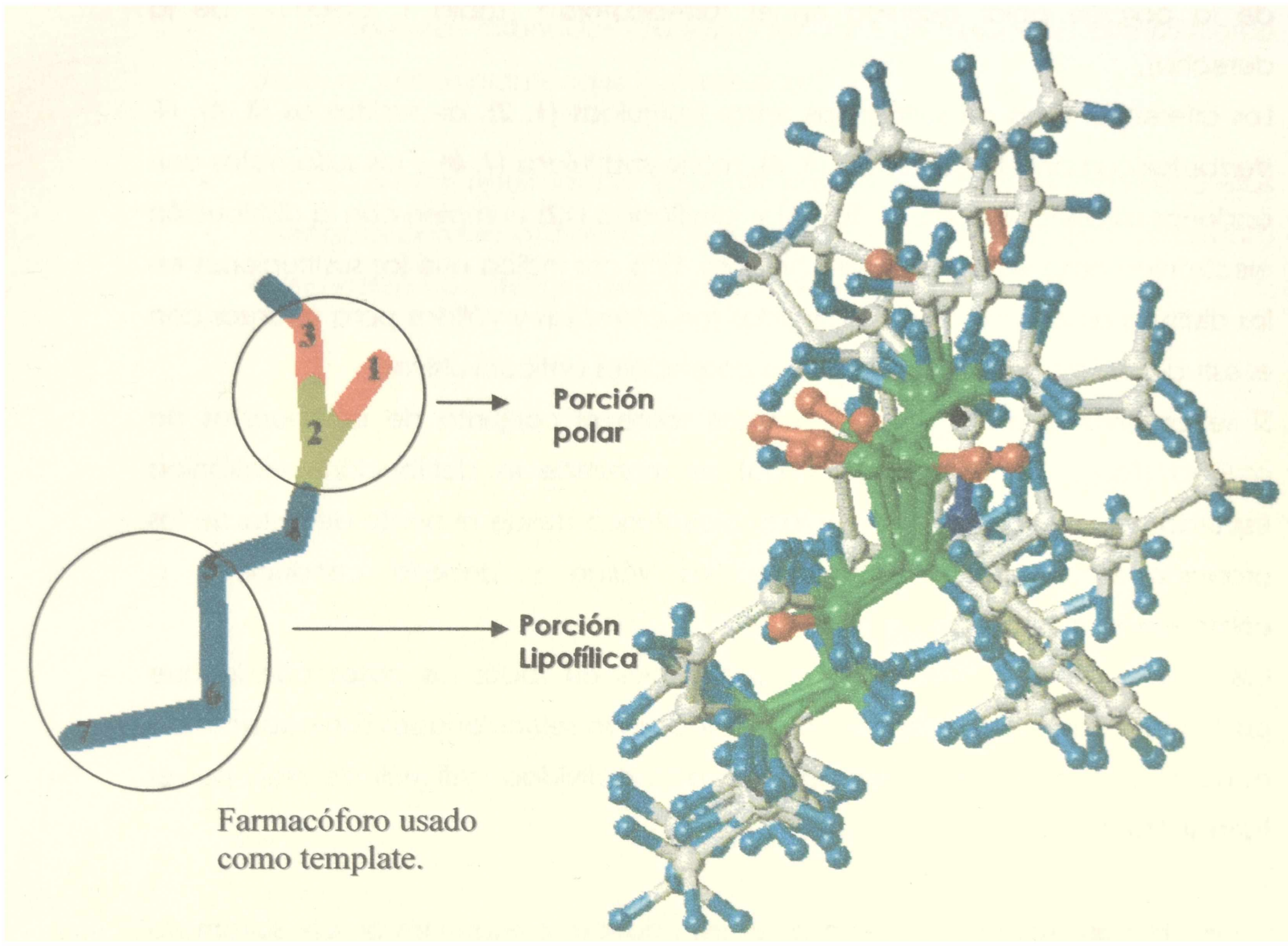


Figura 14. Superposición de los 12 compuestos diseñados en la conformación bioactiva definida por las estructuras de CZ y PHE. En verde se observan los átomos que definen al farmacóforo.

Compuestos	RMS	Compuestos	RMS
1-TPS	0.277	**7-DBS**	0.288
2-TBS	0.396	**8-BS**	0.278
3-DPS	0.269	**9- n-BSU**	0.271
4-DPHS	0.255	**10- n-PSU**	0.274
5-BSC	0.242	**11-n-HSU**	0.278
6-DBSC	0.437	**12-VPS**	0.274

Tabla 2. Valores de RMS obtenidos por superposición de los compuestos diseñados con el farmacóforo postulado para la actividad anti-MES.

11. Discusión de los resultados

Del análisis de cargas sobre los compuestos diseñados se observa que la distribución electrónica es en todos los casos compatible con las características de la porción polar definida en el farmacóforo[14] (Tabla 1, columna de la derecha).

Los diferentes tipos de sulfamidas tetra- sustituidas (**1**, **2**), di- sustituidas (**3**, **4**), N-(*tert*butoxicarbonil)-N´-sulfamoil- (**5**, **6**), mono-sustituidas (**7**, **8**) y los sulfamatos con cadenas alifáticas lineales (**9**, **10**, **11**) y ramificada (**12**) cumplen con la distribución electrónica propuesta por el farmacóforo. Esto nos indica que las sustituciones en los distintos grupos funcionales elegidas son correctas y válidas para avanzar con el estudio de estos compuestos como potenciales anticonvulsivos.

Si se observa la distribución de cargas sobre el conjunto de compuestos de prueba (Tabla 1, columna izquierda) se mantiene la distribución electrónica esperada. Por lo tanto, el reemplazo bioisotérico desde el punto de vista de las propiedades electrónico-estructurales es válido y debería conducirnos a compuestos activos frente al ensayo MES.

Los valores de RMS (Tabla 2) son aceptables en todos los casos con lo que podemos decir que los compuestos diseñados y/o seleccionados son capaces de adoptar la conformación necesaria para la actividad anti-MES definida por el farmacóforo utilizado. [31]

- El reemplazo bioisosterico propuesto donde se eligen los grupos sulfamato y sulfamida queda validado con el análisis electrónico-estructural realizado utilizando métodos computacionales.

- La elección de las cadenas lipofílicas presentes en los sulfamatos y sulfamidas diseñados no influyen en la distribución de cargas sobre la porción polar definida por el farmacóforo postulado.

- Si bien las estructuras diseñadas son simples todas ellas cumplen con los requerimientos mínimos para la actividad anti-MES según el farmacóforo propuesto[33].

- Según el análisis de superposición se observa que todas las estructuras propuestas pueden adoptar la conformación activa ya que superponen con valores de RMS de 0.24-0.28 para diez de los compuestos y de

aproximadamente 0.40 para dos de ellos, siendo valores estadísticamente aceptables.

- En este paso nos encontramos en condiciones de predecir la actividad de los compuestos diseñados y/o seleccionados en función al cumplimiento de los requisitos planteados (farmacóforo).

- En base a estos resultados el siguiente paso es la síntesis de los compuestos diseñados para su posterior evaluación farmacológica, la que confirmará o rechazará los criterios utilizados en su diseño.

Referencias

[1] World Health Organization 2006. Epilepsy: etiology, epidemiology and prognosis; Fact sheet N°165, Revised February **2001**. Sitio Web: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/en/.

[2] Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires. Actualizado Diciembre, **2005**. Sitio Web: : http://www.ms.gba.ar/Informes/Epilepsia.htm

[3] Grimm Jonathan B., Stables James P., Browna Milton L., *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 4133–4141.

[4] White H. Steve; *Epilepsia*, **2003**, 44, 2-8.

[5] Reijs R., Aldenkamp A.P., De Krom M.; *Epilepsy & Behav.* , **2004**, *5*, S66-S76.

[6] Brod, M.J. *Lancet*, **1990**, *336*, 93-96.

[7] Lindhout, D., Omtzigt, J.G.C. *Epilepsia*, **1994**, *35 Suppl 4*, S19-S28.

[8] Löscher, W.; Leppik, I.E.*Epilepsy Res.* **2002**, *50*, 17.

[9] Anger, T.; Madge, D.; Mulla, M.; Riddall, D. *J.Med. Chem.* **2001**, *51*, 31.

[10] Vamecq, J.; Bac, P.; Herrenknecht, C.; Maurois, P.; Delcourt, P.; Stables, J. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 1311.

[11] Ragsdale, D.S., Avoli, M. *Brain Research Reviews*, **1998**, *26*, 16-28.

[12] Vamecq, J.; Bac, P.; Herrenknecht, C.; Maurois, P.; Delcourt, P.; Stables, J. *J.Med.Chem.* **2000**, *43*, 1311.

[13] Taylor, Ch.P.Cap 69: Mechanisms of new Antiepileptic Drugs. En: Delgado-Escueta, A.V.; Wilson, W.A.; Olsen, R.W.; Porter, R.J.(Eds.), *Jasper's Basis Mechaninsm of the Epilepsies*, 3rd Ed.: *Advances in Neurology, Vol 79.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **1999**, 1011-1026.

[14] Ragsdale, D.S., Avoli, M. *Brain Research Reviews*, **1998**, *26*, 16-28.

[15] Catterall, W.A. Molecular Properties of Brain Sodium Channels: An Important Target for anticonvulsant Drugs. Jasper´s Basic Mechanism of the Epilepsies. 3rd Edition : Advances in Neurology, *Vol. 79.*, edited by: A.V. Delgado-Escueta, W.A. Wilson, R.W. Olsen, R.J. Potter. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **1999**.

[16] Taylor, C.P.; Meldrum, B.S. *Review, TIPS*, **1995**, *16*, 309-315.

[17] Ragsdale, D.S., Avoli, M. *Brain Research Reviews*, **1998**, *26*, 16-28.

[18] Clare, J.J.; Tate, S.N.; Nobbs, M.; Romanos, M.A. Drug Discovery Today, **2000**, *5 (11)*, 506-520.

[19] Tasso S. M.; Moon S. C.; Bruno-Blanch L. E.; Estiú G. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3857.

[20] Bazil, C.W, Pedley, T.A. *Ann.Rev.Med.*, **1998**, *49*, 135.

[21] Balbes, L.M.; Mascarella, S.W.; Boyd, D.B. Chapter 7: *A perspective of Modern Methods in Computer Aided Drug Design* En: Lipkowitz, K.B.; Boyd, D.B.(Eds.)

Reviews in Computational Chemestry, Vol.5, VCH Publishers, Inc., New York, **1994**, 337-379.

[22] Malawska, B.; Kulig K.; Spiewak A.; Stables, J.P. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 625.

[23] Malawska, B.; Kulig K.; Spiewak A.; Stables, J.P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, *12*, 625.

[24] Pandeia, S. N.; Raja, A. S., *J. Pharm. Sci.* **2002**, 266.

[25] Cox, B.; Nobbs, M. S.; Shah, G.P.; Edney, D.D.; Loft, M.S.; Patent WO9932462, **1999**.

[26] De Luca, L.; Gitto, R.; Barreca, M.L.; Caruso, R.; Quartarone, S.; Citraro, R.; De Sarro, G.; Chimirri, A. *Arch Pharm (Weinheim)*. **2006 Jun 19**; [Epub ahead of print].

[27] Unverferth, K.; Engel, J.; Hojgen, N.; Rostock, A.; Gunther, R.; Lankau, H.; Menzer, M.; Rolfs, A.; Liebscher, J.; Muller, B.; Hofmann, H.*J.Med.Chem.* **1998**, *41*, 63.

[28] Shindikar, A.V., Khan,F.; Viswanathan, C.L. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, *41*, 786–792.

[29] Bruno-Blanch, L.E.; Estiú, G. *Int. J. of Quantum Chem.: Quantum Biology Simposium*, **1995**, *22*, 39-49.

[30] Tasso, S.; Bruno-Blanch, L.E.; Estiú, G. L. *Int. J. of Quantum Chem.: Quantum Biology Simposium*, **1997**, *65*, 1107-1114.

[31] Tasso, S.M.; Bruno-Blanch, L.E.; Moon, S.C.; Estiú, G.L. *J. Mol. Structure (Theochem)*, **2000**, *504*, 229-240.

[32] Barrios, I. A.; Bruno-Blanch, L.E.; Estiú, G.L. *J. Mol. Structure (Theochem)*, **2002**, *580*, 243-250.

[33] Gavernet, L.; Dominguez Cabrera, M. J.; Bruno-Blanch, Luis E.; Estiú, G.L. *Biorg. Med. Chem.*, **2006**, aceptado.

[34] Tasso, S.; Bruno-Blanch, L.E.; Estiú, G. L. *Int. J. of Quantum Chem.: Quantum Biology Simposium*, **1997**, *65*, 1107-1114.

[37] Tasso, S. M. Tesis Doctoral para acceder al Título de Doctor en Filosofía y Farmacia, **2003**, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

[36] Tasso S.; Bruno-Blanch L.; Estiú G.L. *Journal of Molecular Modeling*, **2001**, *7*, 231.

[37] Gavernet, Luciana. Tesis Doctoral para acceder al Título de Doctor en Filosofía y Química, **2006**, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

[38] White, H. S. *Epilepsia* **2003**, 44 (suppl.7), 2.

[39] Bialer, M.; Johannessen S. I.; Kupferberg H. J.; Le vy R. H.; Loiseau R. H.; Perucca, E. *Epilepsy Res.* 43, **2001**, 11.

[40] White, H.S. *Epilepsia* **1999**, 40 (Suppl. 5), S2.

[41] Pugsley, M. K.; Yu, E. J.; Mc.Lean, T. H.; Goldin, A. L. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **1999**, 42, 105.

[42] Chufan, E. E.; Pedregosa, J. C.; Baldini, O. N.; Bruno-Blanch, L. E. *Il Farmaco* **1999**, 54, 838.

[43] McComsey, D.; Parker, M.; Reitz, A.B.; Maryanoff, B.E. International Publication Number: WO 2006/007435 A1., **2006**, US.

[44] Patani G. A.; LaVoie E. J.; *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 3147.

[45] *Hyperchem 5.1 for Windows*. Hypercube Inc. Gainsville, FL. **1997.**

[46] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A. Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu ,G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A., **1998**, Gaussian 98, Revision A.9 Gaussian Inc., Pittsburgh PA.

[47] SYBYL 6.6; Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO 63144 USA.

[48] Breneman, C.N.; Wiberg, K.B. *J. Comp.Chem.*, **1990**, *11*, 361-369.

Capítulo 2

Síntesis Química

1- Introducción

Un 75% de los fármacos que actualmente se encuentra en el mercado son producidos por *síntesis total*. El otro 25% lo cubren los compuestos de *semisíntesis*, preparados por modificación parcial de productos naturales, y un tercer grupo se obtiene por métodos fermentativos o por métodos de síntesis químico-biológicos, *(biotecnología)*.[1]

En lo que respecta a los *métodos químicos*, que son los utilizados en el presente trabajo, y los mayormente utilizados en la industria farmacéutica, no debe hablarse de una síntesis orgánica tradicional ya que dentro del terreno experimental de la síntesis química se han introducido grandes cambios en la preparación a gran escala de productos farmacéuticos, como es el uso de altas presiones, atmósfera inerte, temperaturas muy bajas, reactivos soportados sobre diferentes tipos de materiales, etc.[1]

A continuación se describirá la planificación de síntesis, a escala de laboratorio de los compuestos diseñados.

2. Planificación de síntesis

La síntesis de las estructuras diseñadas, se realizó luego de una planificación racional de las rutas sintéticas, teniendo en cuenta la funcionalización presente en cada una de las moléculas objetivo.

Se logró realizar una planificación exitosa de la síntesis de sulfamatos y sulfamidas a partir de los correspondientes alcoholes y aminas respectivamente, la cual exigió un orden secuencial de reacciones, teniendo en cuenta la posición de los grupos funcionales, su estereoquímica, reactivos a utilizar, etc.

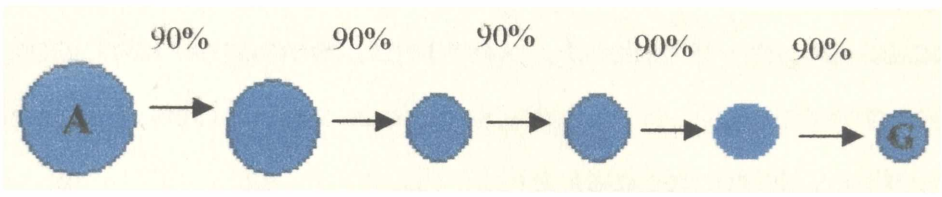
Al diseñar una síntesis de debe pensar hacia atrás, desde lo complejo a la sencillo, de modo que en la práctica podamos trabajar racionalmente de lo sencillo a lo complejo. Dicha metodología de planificación, ya probada, se basa en el desarmado molecular teórico de la molécula objetivo en unidades llamadas sintones. La planificación del camino experimental (sentido inverso al teórico), o ruta sintética, que se perfile más promisorio, permitirá unir estos sintones a fin de sintetizar la molécula buscada. La planificación de síntesis tiene en cuenta:

i) la información disponible en la literatura: particularmente interesantes son los resultados obtenidos por otros investigadores que han efectuado con éxito la síntesis que deseamos.

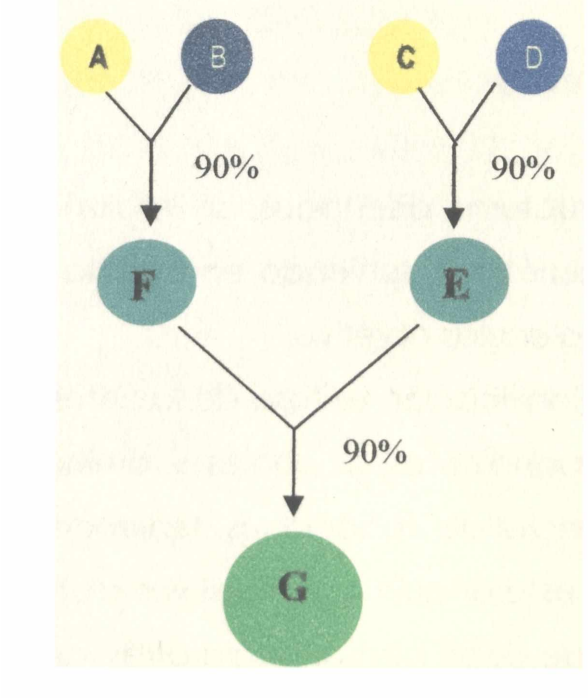
ii) disponibilidades experimentales del laboratorio.

El criterio útil a seguir es buscar el menor número posible de pasos sintéticos ya que pocas reacciones incrementan el rendimiento global.

Por otra parte se debe tener en cuenta que a igualdad de pasos es importante el orden en que se realizan dichos pasos siendo preferibles *síntesis convergentes*, en la que el paso final enlaza dos procesos separados donde el rendimiento total de la reacción es mejor que el de una *síntesis lineal*[2](Figura 1). En reacciones que requieren de muchos pasos, como por ejemplo la síntesis de polipéptidos, la ventaja de una síntesis convergente a una lineal es realmente importante.[2]



Síntesis lineal de seis pasos. **Rdto Global**: 53.1%



Síntesis convergente. **Rdto Global**: 72.9%

Figura 1. Síntesis lineales y convergentes. Comparación en el rendimiento entre una reacción de seis pasos donde se usa una síntesis lineal y una síntesis convergente.

3. Sustancias de partida.

El proceso de planeamiento sintético implica reducir el compuesto final complejo a moléculas sencillas a partir de las cuáles es posible obtenerlo. Cuando nos referimos a sustancias de partida o materias primas implica generalmente compuestos asequibles comercialmente o que se pueden sintetizar mediante procedimientos de laboratorio ya descritos en la literatura. Las sustancias de partida utilizadas en el trabajo sintético, pueden ordenarse en dos categorías:

- sustancias comercialmente asequibles
- sustancias que se preparan o deben prepararse en un laboratorio de síntesis orgánica.

4. Tipo de estructuras sintetizadas

4.1 Sulfamatos y Sulfamidas

Los tipos de compuestos preparados en este trabajo de Tesis se presentan en la Fig. 2. Abarcan sulfamidas simétricas N,N'-di-sustituidas (**1**) y tetra-sustituidas (**2**), sulfamidas monosustituidas (**3**), y *N,N*-di-sustituidas(**4**).

Sulfamidas *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*'-mono sustituida(**5**) *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N*',N'-di-ustituidas(**6**). Los compuestos tipo **5** y **6** son intermediarios en la síntesis de los compuestos **3** y **4**.

Se prepararon sulfamatos primarios (**7**), sin sustitución sobre el átomo de Nitrógeno.

Todos los compuestos cumplen con los requerimientos del patrón farmacofórico, según lo requerido por el diseño racional, por lo que fueron sintetizados, purificados y caracterizados para su evaluación farmacológica como anticonvulsivos.

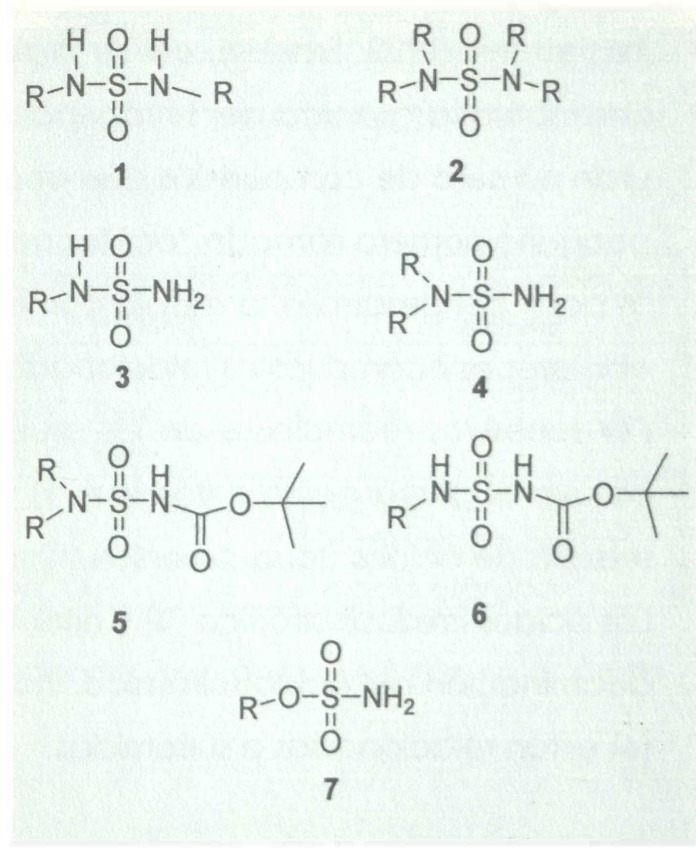


Figura 2. Estructura general de sulfamidas y sulfamatos preparados en este trabajo de Tesis.

5. Química de sulfamidas y sulfamatos.

Las sulfamidas y sulfamatos a preparar se pueden clasificar como derivados del ácido sulfámico NH_2SO_3H (Esquema 1 y 5). A su vez el ácido sulfámico y los reactivos sulfamoilantes derivados de éste, en sus formas de azidas o cloruros pueden ser utilizados como precursores versátiles en la síntesis de compuestos que contienen el grupo sulfamido.[3] En nuestro caso en particular las sulfamidas y sulfamatos fueron sintetizadas a partir de cloruro de sulfurilo (SO_2Cl_2) o bien del agente sulfamoilante clorosulfonil isocianato (CSI) dependiendo del tipo de compuesto buscado.

5.1 Acido sulfámico.

El *ácido sulfámico* se preparó por primera vez en 1878 por Berglund[4] pero recién en 1887 Raschig[5] descubrió un método simple para su preparación y éste comenzó a ser un compuesto de interés químico.

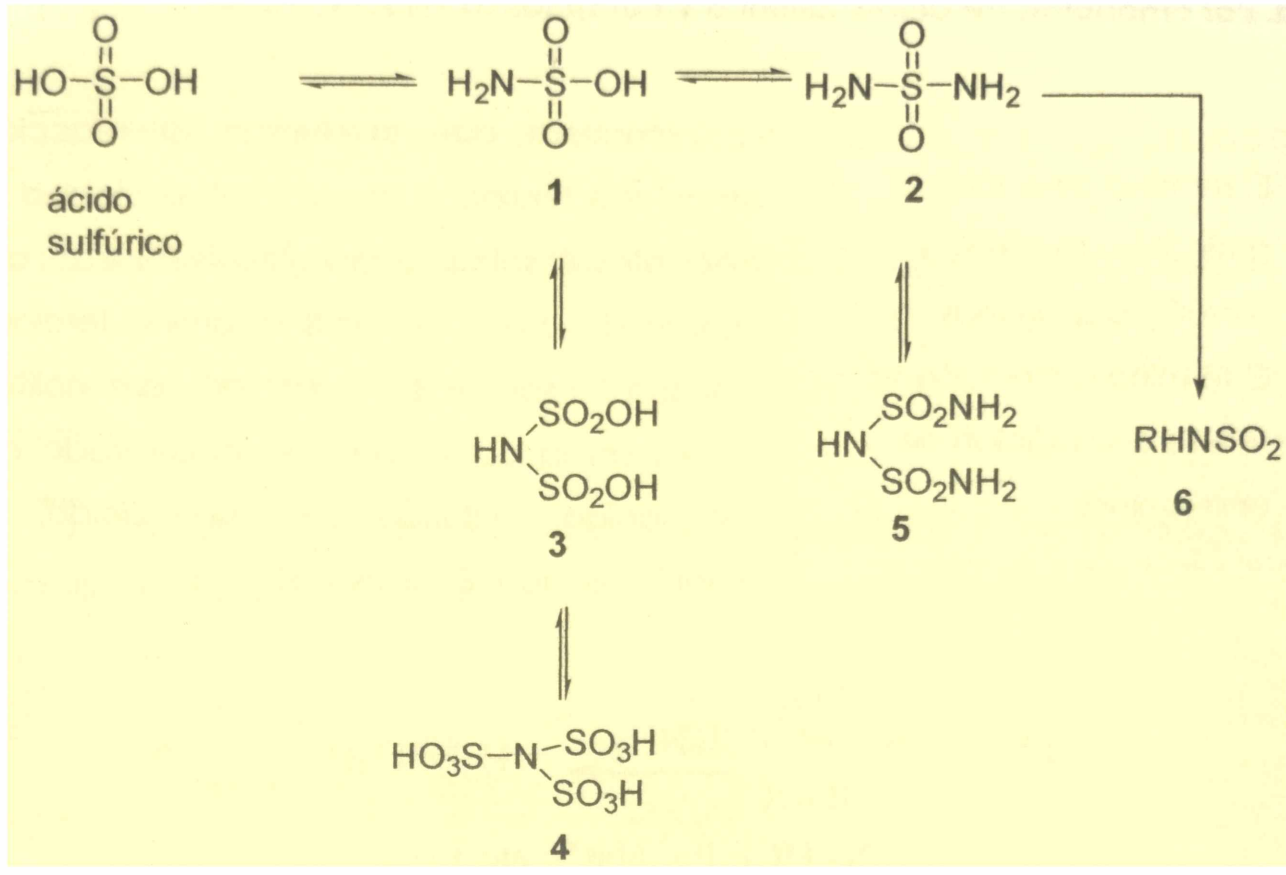
Se denominaba *ácido amidosulfónico* pero actualmente se denomina *ácido sulfámico* por su relación estructural con el *ácido carbámico:* NH_2COOH.

Recién en 1932 Franklin en su trabajo *The Nitrogen System* of *Compounds*[6] sistematizó la química del *Nitrógeno* y puso especial atención con respecto a un gran número de compuestos que podían ser considerados como derivados de un pequeño número llamado "*ácidos acuo-amoniosulfúricos*" .

A partir del desarrollo, a escala comercial del *ácido sulfámico* en 1939[7,8], resurgió el interés por compuestos relacionados con enlaces **nitrógeno-azufre**.

Por sucesivos reemplazos de los grupos hidróxilos del *ácido sulfúrico* por NH_2 se obtuvo el grupo ácido sulfámico (**1**) y *sulfamida* (**2**) formalmente ambos son una mezcla de ácidos acuo-amoniosulfúrico (Esquema 1).

Los ácidos imidodisulfónico (**3**) y nitrilosulfónico (**4**) son considerados productos de deaminación del ácido sulfámico. Imidodisulfamida(**5**), así como las sulfonamidas (**6**) están relacionadas a sulfamidas.



Esquema 1. Compuestos con enlaces **N-S** derivados del ácido sulfúrico.

La relación entre los compuestos ácidos aminosulfónicos acuosos y los *ácidos acuo-amoniocarbánicos* se muestra en tabla 1. Esta comparación de similaridad entre estos grupos resultó útil en un principio para enumerar las propiedades y reacciones relacionadas a los ácidos acuo-amoniosulfúricos.

Compuestos relacionados **a $SO_2(OH)_2$**		Compuestos relacionados a **$CO(OH)_2$**	
Fórmula	**Nombre**	**Fórmula**	**Nombre**
H_2NSO_2OH	**Ácido sulfámico**	H_2NCOOH	Ácido Carbámico
$H_2NSO_2NH_2$	**Sulfamida**	H_2NCONH_2	Urea
$HN(SO_2NH_2)_2$	Imidodisulfamida	$HN(CONH_2)_2$	Biuret
$HN(SO_2OH)_2$	Ácido Imidodisulfónico	$HN(COOH)_2$	Ácido imidodicarbónico
$RHNSO_2$	Sulfonamida	HNCO	Ácido ciánico

Tabla 1. Mezcla de ácidos acuo-amonio relacionados al ácido sulfúrico y al ácido carbámico.

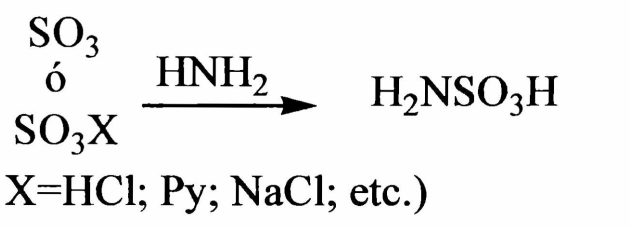
5.2. Preparación de ácido sulfámico.

A continuación se describen brevemente cuatro métodos para la preparación de *ácido sulfámico* que enfatizan su carácter de *ácido acuo-amoniosulfúrico*.[9]

a. Por amonólisis de ácido sulfúrico y compuestos relacionados.

> El termino *amonólisis o aminólisis* se refiere a solvólisis por aminas.
> El término *aminación* se refiere a la adición de una amina.

Los procesos que involucran la reacción de amoníaco líquido o acuoso sobre cloro o fluoro-sulfonatos [10] sobre ácido nitrosilsulfúrico[11] o sobre trióxido de azúfre en piridina, amina terciaria[12] y dioxano[13] son de carácter amonolítico e involucran la conversión de un derivado acuoso del ácido sulfúrico en un ácido acuo-amoniosulfúrico (Ecuación 1).



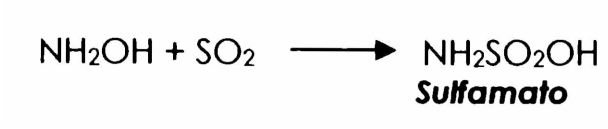
Ecuación 1. Obtención de ácido sulfámico por aminólisis de ácido sulfúrico y compuestos relacionados.[14]

b. Por nitridación de dioxido de azufre, ácido sulfuroso, sulfitos e hidrosulfitos.

En algunos casos el ácido sulfámico se puede obtener directamente, en otros casos se forman ácidos acuo-amoniosulfúricos que se hidrolizan a ácido sulfámico (ejemplo a). El método de Raschig que involucra la reacción de dióxido de azufre con la sal de hidroxilamina en solución acuosa o en presencia de piridina, se puede interpretar como la nitridación del azufre tetravalente S(IV) a un estado hexavalente (VI) con la correspondiente reducción del nitrógeno al estado de amoníaco.[9]

> El **S** (azufre) se presenta en tres estados de oxidación: S(II), S(IV), y S(VI).
> A su vez presenta estados de coordinación que van del 0 al 7.

Las sales de hidroxilaminas y bisulfitos reaccionan de igual manera dando sulfamatos.[13]



c. Hidrólisis de ácidos acuo-amoniosulfúricos.

- La hidrólisis de nitrosulfonatos e imidodisulfonatos da lugar a ácido sulfámico.[15]
- La hidrólisis de sulfamidas en solución alcalina ocurre según la ecuación :

$$NH_2SO_2NH_2 + NaOH \longrightarrow NH_2SO_2ONa + NH_3$$

- La hidrólisis ácida de imidodisulfamidas conduce a la formación de sulfamida y ácido sulfámico.[16]

$$HN(SO_2NH_2)_2 + HOH \xrightarrow{H^+} NH_2SO_2OH + NH_2SO_2NH_2$$

Todas estas reacciones son ejemplos de hidrólisis parciales de ácidos acuo-amoniosulfúricos que llegan hasta la formación de ácido sulfámico.

d. Hidrólisis de ácidos N-acil sulfámicos.

El proceso de obtención industrial de ácido sulfámico por reacción de urea con ácido sulfúrico fumante (Ecuación 1) ha sido modificado para obtener rendimientos del orden de 98%.[17]

$$(NH_2)_2CO + SO_3 \longrightarrow H_2NCONHSO_3H + H_2SO_4 \longrightarrow NH_2SO_3H + CO_2$$

Existe una patente para la preparación industrial de ácido sulfámico y sulfamato de amonio por reacción de amoníaco y trióxido de azufre. [18]
La química del ácido sulfámico y sus derivados N-Sustituidos ha sido presentada adecuadamente por Benson y Spillane.[3]

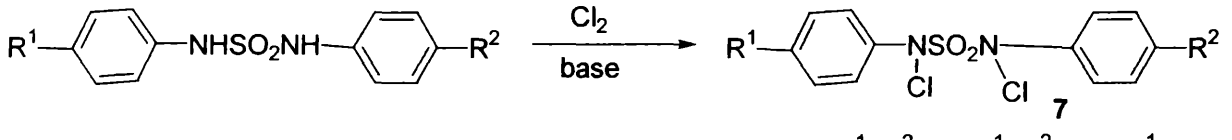
5.3 Sulfamidas

Las sulfamidas $NH_2SO_2NH_2$, diaminas del ácido sulfúrico, fueron sintetizadas y caracterizadas por primera vez por Regnault.[19] Estas fueron preparadas por diversos métodos los que fueron actualizados por Audrieth y Sveda.[20]

Ito y colaboradores estudiaron la síntesis de sulfamidas en fase gaseosa y encontraron que los rendimientos en la preparación de este tipo de compuestos decrecen con el aumento de la temperatura. Por encima de 403K se forman compuestos condensados del tipo : $(NH_4NSO_2)_2$ y $NH_4N(SO_2NH_2)_2$. [21]
Sowada resumió la síntesis de sulfamidas en tres reacciones[22]:

1- Reacción de aminas primarias (alquil o aril) con SO_2Cl_2
2- Reacción de aminas primarias con ácido clorosulfónico.
3- Reacción de aminas primarias con (R= alquil, cicloaquil, aril) con sulfamidas.

Sulfamidas tetrasustituidas fueron preparadas por Sowada[23] por reacción de diclorosulfamidas (**7**) con arilsulfatos.



7

$R^1=R^2=$ H; $R^1=R^2=$ Cl; $R^1=$ Br, $R^2=$Cl

También extendió la reacción de sulfamidas N,N'-disustituidas a sulfamidas tetrasustituidas. [24,25]
Sulfamidas alifáticas *N,N'*-disustituidas se obtuvieron por reacción de sulfamatos con oxicloruro de fósforo en piridina.

$$RNHSO_3^- H_3^+NR \xrightarrow[C_5H_5N]{POCl_3} RNHSO_2NHR$$

5.3.1 Sulfamidas primarias y *N*-(*tert*-butil)-*N'*-sulfamidas

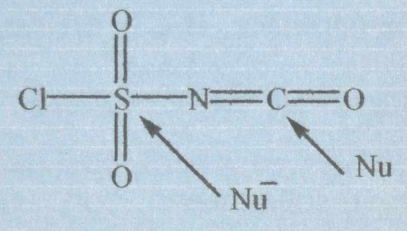
Catt y Matier[26] presentaron la preparación de sulfamidas primarias a partir de *N*-di-*tert*-butil- *N'*-sulfamidas sustituidas y posterior hidrólisis con ácido trifluoroacético como se presenta en la ecuación:

$$Me_3CNH_2^+ SO_2NHR \rightleftharpoons NH_2SO_2NHR + Me_3C^+ \xrightarrow{CF_3CO_2} CF_3CO_2CMe_3$$

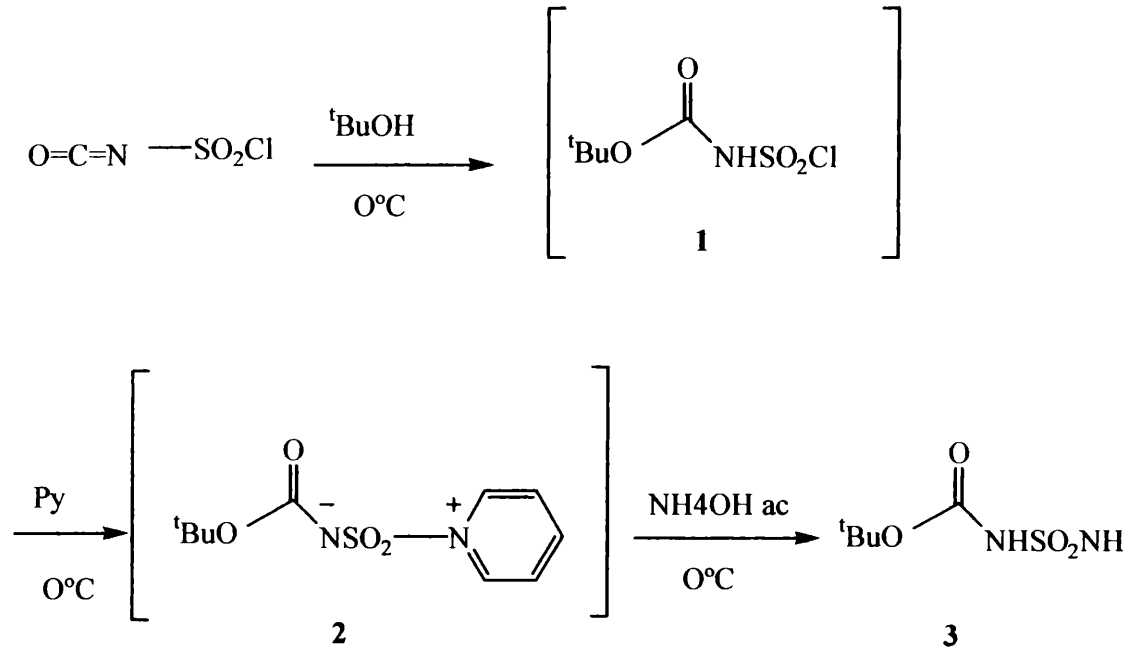
$R = C_6H_4,\ CH_2CH_2C_6H_5,\ H$

Otra alternativa es la preparación de *N*-(*tert*-Butoxicarbonil)sulfamida utilizando como reactivo clorosulfonil isocianato (CSI)[27]. En una reacción en un solo paso se hace reaccionar clorosulfonil isocianato (CSI) con un alcohol preferentemente terciario (*tert*-butanol) y posterior reacción con amoníaco líquido en presencia de una amina terciaria como piridina o trietilamina.[28]

El CSI es un *electrófilo* fuerte que tiene dos sitios de ataque nucleofílico el SO_2 y el C=O.[27]



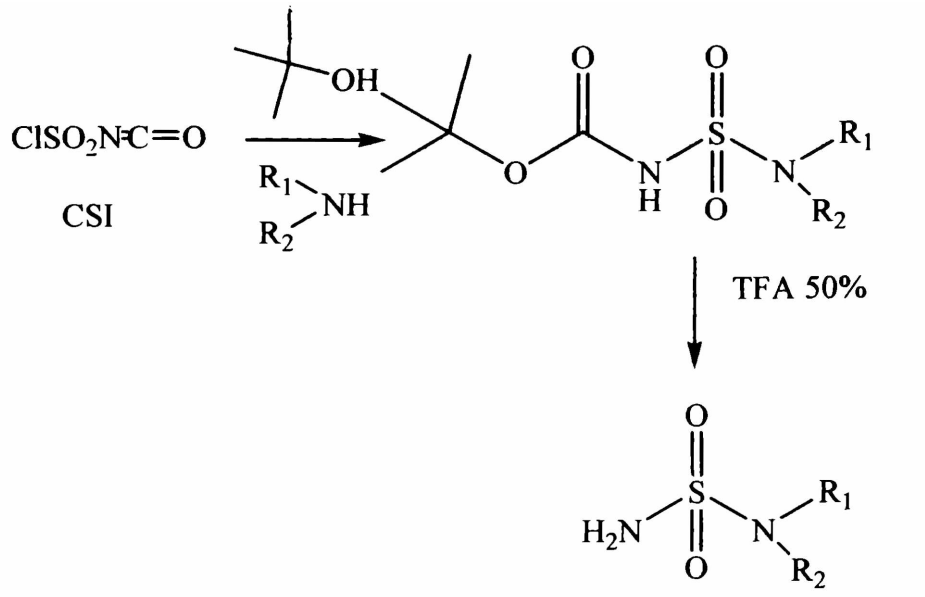
El intermediario formado clorosulfonil carbamato (**1**) es un producto inestable. Una forma de estabilizarlo es en presencia de una amina terciaria (por ejemplo Piridina) dando lugar a un intermediario tipo Burgess (**2,** Esquema 2). Cuando no es usa piridina en el medio de reacción, el rendimiento para la obtención de la *N*-acilsulfamida (**3,** Esquema 2) utilizando amoníaco líquido cae dramáticamente.



Esquema 2. Obtención de N-(tert-butoxicarbonil) sulfamida a través del reactivo tipo Burgess.

Esta reacción se puede extender a la preparación de sulfamidas N-sustituidas del tipo *N*-(*tert*-butoxicarbonil)- *N'*-sustituidas por reacción del clorosulfonil carbamato, (**1**, Esquema 2) obtenido *in situ* por reacción de CSI y *tert*-butanol,

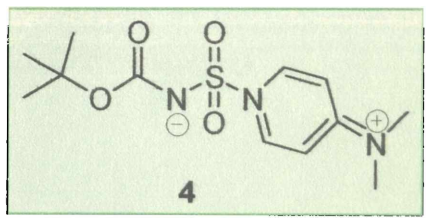
con la respectiva amina alifática primaria o secundaria o bien una amina aromática.[29]



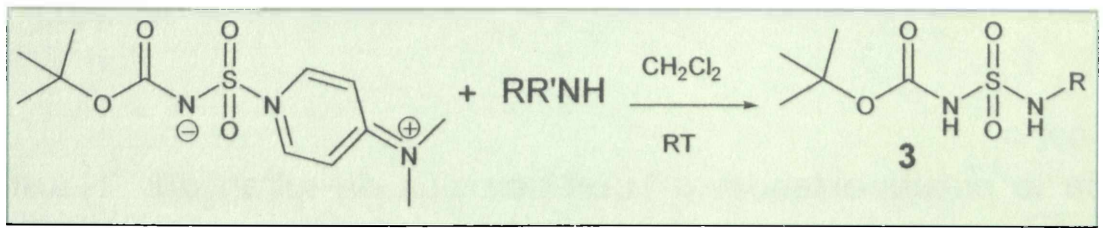
Esquema 3. Reacción general de preparación de sulfamidas primarias. 1) CSI, amina, *tert*-butanol. 2) Hidrólisis con TFA al 50%.

Por hidrólisis del intermediario *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-sulfamida con ácido trifluoroaético al 50% en diclorometano se obtienen sulfamidas primarias (Esquema 3).[30]

Alternativamente la síntesis de sulfamidas y sulfamatos se puede conducir usando un *reactivo sulfamoilante* *N*-(*tert*-Butoxicarbonil)-*N*-[4-(dimetilazaniumiliden)-1,4-dihidropiridin-1-il sulfonil]azanida (**4**).[31]



Este *agente sulfamoilante* (**4**) se prepara a partir de CSI, *tert*-butanol, en diclorometano anhidro y 4-dimetilaminopiridina. Por reacción de **4** con aminas alifáticas primarias o secundarias, o un alcohol, da lugar a sulfamidas (**3**, Esquema 4) o sulfamatos respectivamente. Este reactivo sulfamoilante es estable a temperatura ambiente, y se puede aislar con facilidad. Se ha utilizado para la preparación de sulfamidas y sulfamatos en fase sólida.[32]



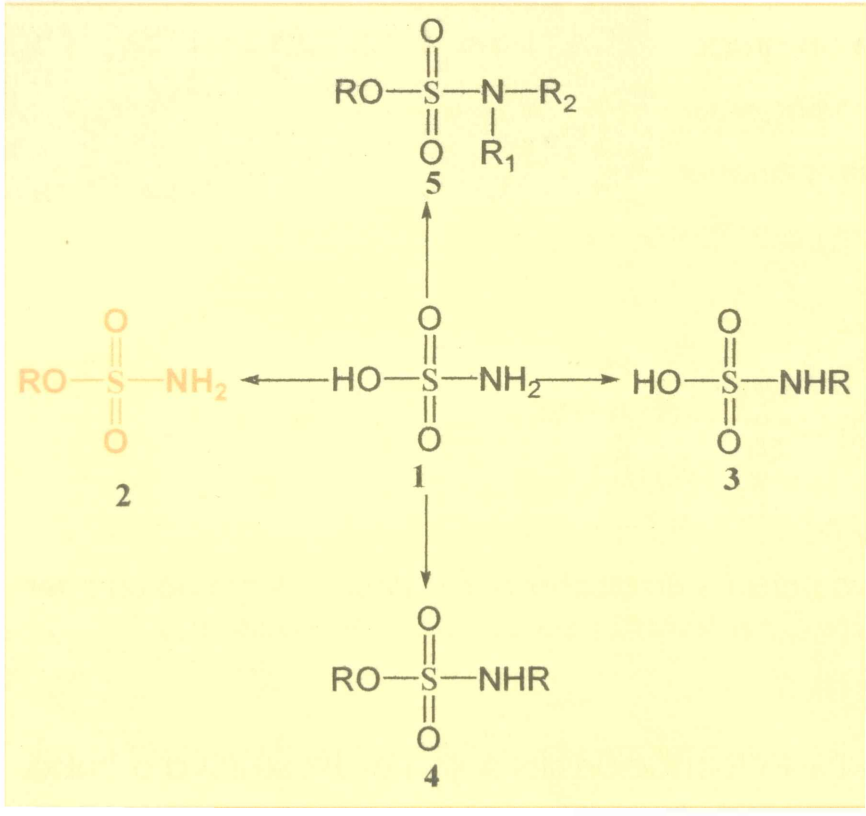
Esquema 4. Obtención de sulfamidas tipo **3** por reacción con el agente sulfamoilante **4**.

5.4. Sulfamidas cíclicas

La síntesis de sulfamidas cíclicas ha sido otro tipo de sulfamidas donde se han utilizando diferentes tipos de estrategias y catalizadores para tal fin.[33,34, 35,36]
Las sulfahidantoínas fueron descriptas en literatura en 1965[37], y desde entonces un gran número de síntesis relacionadas a estos compuestos heterocíclicos, principalmente a partir de aminoácidos, fueron descriptas[38], así como la actividad biológica de éstas.
Las técnicas de síntesis en fase sólida han permitido la obtención de librerías de compuestos relacionados a sulfahidantoínas.[39]

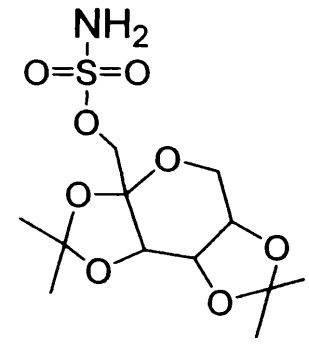
6. *Sulfamatos*

El grupo funcional sulfamato ha sido un grupo utilizado dado que presenta un amplio espectro farmacológico. (Anexo 7)



Esquema 5. Sulfamatos diversamente sustituidos.

En literatura figuran diversos tipos de sulfamatos derivados del *ácido sulfamico* **1** (Figura 2), con diferentes tipos de sustituciones ya sea sobre el átomo de N, o sobre el átomo de O dando origen a diversos tipos de compuestos (Esquema 4) a través de diversas rutas sintéticas. Todos los compuestos tipo **1-5** poseen aplicaciones farmacológicas.
Estos derivados comenzaron a ser explotados por el diseño racional de fármacos para obtener diferentes tipos de agentes terapéuticos. Entre ellos podemos mencionar: antibióticos, antivirales, anticancerígenos, inhibidores de anhidraza carbónica, anti-obesidad, para el tratamiento de la osteporosis y anti-artritis, hiperlipidemia, artereclorsis. [40]



Topiramato, **6**

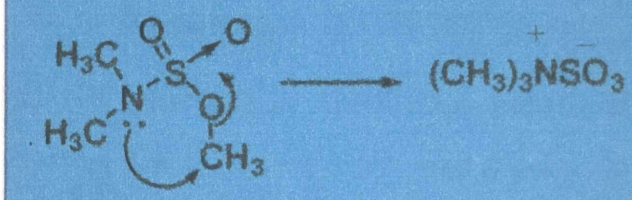
La función sulfamato también ha sido estudiada por otros autores[41,42] como anticonvulsiva. Conforman la estructura general de un fármaco de uso clínico Topiramato[42], **6**. En nuestro caso en particular nos enfocaremos en la obtención de sulfamatos alifáticos tipo **2,** Esquema 5.

6.1 Química de sulfamatos

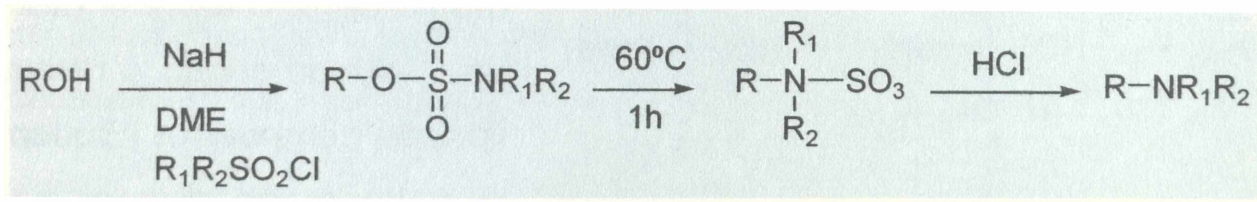
Uno de los primeros trabajos donde se estudia un sulfamato data del año 1884 donde se discute el reordenamiento espontáneo a temperatura ambiente del *N,N*-dimetilsulfamato el cuál se convierte en una betaína.[43]

Unos 80 años después en 1965, se plantea la conversión de alcoholes en aminas[44] pasando por la formación de un sulfamato. Primero se plantea la conversión de un alcohol en sulfamato. El reordenamiento[45] de éste éster sulfámico a un análogo de betaína, ocurre por migración de un grupo alquilo desde un oxígeno a un nitrógeno. Finalmente por hidrólisis ácida se obtiene una amina (Esquema 6).

Betaína: ácido sulfámico *N*-trisustituido.

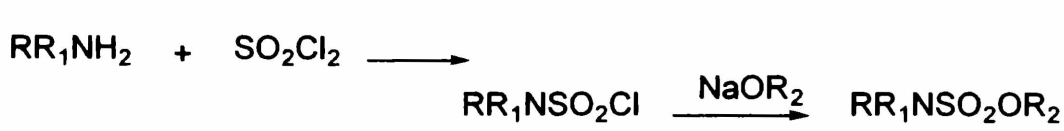


Compuesto de adición de una amina terciaria con SO_3.



Esquema 6. Obtención de una amina a partir de un alcohol por reordenamiento de un éster sulfámico. DME: 1, 2-dimetoxietano.

El paso 1 de la ecuación esquema 6, la formación del sulfamato[46], se lleva a cabo utilizando un procedimiento en dos pasos. Primero por reacción de una amina primaria o secundaria con cloruro de sulfurilo (SO_2Cl_2) y posterior reacción del cloruro de sulfamoilo generado con un alcóxido de sodio (Esquema 7).

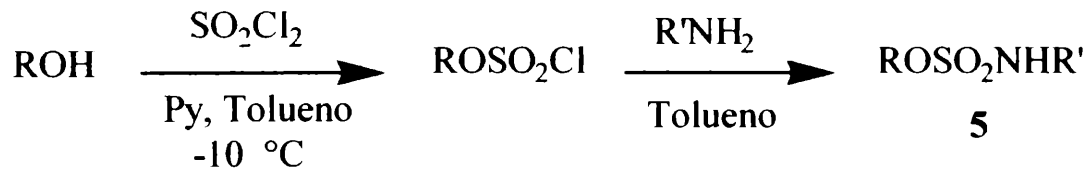


Esquema 7. Primer procedimiento usado para la preparación de sulfamatos.

Durante varios años la síntesis de sulfamatos se llevó a cabo principalmente siguiendo la reacción del esquema 7, por formación de un alcóxido (R_2O^-)[47]. Sin embargo, en muchos casos los rendimientos reportados eran bajos y se aislaba la betaína por reordenamiento del éster sulfámico[48]. Los alcóxidos en muchos casos son difíciles de preparar y de manipular, o muchas veces la obtención del sulfamato requiere el uso de reflujo y largos tiempos de reacción.[49] Otros procedimientos que normalmente dan mejores rendimientos están limitados a la obtención de un tipo y clase de ésteres sulfámicos [50, 51,52, 53, 54, 55] e involucran la preparación de reactivos especiales como azidas[56] y sulfamidas[53].

Spillane y colaboradores plantearon la síntesis de sulfamatos del tipo $R_1R_2NSO_3R_3$, $RNHSO_3R_3$ y $H_2NSO_3R_3$ para R alifático o aromático por reacción de cloruro de sulfamoilo utilizando un catalizador de transferencia de fase.[57] La sal cuaternaria usada como catalizador de transferencia de fase puede ser cloruro de benciltrietilamonio o el ión tetra-*n*-butilamonio.[46] Este método también fue utilizado por otros autores por ejemplo en la preparación de derivados de monobactamas con un grupo sulfamoiloximetil o *N*-alquilsulfamoiloximetil.[58]

Otro procedimiento para la obtención de sulfamatos es el descrito por el grupo de Maryanoff[42] (Esquema 8). Esta ruta sintética ha sido empleada para la preparación del anticonvulsivo de uso clínico Topiramato[59] (Figura 4, Capítulo 2).



Esquema 8. Preparación de sulfamatos a partir del alcohol y SO_2Cl_2.

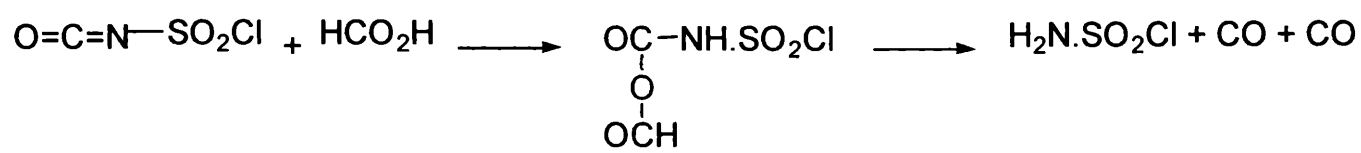
En el caso de la preparación de Topiramato y sus derivados, se hizo reaccionar el correspondiente alcohol con cloruro de sulfamoilo en presencia de NaH.

Alternativamente se puede hacer reaccionar el alcohol con SO_2Cl_2 en presencia de piridina para dar un clorosulfato intermediario (Esquema 6), el clorosulfato derivado del alcohol se hace reaccionar con una amina primaria para generar compuestos tipo (**5**, Esquema 8).[41] Si la amina que se usa es amoníaco estamos frente a un sulfamato primario.

El *cloruro de sulfamoilo*, **$ClSO_2NH_2$**, es un intermediario importante en la síntesis de sulfamatos y de sulfamidas asimétricas[60] y es un reactivo muy usado a escala preparativa. Diversos cloruros de sulfamoilo *N*-sustituidos ($ClSO_2NRH$) han sido

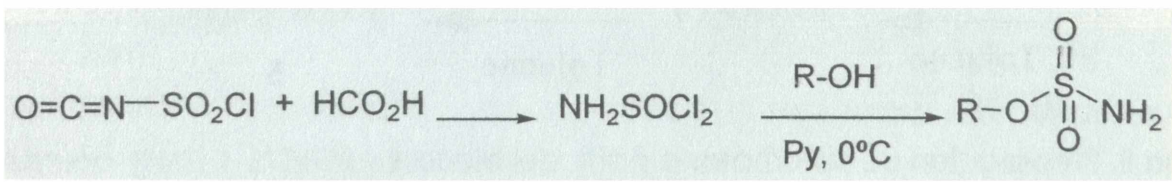
preparados y se han utilizado diversos procedimientos[60] por ejemplo por reacción de sulfamidas simétricas ($RNHSO_2NHR$) y SO_2Cl_2[61] o alternativamente con HCl[62].Otra opción con la que se obtienen mejores rendimientos, y es más rápida es a partir de la sal del ácido sulfámico ($RNHSO_3^-$) en una solución de benceno con pentacloruro de fósforo (PCl_5).[73]

Los procedimientos típicos empleados comúnmente para la obtención de sulfamatos primarios utilizan cloruro de sulfamoilo, [63, 64] y éste se prepara fácilmente a partir de clorosulfurilisocianato (CSI) y ácido fórmico (Esquema 9).[64, 65, 66]



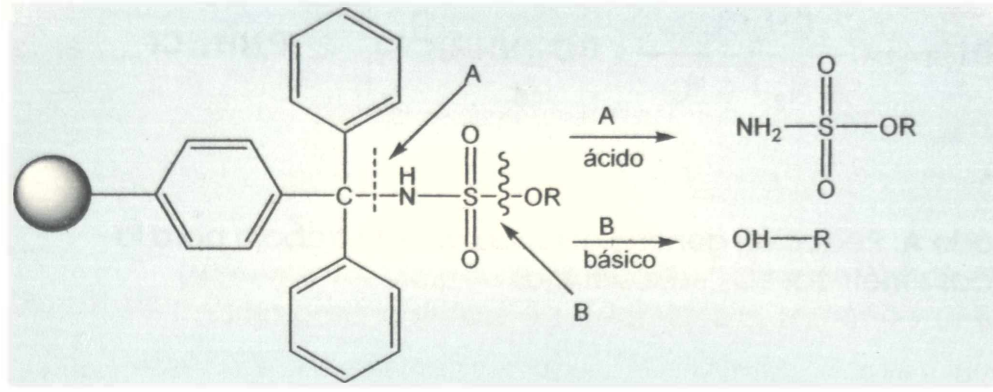
Esquema 9. Generación de cloruro de sulfamoilo a partir de CSI y ácido fórmico.

La condensación de $ClSO_2NH_2$ con la mayoría de los alcoholes primarios y secundarios (en Piridina-CH_2Cl_2) da lugar a sulfamatos primarios con rendimientos moderados de 65-75%[67,68] (Esquema 10). Sin bien el cloruro de sulfamoilo se puede aislar y en muchos trabajos de hecho lo preparan y aíslan[69] para la posterior reacción con el alcohol resulta más cómodo trabajar con la preparación *in situ* de este intermediario, y en una reacción, de un solo paso, obtener el sulfamato primario (Esquema 10).[70] Alcoholes terciarios parecen no reaccionar por esta ruta sintética probablemente por una reacción de β-eliminación.[64]



Esquema 10. Preparación de sulfamatos a partir de cloruro de sulfamoilo y un alcohol primario o secundario alifático o aromático.

El grupo sulfamato también ha sido utilizado como *linker* en resinas de cloruro de tritilo (Esquema 11).[71] Por un tratamiento *ácido* éste se libera regenerando el sulfamato, o con tratamiento *básico* liberando un fenol. Estas resinas se utilizaron en síntesis combinatoria de fase sólida para dar lugar a librerías de compuestos derivados de sulfamatos con diversa actividad farmacológica.[55]



Esquema 11. Preparación de sulfamatos en fase sólida.

Al igual que para la preparación de sulfamidas diversos agentes sulfamoilantes se han utilizado para la preparación de sulfamatos entre ellos *N*-(*tert*-Butoxicarbonil)-*N*-[4-(dimetilazaniumiliden)-1,4-dihidropiridin-1-ilsulfonil]azanida (**4**)[31], catecolsulfato [72] entre otros. Prácticamente estos agentes sulfamoilantes se utilizan principalmente para la preparación de sulfamatos funcionalizados, sustituidos sobre el átomo de N y el átomo de O. Estos agentes sulfamoilantes surgieron por el interés de sintetizar sales del ácido sulfámico ($RNHSO_3K$) utilizados como edulcorantes.[73]

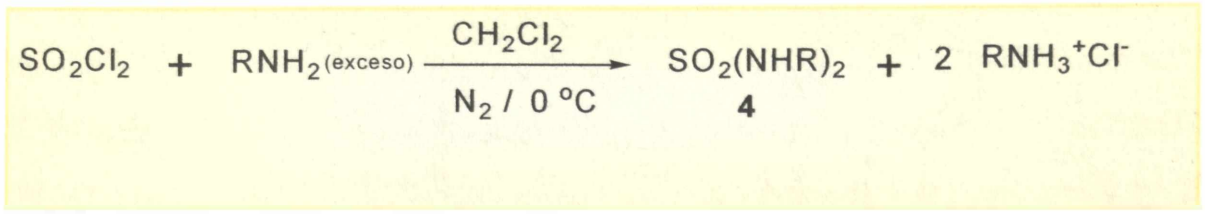
Varios sulfamatos cíclicos[73, 74] y 1,2 –sulfamidatos cíclicos[36] han sido preparados con diversos fines.[75]

7. Metodología

7.1. Rutas sintéticas utilizadas en el presente trabajo para la obtención de sulfamidas.

7.1.1. *Preparación de sulfamidas simétricas por reacción de la amina en exceso y SO_2Cl_2.*

Las sulfamidas simétricas fueron sintetizadas según el procedimiento de Gavernet L. et al.[76] (ver Esquema 12) por reacción de la correspondiente amina con SO_2Cl_2 bajo atmósfera inerte a 0°C, sin utilizar piridina[77] en el medio de reacción. Por ser el SO_2Cl_2 un compuesto muy reactivo, que se descompone en presencia de humedad, generando HCl y H_2SO_4 se debe trabajar bajo atmósfera inerte (Ar o N_2) y con el material seco sin restos de humedad. También se debe proteger de la luz ya que en presencia de luz descompone generando Cl_2.[78] Para la obtención de sulfamidas di-sustituidas la relación estequiométrica SO_2Cl_2: RNH_2 es 1: 6. Para el caso de sulfamidas tetra-sustituidas se mantiene la misma relación estequiométrica, pero se parte de las correspondientes aminas secundarias.



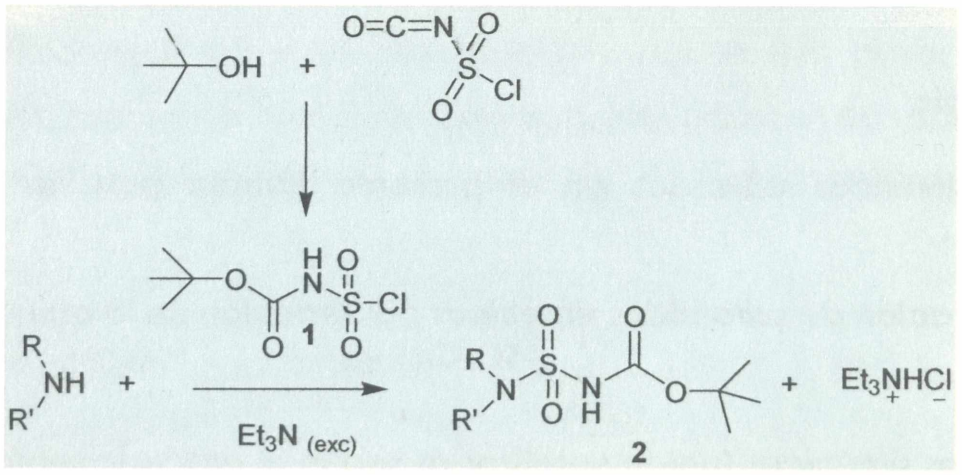
Esquema 12. Método **A**: Reacción general utilizada en este trabajo para la síntesis de sulfamidas simétricas N,N'–disustituidas

7.1.2 Preparación de sulfamoilcarbamatos por reacción de CSI y la correspondiente amina.

Para la síntesis de sulfamidas N,N- disustituidas o monosustituidas se utilizó la ruta sintética que conduce a la formación de un compuesto intermedio sulfonilcarbamato (**1**, Esquema 13).

La obtención de los sulfonil carbamatos se realizó en una reacción de un solo paso según literatura [79,80,81,82,83] usando como reactivos clorosulfonil isocianato (CSI), *tert*-butanol, la amina correspondiente que puede ser primaria como secundaria alifático o aromática, en presencia de trietilamina (Esquema 12).

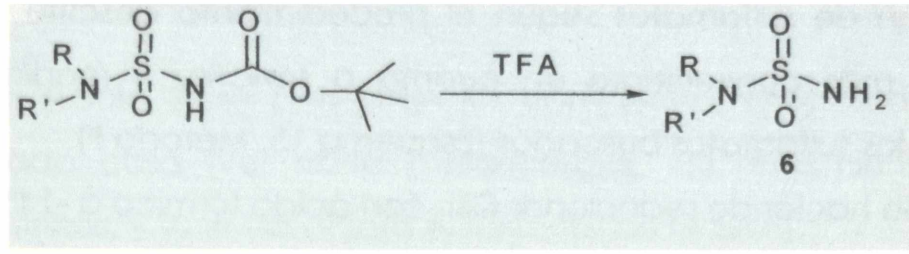
El uso de trietilamina en esta reacción es para capturar el cloruro de hidrógeno que se origina, formando la sal de cloruro de trietilamonio.



Esquema 13. Método **B**. Reacción general utilizada en este trabajo para la síntesis de sulfonil carbamatos tipo **5**.

7.1.3. Obtención de sulfamidas *N*-mono y *N,N*-di-sustituidas.

Las sulfamidas *N*-mono y *N,N*-di- sustituidas se prepararon a partir del correspondiente sulfonil carbamato (**2**, Esquema 12) por hidrólisis del grupo protector *tert*-butoxicarbonil mediante el uso de ácido trifluoroacético (TFA) al 50% en diclorometano anhidro[84, 85] (ver Esquema 14).

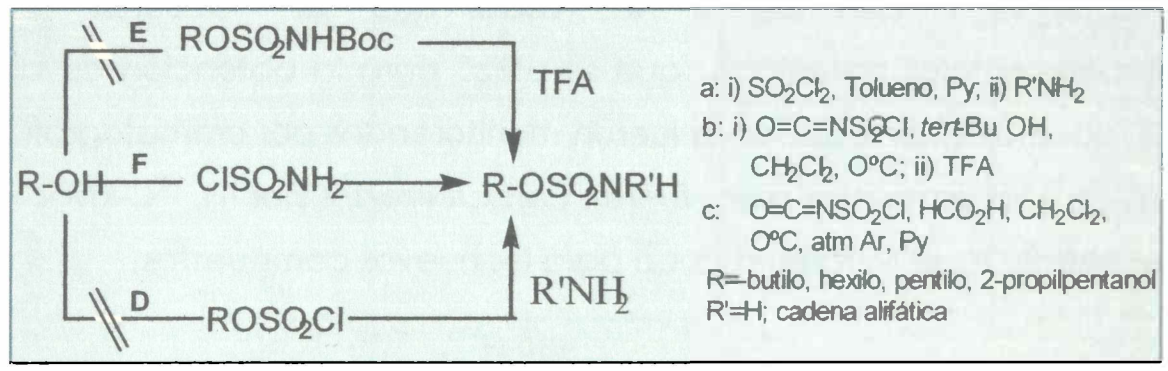


Esquema 14. Método **C.** Reacción general utilizada en este Trabajo para la síntesis de sulfamidas N, N-mono y di-sustituidas.

7.2. Síntesis de Sulfamatos

7.2.1 Preparación de sulfamatos a partir de los correspondientes alcoholes alifáticos.

Para la preparación de sulfamatos, inicialmente, se siguió el procedimiento general de Maryanoff, et al.[42] Por este camino no se logró obtener el producto esperado a pesar de i) variar las condiciones de temperatura de trabajo, ii) relaciones estequiométricas (ver Esquema 15, Método **D**) entre otras variables realizadas.



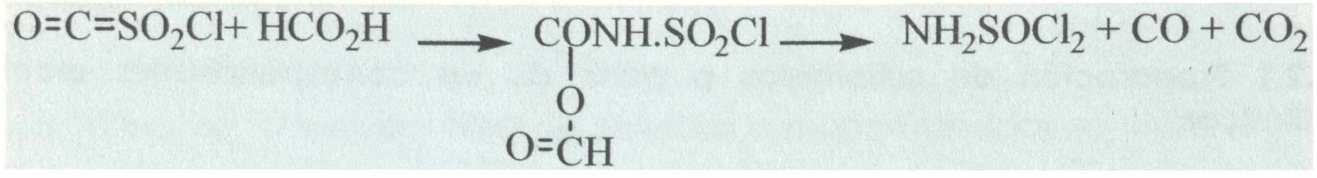
Esquema 15. Método **D**: Reacción del alcohol CSI , Método **E**: i) CH_2Cl_2, 0°C, 1 h; ii) 0°C , T°C amb. 18h. Metodo **F**: i) CH_2Cl_2, 0 °C, 1 h, T °C amb. 4 h; ii) 0 °C a T °C amb. 15 a 17h.

En base a estos resultados se decidió cambiar la ruta sintética, para ello se utilizó como reactivo clorosulfonil isocianato (CSI)[86] en lugar de cloruro de sulfurilo (SO_2Cl_2). De la reacción de CSI con el correspondiente alcohol, se obtiene un sulfonil carbamato. Por posterior hidrólisis selectiva del grupo *tert*-butoxicarbonil, se accede al sulfamato con el grupo NH_2 libre (Esquema 14, Método **E**)[87]. Si bien esta ruta sintética es útil y pudo aplicarse satisfactoriamente en la preparación de sulfamidas ésta no es la más adecuada para la obtención de sulfamatos.

En estas condiciones, los sulfamatos *N*-Boc-derivados resultaron ser inestables, dificultando su aislamiento, purificación y conservación, particularmente se descomponen en la etapa de purificación por columna cromatográfica.[88]

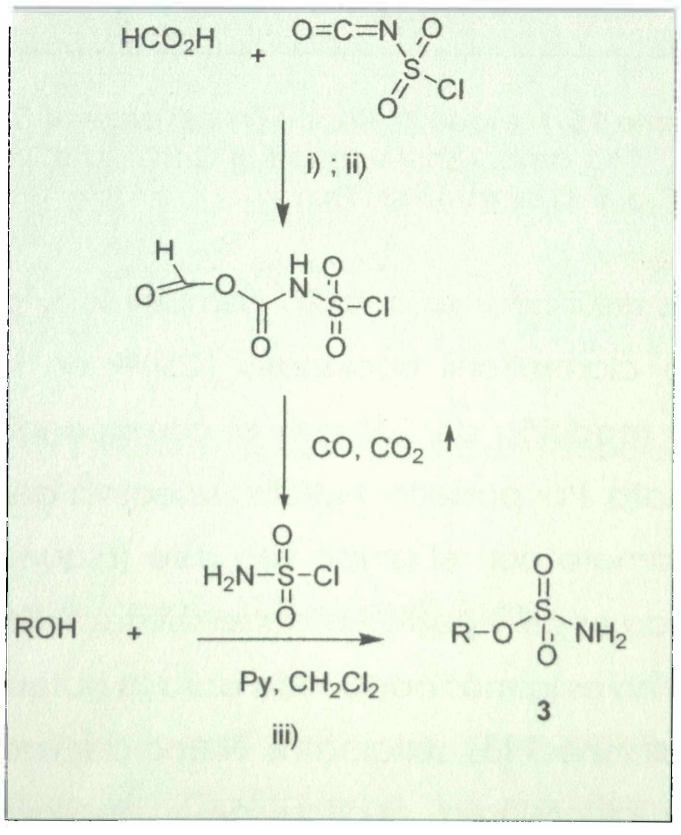
La preparación de sulfamatos según el procedimiento descrito por Kim et al.[89] resulta ser la más conveniente en cuanto a sencillez y rendimientos para la obtención de los sulfamatos buscados (Esquema 15, Método **F**).

Se lleva a cabo haciendo reaccionar CSI con ácido fórmico a -14°C, con vigorosa agitación magnética obteniéndose cloruro de sulfamoilo, con desprendimiento gaseoso que corresponde al CO y CO_2 que se genera en este paso de la reacción[90] (Esquema 16).



Esquema 16. Obtención de cloruro de sulfamoilo a partir de CSI y ácido fórmico.

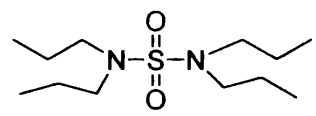
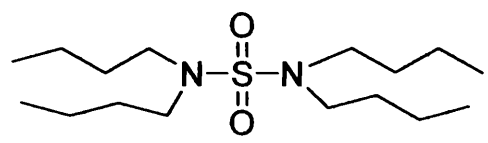
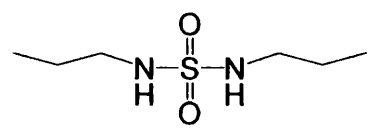
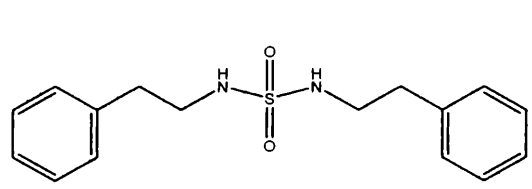
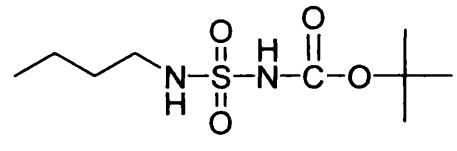
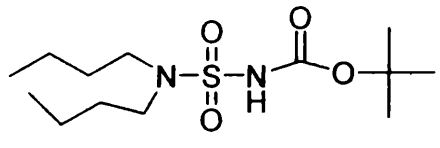
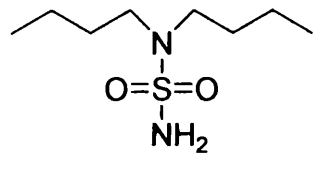
Se agregó *in situ* una solución del alcohol alifático correspondiente al sulfamato buscado en cloruro de metileno anhidro y presencia de piridina.[91] Se agitó a temperatura ambiente durante 15-17h, obteniéndose el sulfamato buscado (Esquema 17).Esta fue la vía valida, que de acuerdo a los resultados experimentales obtenidos, que se utilizó para la obtención de alquil sulfamatos (Esquema 3).Las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía en Capa Fina (TLC), y los productos puros fueron caracterizados por ^{1}H, ^{13}C-RMN, e IR. Los análisis elementales se llevaron a cabo para los nuevos compuestos.



Esquema 17. Método **F:** i)agitación vigorosa 5min.; ii) CH_2Cl_2, 0 °C, 1 h, T °C amb. 4 h; iii) 0 °C a T °C amb. 15 a 17h.

8. Resultados

A continuación (Tabla 2) se presentan los compuestos preparados, el método utilizado en cada caso (ver parte metodología), los rendimientos obtenidos, características físicas, y su Rf (se aclara el solvente de elusión).

Compuesto	Mètodo	Rdto (%)	Punto de fusión o característica física	Rf.
1 	**A**	76	Aceite (T.a)	**0.65** CH_2Cl_2
2 	**A**	47	Aceite 126-128°C (1 mm de Hg)	0.65 CH_2Cl_2 : Hexano (1 :1).
3 	**A**	65	118-119 °C	0.49 CH_2Cl_2 : MeOH (20 :1).
4 	**A**	70	100-101°C	0.48 CH_2Cl_2 : MeOH (20 :1).
5 	**B**	41	144 -145 °C [CH_2Cl_2: Hexano (1 :3)]	0.73 CH_2Cl_2 : MeOH (20 :1).
6 	**B**	48	Aceite (T.a)	0.49 CH_2Cl_2
7 	**C**	66	65-65.5°C	0.33 CH_2Cl_2

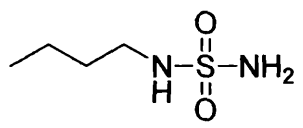
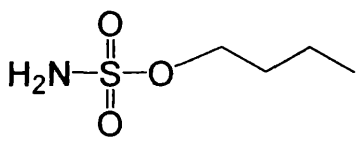
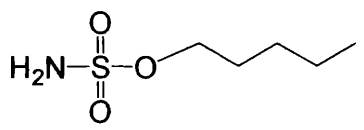
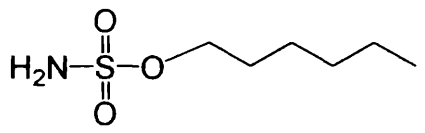
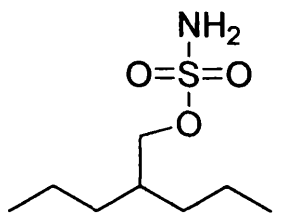
8 	**C**	82	46-48°C	0, 29 CH_2Cl_2 : MeOH (20:1) .
9 	**F**	18	26-27°C	0.53 CH_2Cl_2 : MeOH (20:1).
10 	**F**	41	38-39°C	0,30 CH_2Cl_2 : MeOH (40:1).
11 	**F**	50	48-49°C	0.40 CH_2Cl_2 : MeOH (20:1) .
12 	**F**	32	60-61°C	0.33 CH_2Cl_2

Tabla 2. Compuestos preparados. Metodología utilizada, (ver sección metodología), rendimientos, constantes física, *Rf* (placa sílica gel F 254). Abreviaturas: T. a: Temperatura ambiente, °C (grados centígrados).

Para detalles experimentales y espectros ^{1}H- RMN, ^{13}C- RMN, IR y análisis elementales ver Sección 10 de este capítulo.

9. Discusión de los resultados

Las sulfamidas simétricas se sintetizaron con buenos rendimientos utilizando SO_2Cl_2 como reactivo. Este tipo de sulfamidas es estable y son fáciles de purificar por columna cromatográfica y cristalizaciones. La sulfamida N,N,N´,N´-tetra butilsustituida resultó ser un aceite que se puedo purificar por microdestilación a presión reducida.

La preparación de sulfonil carbamatos se llevó a cabo utilizando como reactivo sulfamoilante CSI. Las sulfamidas obtenidas por este método resultan ser más estables que los sulfamatos. Se debe trabajar rápido en la etapa de purificación por columna y conservarlas a bajas temperaturas para evitar la hidrólisis de grupo *tert*-butoxicarbonil especialmente cuando se preparan derivados N,N-disustituidos (sulfamidas de aminas secundarias).

Por hidrólisis ácida de los sulfonilcarbamatos utilizando TFA para liberar el grupo protector tert-butanol, es posible obtener sulfamidas mono sustituidas (Método **C**).

Las reacciones llevadas a cabo según el método **D** no permiten obtener los sulfamatos buscados a pesar de que se han variado condiciones de trabajo tales como temperatura y relaciones estequiométricas.

Si bien ya existen antecedentes en nuestro laboratorio de la utilización del método **E** para la preparación de sulfamidas, éste no pudo aplicarse satisfactoriamente para la obtención de sulfamatos. Los sulfamatos N-BOC-derivados, son muy inestables dificultando su aislamiento, purificación y conservación.

La preparación de sulfamatos según el procedimiento descrito por Kim et al.[92], empleando cloruro de sulfamoilo, piridina y el correspondiente alcohol, demostró ser, según los datos experimentales, la mejor opción para la síntesis de alquil sulfamatos primarios (método **F**).

10. Sección Experimental:

Síntesis Química

Los puntos de fusión se determinaron en capilares cerrados con un equipo de punto de fusión Electrothermal no corregido. Las cromatografías en capa fina (TLC) se realizaron en folios de aluminio impregnados en silica gel 60 F_{254} (Merck, ref 1.05554), y los manchas se visualizaron con luz ultravioleta (UV 254 y 366) y con revelador destructivo de solución acuosa al 5% de Molibdato de Amonio (VI) tetrahidratado.

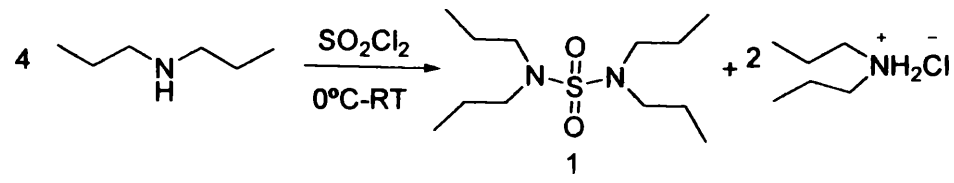
Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{1}H y ^{13}C se realizaron en un equipo Varian Gemini 200 MHz.

Los espectros Infrarrojos (IR) se realizaron en un equipo FT/IR Perkin-Elmer modelo espectrofotómetro.

Para la cristalización de los compuestos se utilizó solvente de grado analítico, mientras que para las reacciones, extracciones y columnas cromatográficas se utilizó solventes cromatograficamente puros, destilados y controlados en nuestro laboratorio.

Los análisis elementales se llevaron a cabo en el servicio de Microanálisis del Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires (UBA)– CONICET.

Obtención de *N,N,N',N'*-tetrapropilsulfamida, **1** [93].



1

En un tubo de reacción flameado, en ausencia de luz, cubierto con papel aluminio, provisto de agitación magnética, bajo atmósfera de Argón se preparó una disolución de N,N-dipropilamina recién destilada (9.0 mL, 6.7g, 66.0 mmol, 4 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL). Se enfrió a 0°C en un baño agua-hielo y se añadió gota a gota una solución de cloruro de sulfurilo (1.3 mL, 16.5 mmol, 1 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (6 mL). Se observó desprendimiento gaseoso con el agregado de las primeras gotas de la solución. Se agitó de 0°C hasta temperatura ambiente durante 24h, se siguió el curso de la reacción por cromatografía en capa fina (CCF). La suspensión amarilla resultante se centrifugó hasta separación de dos fases una líquida y una sólida. Se separó la fase orgánica. El sólido se lavó con diclorometano (3 * 3 mL). Las fases orgánicas se juntaron y se concentraron en rotavapor (40 mm de Hg) hasta obtención de un sólido pastoso. Se agregó CH_2Cl_2 (10 mL) y se lavó la fase orgánica sucesivamente con ácido acético al 5 % (3* 3 mL), solución saturada de ClNa (1* 3 mL), hasta PH=5. La fase orgánica se secó con SO_4Na_2 anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El aceite resultante se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente hasta peso constante obteniéndose un sólido pastoso anaranjado (2,15 g), el cuál se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (0.063-0.200 mm), Ø de la columna 3 cm, # 1-72, 950 mL de diclorometano; obteniéndose **1,** en forma de aceite incoloro (#16-73, 1.8g) con un 41 % de rendimiento.

R_f: 0,65 (SiO_2 en CH_2Cl_2).

IR (pastilla ClAg): 2965, 2924, 2883 (st alifático), 2738, 1460, 1372 (st S-O), 1331, 1197, 1146 (st S-O), 1094, 1042, 986, 857, 795, 728, 599, 568 cm^{-1} .

^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ :0.88 [t, *J*=7.7 Hz, 12H, 3(3',3'',3''')-H_3], 1.58 [ddd, *J*≈7.7 Hz, *J'*≈5.5 Hz 8H, 2(2',2'',2'''-H_2)], 3.05 [dd, *J*≈ 5.5 Hz, 8H, 1(1',1'',1''')-H_2].

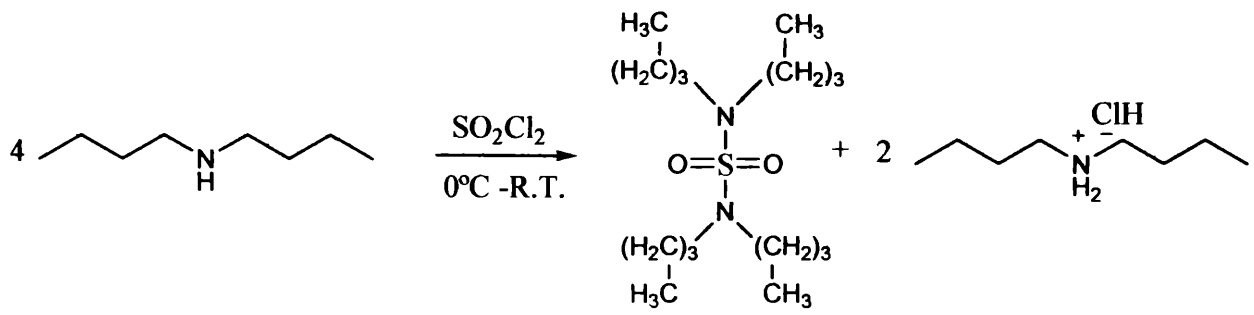
^{13}C-RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$) δ: 11.5 [4 CH_3, 3(3',3'',3'''-CH_3, 21.7 [4 CH_2, 2(2',2'',2''')-CH_2)], 49.8 (4 CH_2, 1(1',1'',1''')-CH_2)].

Análisis Elemental:

Calculado para $C_{12}H_{28}N_2O_2S$: C: 54.5% H: 10.7% N: 10.6% S:12.1% O:12.1%

Encontrado: C: 54.1% H: 11.0% N: 10.7% S:12.2% O:12.0%.

Obtención de *N,N,N',N'*-tetrabutilsulfamida **2.**



En un tubo de reacción de 20 mL, flameado, en ausencia de luz, provisto de agitación magnética, bajo atmósfera de Argón se preparó una disolución de N,N-dibutilamina (6.10 mL, 66.0 mmol, 4 equiv., sobre lentejas de KOH, Fluka) en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL, sobre tamiz molecular 4 Å). Se enfrió a 0°C en un baño agua-hielo y se añadió gota a gota una solución de cloruro de sulfurilo (1.3 mL, 16.5 mmol, 1 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (6 mL, sobre tamiz molecular 4 Å). Se observó despredimiento enérgico de vapores blancos con el agregado de las primeras gotas de la solución de SO_2Cl_2. Se agitó de 0°C hasta temperatura ambiente durante 11h, se siguió el curso de la reacción por cromatografía en capa fina (CCF). Se añadió CH_2Cl_2 hasta completar 27 mL, y se lavó sucesivamente con solución saturada de ClNa (3 * 9 mL), ácido acético al 5% (3 * 9 mL), NaOH 0.1 N (2 * 9 mL) (PH=8-9), solución saturada de ClNa (PH=6-7). La fase orgánica se secó con SO_4Na_2 anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El aceite amarillo resultante se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente hasta peso constante obteniéndose 3.5 g de crudo. Se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (0.063-0.200 mm), ∅ de la columna 3 cm, # 1-39, 720 mL de Hexano / CH_2Cl_2 (2:1); #40-61, 570 mL Hexano / CH_2Cl_2 (1:1); obteniéndose **2**, en forma de aceite incoloro (#7-10, 2.5g) con un 47 % de rendimiento.

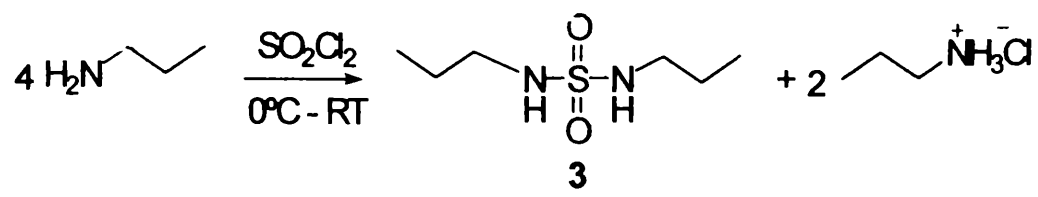
R_f: 0,65 [SiO_2 en CH_2Cl_2: Hexano (1:1)].

IR (pastilla ClAg) υ: 2955, 2939, 2877 (st alifático), 1469, 1387 (st S-O), 1101 (st S-O), 1083, 1026, 910, 857, 758, 722, 557 cm^{-1} .

^{1}H-RMN (200 MHz, CDCl3) δ :0.95 [t, *J*=7.3 Hz, 12H, 4(4', 4'', 4''')-H_3], 1.39 [m, 8H, 2(2',2'',2'''-H_2)], 1.67 [m, 8H, 3(3',3'',3'''-H_2)], 3.05 [t, *J*≈ 7.7 Hz, 8H, 1(1',1'',1''')-H_2].

^{13}C-RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$) δ: 13.8 (CH_3), 20.1 (γ-CH_2), 29.7 (β-CH_2), 51.1 (α-CH_2).

Obtención de *N, N'*-di-propilsulfamida, **3**. [94, 95, 96]



3

En un tubo de reacción flameado, en ausencia de luz, cubierto con papel aluminio, provisto de agitación magnética, bajo atmósfera de argón, se preparó una disolución de *N*-propilamina recién destilada (11 mL, 133.2 mmol, 6 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (5 mL, sobre tamiz molecular 4 Å). Se enfrió a 0°C con un baño agua-hielo y se añadió gota a gota una solución de cloruro de sulfurilo (1.8 mL, 22.5 mmol, 1 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (4 mL). Se observó desprendimiento gaseoso con el agregado de las primeras gotas de la solución. Se agitó a 0°C hasta temperatura ambiente durante 24h, se siguió el curso de la reacción por cromatografía en capa fina (TLC). La suspensión naranja resultante se centrifugó hasta separación de dos fases una líquida y una sólida. La fase orgánica se separó, se concentró en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg). El sólido resultante se disolvió en diclorometano (15 mL) se lavó sucesivamente con ácido acético al 5 % (3* 5 mL), solución saturada de ClNa (2* 5 mL), PH=6-7. La fase orgánica se secó con SO_4Na_2 anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida. El sólido resultante se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente hasta peso constante obteniéndose un sólido pastoso anaranjado (2.77 g), el cuál se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (0.063-0.200 mm), ∅ de la columna 3 cm, #1-3, 150 mL CH_2Cl_2; #4-53, 500 mL CH_2Cl_2; #54-101, 480 mL CH_2Cl_2 /MeOH (20:1); #102-105, 200 mL CH_2Cl_2 / MeOH (20:1), obteniéndose un sólido blanco (#50-91; 2.60g) con un 65 % de rendimiento. (de literatura: 47.2%)[96]

R_f: 0.49 (en CH_2Cl_2 : MeOH (20 :1)).

P.f: 118-119°C [en CH_2Cl_2 / Hexano (2:1)] (de literatura: 118°C[94] y 119°C[96]).

IR (pastilla KBr): 3280 (st N-H), 2971, 2938, 2880 (st alifático), 2738, 1463, 1450, 1314 (st S-O), 1250,1147 (stS-O), 1100, 1080, 1063, 1050, 1011, 941, 895, 760, 683, 554 cm^{-1}.

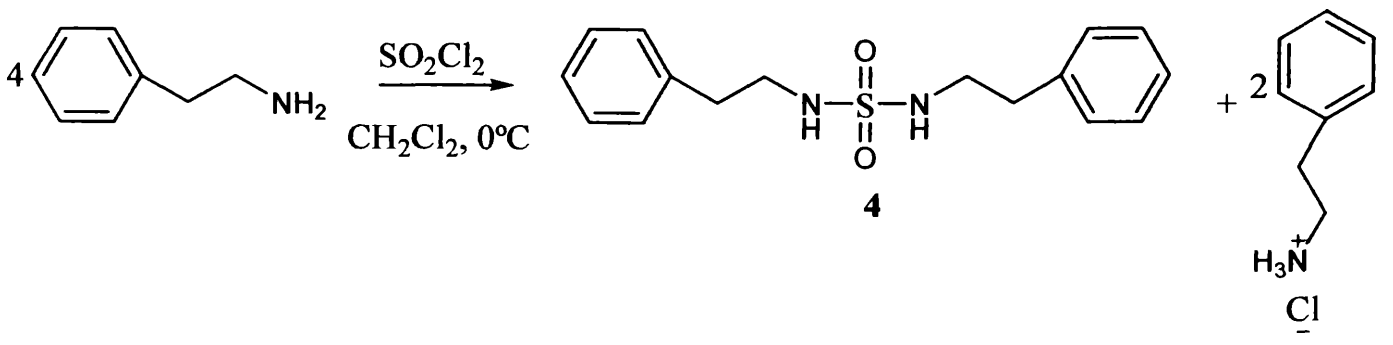
^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.98 [t, *J*=7.3 Hz, 6H, 3(3')-H_3,] 1.53 [sext, *J*≈*J'*≈7.2 Hz, 4H, 2(2')-H_2], 2.97 [m, *J'*≈7 Hz, 4H, 1(1')-H_2], 4.54 (t, señal ancha, *J''*≈5.8 Hz).

^{13}C-RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$) δ: 11.5 (2 CH_3, γ-CH_3), 23.1 (2 CH_2, β-CH_2), 45.1 (2 CH_2, α-CH_2).

Análisis Elemental:

Calculado para $C_6H_{16}N_2O_2S$:	C: 40.0%	H: 9.0%	N: 15.5%	S:17.8%	O:17.8%
Encontrado:	C: 40.0%	H: 9.1 %	N: 15.3%	S: 17.4%	O:18.2%

Obtención de *N,N'*-di-feniletilsulfamida, **4**.[97,98,99]



En un tubo de reacción flameado, en ausencia de luz cubierto con papel aluminio, provisto de agitación magnética y atmósfera inerte, se preparó una disolución de *N*-fenetilamina (8.3 mL, 65.8 mmol, 5 equiv., Fluka) en CH_2Cl_2 anhidro (8.0 mL, secado sobre tamiz molecular 4 Å). Se enfrió a -10°C y se añadió gota a gota con jeringa una solución de cloruro de sulfurilo (1.05 mL, 13.2 mmol, 1 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (4.0 mL). Se observó desprendimiento gaseoso con el agregado de las primeras gotas de la solución, luego un precipitado blanco. Se agitó hasta temperatura ambiente durante 24h, se siguió el curso de la reacción por cromatografía en capa fina (CCF). La suspensión resultante se concentró a presión reducida (40 mm de Hg) y se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente hasta peso constante, obteniéndose 10,1 g de producto crudo. Este se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (0,063-0,200 mm, 55 g), ∅ de la columna 4 cm, #1-152, 1.84 L CH_2Cl_2; #153-183, 1.55 L, CH_2Cl_2 : MeOH (80:1), #184-187, 280 mL, CH_2Cl_2 : MeOH (70:1), #188-192, 700 mL, CH_2Cl_2 : MeOH (40:1), obteniéndose un sólido blanco (#176-191; 2.4g) con un 60% de rendimiento. El sólido se cristalizó en CH_2Cl_2 obteniéndose un sólido blanco (1.7 g) con un 70 % de rendimiento en la cristalización.

R_f: 0,48 [SiO_2 de 6 cm, en CH_2Cl_2 : MeOH (20 :1)].

P.f: 100-101°C (en CH_2Cl_2) (de literatura: 100-101°C).[99]

IR (pastilla KBr)υ: 3280 (st N-H), 3064, 3028, 2970, 2934, 2875 y 2839 (st aromático), 1976, 1952, 1876, 1818, 1764, 1600, 1582, 1492, 1456, 1429, 1362, 1300 (st S-O), 1200, 1137 (st S-O), 1070, 1035, 939, 913, 895, 836, 746, 701, 661, 553, 504, 486 cm^{-1}

^{1}H- RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ: 2.80 (dd, $J \cong J'$ = 6.8 Hz, 4H, 2(2´)-H_2), 3.20 [(dd, $J \cong J'$ = 6.8 Hz, 4H, 3(3')-H_2)], 4.31 [t ancho, $J \cong$ 6.2 Hz, 2H, NH(N'H)], 7.17- 7.20 [m, 10H, Ar(Ar')-H].

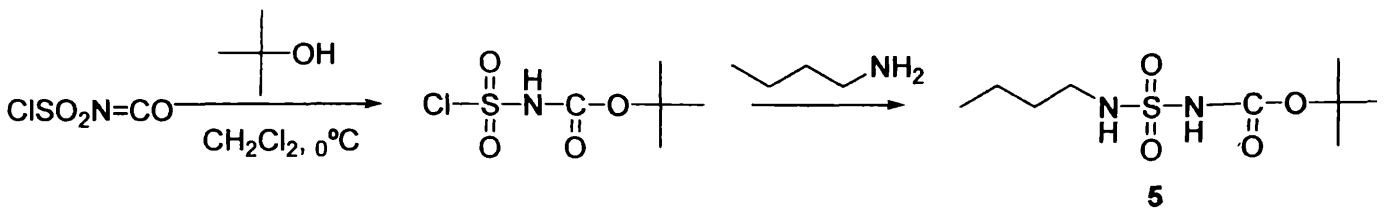
^{13}C-RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$) δ: 35.9 [CH_2, C1(1')] , 44.4 [CH_2, C2(2')], 127.0 (CH, Ar-C4 y Ar-4'), 129.0 [CH, Ar-C2(6) y Ar-C2'(6')], 129.05 [CH, Ar-C3(5) y Ar-C3'(5')], 138.3 (C, Ar-C1 y Ar-C1').

Análisis Elemental:

Calculado para $C_{16}H_{20}N_2O_2S$: C: 63.2% H: 6.6% N: 9.2% S: 10.5% O: 10,5%

Encontrado: C: 63.1% H: 6.8% N: 9.3% S:10.4% O:10,4%.

Obtención de *N*-butil - *N'*- (*tert*-butoxicarbonil) sulfamida, **5** .[31]



5

En un balón de 25 mL flameado, provisto de atmósfera inerte y agitación magnética, se preparó una disolución de clorosulfonil isocianato (CSI) (1.2 mL, 2.0 g, 14 mmol, 1 equiv.), en CH_2Cl_2 anhidro (7.0 mL, sobre tamiz molecular 4 Å). Se enfrió a 0°C con un baño agua-hielo y se añadió gota a gota con jeringa, una solución de *tert*- butanol (1.3 mL, 19 mmol, 1.4 equiv.). Se agitó a 0°C durante 1 h. Se agregó esta solución, gota a gota desde jeringa, a una solución de n-butilamina (1.4 mL, 14 mmol, 1 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (28 mL, sobre tamiz molecular 4 Å) y TEA (2,2 mL, 15,4 mmol, 1.1 equiv.). La mezcla resultante se agitó 1 h a 0°C y 2.5 h a temperatura ambiente.

Se siguió el curso de la reacción por cromatografía en capa fina (CCF).

La suspensión resultante se concentró en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg) y se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente hasta peso constante, obteniéndose 6.03 g de crudo de reacción.

Este se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (0,063-0,200 mm), ∅ de la columna 3 cm, #1-140, 3,41 L CH_2Cl_2; #141-142, 200 mL CH_2Cl_2 : MeOH (80:1), obteniéndose un sólido blanco (#60-140; 2,02g) con un 58 % de rendimiento.

Para la obtención de la muestra analítica se cristalizó el sólido en CH_2Cl_2: Hexano (1:3) obteniéndose un sólido blanco en un 41% de rendimiento.

R_f: 0,73 [placa SiO_2 de 10 cm ; FM: CH_2Cl_2 : MeOH (20 :1)] .

P.f: 144-145 °C [CH_2Cl_2: Hexano (1 :3)] ; (de literatura.: 153-154°C).[100]

IR (pastilla KBr) υ: 3366 y 3222 (st CON-H y N-H), 2990, 2964, 2938, 2880, 2700, 1701 (st C=O), 1469, 1456, 1372, 1347(st S-O), 1269, 1263, 1166, 1140 (st S-O), 1076, 1024, 979, 947, 921, 825, 793, 728, 605, 467, 461 cm^{-1}.

^{1}H- RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.93 (t, 3H, 4-H_4), 1.29-1.62 [m, 13H, (4H-(H_2,H_3)] (9H, H-*t*-CH_3)], 3.06 [q, *J*=6.8 Hz, 2H, $CH_2(H_1)$)], 5.07 (t, *J*≈6.0 Hz, 1H, N'-H), 7.25 (señal ancha , 1H, N-H).

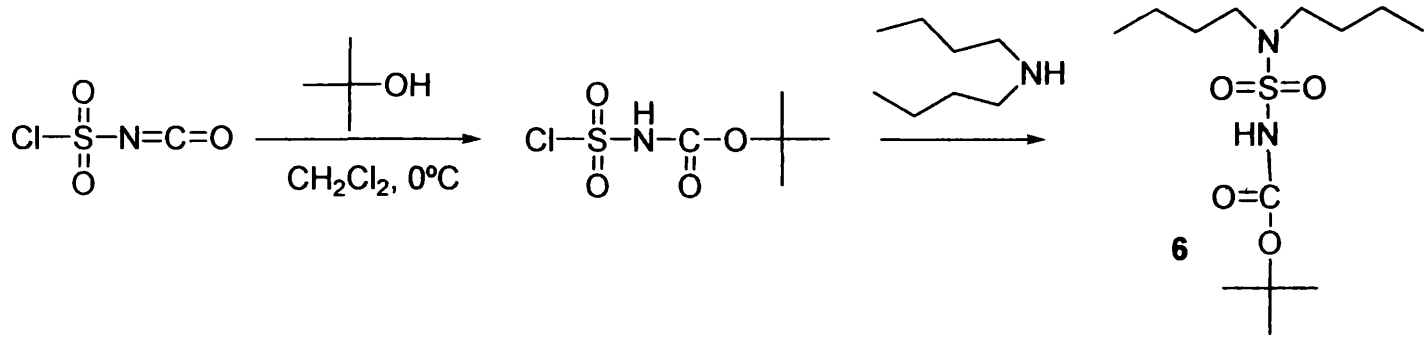
^{13}C- RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$)δ: 13.7 (CH_3, C4), 19.9 (CH_2, C3), 28.2 (CH_3, *t*-CH_3), 31.2 (CH_2, C2), 43.8 (CH_2, C1), 83.9 [C, C-(*t*-Bu)], 150.6 (C, C=O).

Análisis Elemental:

Calculado para $C_9H_{20}N_2O_4S$: C: 42.8% H: 8.0% N:11.1% S:12.7% O: 25.4%

Encontrado: C: 43.1 % H: 8.1% N: 11.2% S:12.3% O: 25.3%

Obtención de *N,N*-Dibutil-*N'*-(*tert*-butoxicarbonil)-sulfamida, **6**.



En un balón de 25 mL flameado, provisto de agitación magnética bajo atmósfera de argón, se preparó una disolución de clorosulfonil isocianato (CSI) (1.2 mL, 2.0 g, 14 mmol, 1 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (8 mL, sobre tamiz molecular 4 Å). Se enfrió a 0°C con un baño agua-hielo y se añadió gota a gota con jeringa, una solución de *tert*- butanol (1.4 mL, 1.4 g, 19 mmol, 1.4 equiv.). Se agitó a 0°C durante 1 h. Esta se agregó gota a gota desde jeringa, a una solución de N,N-di-butilamina recién destilada (1.3 mL, 14 mmol, 1 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (25 mL, sobre tamiz molecular 4 Å) y trietilamina (TEA) recién destilada (2.2 mL, 15.4 mmol, 1.1 equiv.). La mezcla resultante se agitó 1 h a 0°C y 4 h a temperatura ambiente. Se siguió el curso de la reacción por cromatografía en capa fina (CCF).

La suspensión resultante se concentró en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg) y se secó en tambor de vacío a temperatura ambiente hasta peso constante obteniéndose 6.8 g de un aceite. Este se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (14g, 0.063-0.200 mm), ∅ de la columna 4 cm, #1-100, 1.20 L CH_2Cl_2: Hexano (1:1), obteniéndose un aceite incoloro (#73-102; 2.04 g) con un 48 % de rendimiento.

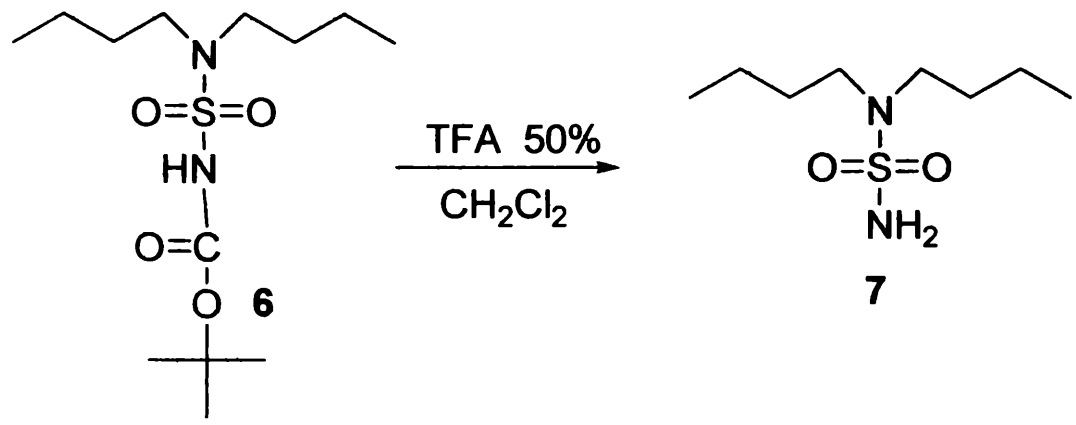
R_f: 0.49 [placa SiO_2 de 5 cm ; FM: CH_2Cl_2].

IR (pastilla ClAg): 3273 (CON-H), 2964, 2938, 2874, 1746, 1701 (C=O), 1450, 1437, 1366, (S-O), 1237, 1179, 1140 (S-O), 1050, 1031, 992, 915, 825, 780, 728, 593 cm^{-1}.

^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.93 (t, $J \approx 7.3$ Hz, 6H, 4(4')-H_3), 1.29-1.62 [m, 17H, (8H-2(2')-H_2 y 3 (3')-H_2); (9H, H-tert-Bu)], 3.31 [t, $J \approx 7.6$ Hz, 4H, 1(1')-H)], 7.16 (s, señal ancha , 1H, N-H).

^{13}C-RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.0 [CH_3, C4(4')], 20.1 [CH_2, C3(3')], 28.3 (CH_3, *tert*-Bu), 30.6 (CH_2, C2), 48.9 (CH_2, C1), 83.4 [C, C-(*t*-Bu)], 150.2 (C, C=O).

Obtención de *N,N*-di- butilsulfamida, **7**[101] a partir de **6**.



En un balón de 25 mL flameado, provisto de burbujeador para argón, trampa para gases de $CaCl_2$ y agitación magnética, se preparó una disolución de *N,N*-dibutil-*N'*-(*tert*-butoxicarbonil)-sulfamida **6**, (741 mg, 2.4 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (3.0 mL, sobre tamiz molecular 4 Å).

Se enfrió a 0°C con un baño agua-hielo y se añadió gota a gota con jeringa, una solución fría a 0°C de ácido trifluoroacético (TFA) al 50% (0.53 mL, 7.2 mmol, 3 equiv.) en 0.53 mL de CH_2Cl_2 anhidro (sobre tamiz molecular 4 Å). Se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 23 h. El curso de la reacción se controló por cromatografía en capa fina (CCF).

Se codestiló con éter etílico en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg), y luego se secó con bomba de alto vacío (2 mm de Hg) hasta peso constante obteniéndose 432 mg de un sólido amarillo pastoso.

Este se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (30g, 0,063-0,200 mm), ∅ de la columna 3 cm, #1-157, 1.65 L CH_2Cl_2, obteniéndose un sólido blanco (#72-156; 329 mg) con un 66 % de rendimiento.

R_f: 0. 33 [placa SiO_2 de 5 cm; FM: CH_2Cl_2] .

Pf: 65- 65.5 °C [cristalizado en CH_2Cl_2].

IR (pastilla KBr) υ: 3383 y 3260 (st NH_2), 2957 y 2867 (st alifático), 1553, 1463, 1353 (st S-O), 1147 (st S-O), 1018, 895, 754, 734, 541 cm^{-1}.

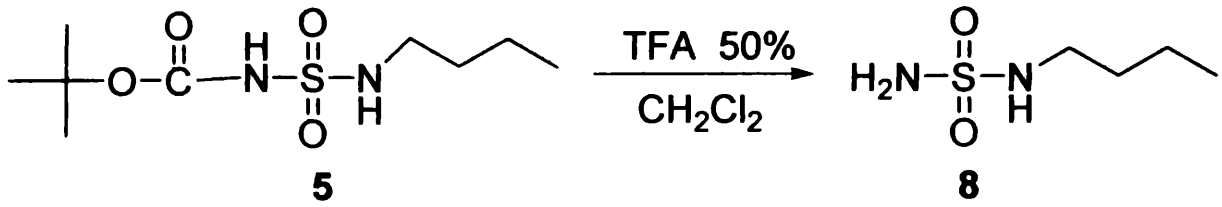
^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.95 (t, $J \approx 7.3$ Hz, 6H: CH_3), 1.32-1.67 (m, 8 H: β-CH_2 y γ-CH_2), 3.14 (t, $J \approx 7.4$ Hz, 4H: α-CH_2), 4.58 (s, señal ancha , 1H: NH).

^{13}C-RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.0 [CH_3, C4(4')], 20.2 [CH_2, C3(3')], 30.5 (CH_2, C2), 48.3 (CH_2, C1).

Análisis Elemental:

Calculado para $C_8H_{20}N_2O_2S$:	C: 46.1%	H: 9.7%	N:13.4%	S:15.4%	O:15.4%
Encontrado:	C: 46.3%	H: 9.5%	N:13.4%	S:15.1%	O:15.7%

Obtención de *N*-butilsulfamida, **8** [29,101] a partir de **5.**



5 **8**

En un balón de 10 mL flameado, provisto de burbujeador de argón, trampa de $CaCl_2$ y agitación magnética, se preparó una disolución de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N'*-butilsulfamida, **5** (1,00g, 3.96 mmol, 1 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (3 mL, sobre tamiz molecular 4 Å).

Se enfrió a 0°C con un baño agua-hielo y se añadió gota a gota con jeringa, una solución fría a 0°C de ácido trifluoroacético (TFA) al 50% (0.90 mL, 12 mmol, 3 equiv.) en CH_2Cl_2 anhidro (0.90 mL) secado sobre tamiz molecular 4 Å. Se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 23.5 h. El curso de la reacción se controló por cromatografía en capa fina (CCF).

Se codestiló con éter etílico (3 * 3 mL) en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg), luego se secó con bomba de alto vacío (1 mm de Hg) hasta peso constante, obteniéndose 700 mg de un aceite amarillo. Este se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (30g, 0.063-0.200 mm), ∅ de la columna 3 cm, #1-172, 1.75 L CH_2Cl_2; #172-182, 250 mL, CH_2Cl_2: MeOH (60:1); obteniéndose un sólido blanco (#110-181, 543 mg) con un 82 % de rendimiento. Se cristalizó en CH_2Cl_2: Hexano (1: 2), con un 88% de rendimiento en la cristlización.

R_f: 0, 29 [placa SiO_2 de 10 cm ; FM: CH_2Cl_2 : MeOH (20:1)] .

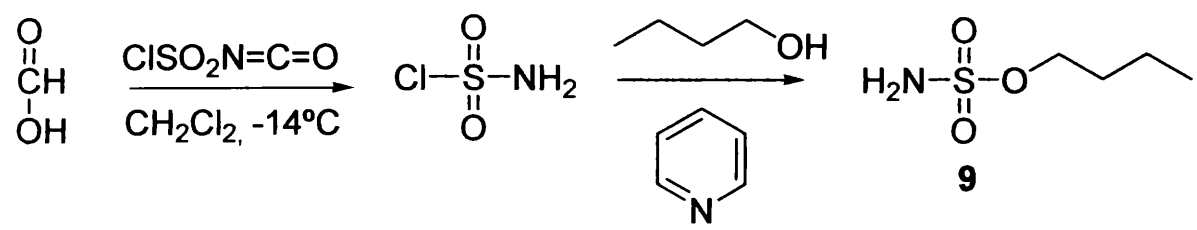
Pf: 47-48 °C [CH_2Cl_2 : Hexano (1: 2)]. (descripto: 52°C)[102]

IR (pastilla KBr) υ: 3325, 3318 y 3273 (N-H y NH_2), 3099, 3035, 2874, 1946, 1888, 1817, 1669, 1591, 1559, 1437, 1340 (S-O), 1160 (S-O), 1070, 1031, 979, 915, 863, 812, 722, 688, 605 cm^{-1}.

^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.91 (t, $J \approx 7.3$ Hz, 3H: CH_3), 1.23-1.61 (m, 4H: β y γ -CH_2), 3.08 (cuadruplete, $J \approx 6.8$ Hz, 2H: α-CH_2), 4.74 (t señal ancha, 1H: NH), 4.93 (s, señal ancha , 2H, NH_2).

^{13}C-RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$) δ: 13.8 (CH_3), 20.0 (γ-CH_2), 31.6 (β-CH_2), 43.6 (α-CH_2).

Obtención de n-butilsulfamato **9**[29] por reacción del alcohol con cloruro de sulfamoilo in situ.[103]



En un tubo de reacción de 20 mL flameado, provisto de agitación magnética, bajo atmósfera de Ar, se colocó clorosulfonil isocianato (CSI) (1.5 mL, 17.2 mmol, 1.0 equiv., Aldrich) que se enfrió a -14°C con un baño hielo-sal. Se agregó gata a gota con jeringa ácido fórmico 88% (0.7 mL, 17.2 mmol, 1.0 equiv., Mallinkroff) tomando la adición 13 minutos. Se agitó vigorosamente durante 6 minutos, observándose fuerte desprendimiento gaseoso y la aparición un precipitado blanco. Se agregó diclorometano seco (5 mL) recién destilado, secado sobre tamiz molecular 4 Å, obteniéndose una solución amarilla que se agitó durante 1 h. Se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, hasta obtener una solución rosa viejo que se enfrió a 0°C con un baño agua/hielo.

En otro balón de 5 mL, flameado, bajo atmósfera de Ar, se preparó una solución de n-butanol (1.0 mL, 10.9 mmol, 0.63 equiv.) y piridina (1.4 mL, 17.3 mmol, 1.0 equiv.) recién destilados. Esta solución se agregó con jeringa, gota a gota, a 0°C sobre la primera. Se observó desprendimiento de vapores blancos (PH=8-9). Se agitó durante 13h llevando la temperatura de 0°C a temperatura ambiente (25°C). La reacción se controló por cromatografía en capa fina (CCF).

La solución resultante se concentró en rotavapor a presión reducida (30 mm de Hg), obteniéndose un aceite pastoso amarillo claro. Se agregó 40 mL de AcOEt, obteniéndose un insoluble, que se eliminó con sucesivos lavados con HCl 1N (3 * 10 mL) y solución saturada de ClNa (3 * 10 mL), PH=4-5. La fase orgánica se juntó y se secó con SO_4Na_2 anhidro, se filtró y se evaporó en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg), obteniéndose 1.01g de un líquido amarillo. El liquído se disolvió en 30 mL de CH_2Cl_2 y se lavó con solución de $NaHCO_3$ 1N (2 * 10 mL) y solución saturada de ClNa (2 * 10 mL) hasta PH=7-8. La fase orgánica se secó con SO_4Na_2 anhidro, se filtró y se evaporó en rotavapor a presión reducida (30 mm de Hg) obteniéndose 630 mg de un líquido amarillo. El líquido se destiló a presión

reducida (60-65 °C/2-3 mm de Hg) utilizando un pequeño equipo de sublimación, obteniéndose 305 mg (18% de rendimiento) de un aceite incoloro.
El líquido se filtró por placa fritada y se secó a temperatura ambiente a presión reducida (2 mm de Hg) hasta peso constante.

R_f: 0, 53 [placa SiO_2 de 5 cm ; FM: CH_2Cl_2 : MeOH (20:1)].

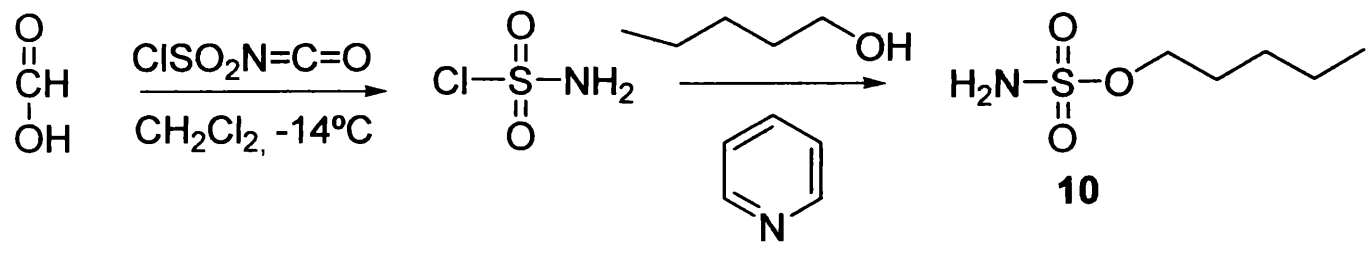
P.f: 26-27°C (determinado en baño de agua con termómetro de alcohol)

IR (pastilla ClAg) υ: 3376 y 3293 (st NH_2), 3106, 2964, 2938, 2874, 1714, 1566, 1553, 1463, 1366 (st S-O), 1179 (st S-O), 1115, 1057, 947, 876, 825, 799, 734, 593, 554 cm^{-1}.

^{1}H- RMN (200 MHz, CDCl3) δ: 0.93 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, 4-H_3), 1.33-1.51 (m, 2H, 2-H_2), 1.64-1.78 (m, 2H, 2-H_2), 4.19 (t, *J*≈6.5 Hz, 2H: α-CH_2), 5.15 (s, señal ancha , 2H : NH_2),

^{13}C-RMN (50.3 MHz, CDCl3) δ: 13.7 (CH_3, C4), 18.9 (CH_2, C3), 30.9 (CH_2, C2), 71.5 (CH_2, C1).

Obtención de n-pentilsulfamato **10**[29], por reacción del alcohol con cloruro de sulfamoilo in situ.[103]



En un tubo de reacción de 20 mL flameado, provisto de agitación magnética, bajo atmósfera de Ar, se colocó clorosulfurilisocianato (CSI) (1.5 mL, 17.2 mmol, 1.0 equiv.; Aldrich). Se enfrió a -14°C con un baño hielo-sal. Se agregó gata a gota con jeringa ácido fórmico 88% (0.7 mL, 17.2 mmol, 1.0 equiv., destilado a 30°C/35-40 mm Hg) tomando la adición 10 minutos. Se agitó enérgicamente durante 5 minutos, observándose fuerte desprendimiento gaseoso y la aparición de un precipitado blanco. Se agregó diclorometano seco (5 mL) recién destilado, secado sobre tamiz molecular 4 Å, obteniéndose una solución amarilla que se agitó durante 1 h. Se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, hasta obtener una solución rosa viejo que se enfrió a 0°C con un baño agua/hielo.

En otro balón de 5 mL, flameado, bajo atmósfera de Ar, se preparó una solución de n-pentanol (0.93mL, 8.6 mmol, 0.5 equiv., Aldrich 99%), piridina (1.4 mL, 17.3 mmol, 1.0 equiv.) recién destilada en diclorometano seco (5 mL), secado sobre tamiz molecular 4 Å. Esta solución se agregó con jeringa, gota a gota, a 0°C sobre la primera. Se observó desprendimiento de vapores blancos. Se agitó durante 18h llevando la temperatura de 0°C a temperatura ambiente (25°C). El curso de la reacción se controló por cromatografía en capa fina (CCF).

Se evaporó en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg), y se secó con alto vacío (1-2 mm de Hg) hasta peso constante, obteniéndose 5.17 g de un aceite amarillo.

El líquido se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (30g, 0,063-0,200 mm), ∅ de la columna 4 cm, #1-13, 220 mL CH_2Cl_2; #14-138, 1.25 L, CH_2Cl_2:MeOH (50:1); obteniéndose un sólido blanco (#66-108, 897 mg). El sólido blanco (#66-108, 897 mg) se sometió a una cromatografía en columna Flash, Gel de Sílice (22g, 0,063-0,200 mm), #1-81, 900 mL, CH_2Cl_2 obteniéndose un sólido blanco (#20-75, 635 mg) con un 41 % de rendimiento.

R_f: 0, 30 [placa SiO_2 de 6.6 cm ; FM: CH_2Cl_2 : MeOH (40:1)] .

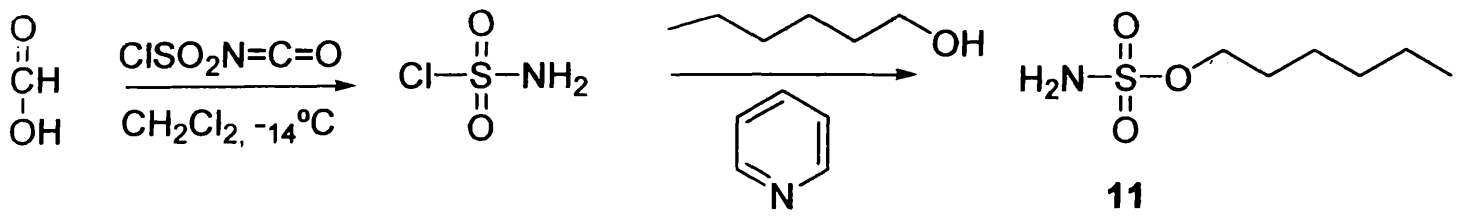
P.f: 38-39°C; (de literatura : 37-39°C).[29]

IR (pastilla KBr) υ: 3383 y 3285 (st NH_2), 3110, 2965, 2934, 2862, 2661, 1563, 1475, 1362 (st S-O), 1177 (st S-O), 1042, 955, 929, 821, 759, 728, 594, 553 cm^{-1}.

^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.86-0.97 (t, $J \approx 6.6$ Hz, 3H, 5-H_3), 1.30-1.44 (m, 4H, 3 y 4-H_2), 1.44-1.77 (m, 2H, 2-H_2), 4.19 (t, $J \approx$ 6.4 Hz, 2H, 1-H_2), 5.07 (s, señal ancha , 2H, NH_2).

^{13}C-RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$) δ: 14.4 (CH_3, C5), 22.7 (CH_2, C4), 28.1 (CH_2, C3), 29.0 (CH_2, C2), 72.2 (CH_2, C1).

Obtención de n-hexilsulfamato **11**, por reacción del alcohol con cloruro de sulfamoilo in situ.[103]



11

En un tubo de reacción de 20 mL flameado, provisto de agitación magnética, bajo atmósfera de Ar, se colocó clorosulfonil isocianato (CSI) (1.5 mL, 17.2 mmol, 1.0 equiv., Aldrich). Se enfrió a -14°C con un baño hielo-sal. Se agregó gata a gota con jeringa ácido fórmico 88% (0.7 mL, 17.2 mmol, 1.0 equiv. destilado 30°C/35-40 mm Hg) tomando la adición 10 minutos. Se agitó energicamente durante 5 minutos, observándose fuerte desprendimiento gaseoso y la aparición de un precipitado blanco. Se agregó diclorometano seco (4 mL) recién destilado, secado sobre tamiz molecular 4 Å, obteniéndose una solución amarilla que se agitó durante 1 h. Se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, hasta obtener una solución rosa viejo que se enfría a 0°C con un baño agua/hielo.

En otro balón de 5 mL, flameado, bajo atmósfera de Ar, se preparó una solución de n-hexanol (1.4 mL, 11.2 mmol, 0.65 equiv.), piridina (1.4 mL, 17.3 mmol, 1.0 equiv.) recién destilados y diclorometano seco (5 mL), secado sobre tamiz molecular 4 Å. Esta solución se agregó con jeringa, gota a gota, a 0°C sobre la primera. Se observó desprendimiento de vapores blancos. Se agitó durante 19h de 0°C a temperatura ambiente (25°C), controlándose la reacción por cromatografía en capa fina (CCF).

Se evaporó en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg), y luego se secó con bomba de alto vacío (1 mm de Hg) hasta peso constante obteniéndose 3.00 g de un sólido blanco. El sólido se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (70g, 0,063-0,200 mm), ∅ de la columna 3 cm, #1-3, 225 mL, CH_2Cl_2, #4-13, 100 mL, CH_2Cl_2 : MeOH (80:1); #14-23, 100 mL, CH_2Cl_2 : MeOH (70:1), #24-45, 220 mL, CH_2Cl_2 : MeOH (60:1), #46-56, 100 mL, CH_2Cl_2 : MeOH (50:1), #57-74, 365 mL, CH_2Cl_2 : MeOH (40:1), #75-81, 350 mL, CH_2Cl_2 : MeOH (30:1); obteniéndose un sólido blanco (#49-66, 851 mg) con un 50 % de rendimiento.

R_f : 0,40 [placa SiO_2 de 6.6 cm ; FM: CH_2Cl_2 : MeOH (20:1)] .

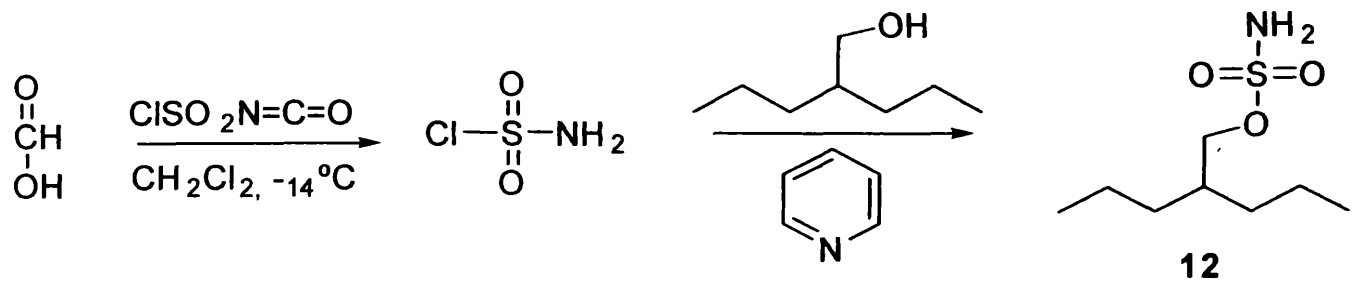
P.f: 48-49°C. (éter etílico)

IR (pastilla KBr) υ: 3383 y 3280 (st NH_2), 2932 y 2854 (st alifática), 1546, 1475, 1347 (st S-O), 1179 (st S-O), 1018, 973, 928, 844, 793, 741, 625, 599, 541, 477 cm^{-1}.

^{1}H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.85-0.92 (m, 3H, 5-H_3), 1.29-1.32 (m, 6H, 3, 4 y 5-H_2), 4.19 (m, 2H, 1-H_2), 1.66-1.76 (m, 2H, 2-H_2), 5.12 (s, señal ancha, 2H, NH_2),

^{13}C-RMN (50.3 MHz, $CDCl_3$) δ: 13.9 (CH_3, C6), 22.4 (CH_2, C5), 25.0 (CH_2, C4), 28.6 (CH_2, C3), 31.1 (CH_2, C2), 72.2 (CH_2, C1).

Obtención de 2-propilpentilsulfamato **12**, por reacción con cloruro de sulfamoilo in situ.[103]



12

En un tubo de reacción de 20 mL flameado, provisto de agitación magnética, bajo atmósfera de Ar, se colocó clorosulfonil isocianato (CSI) (1.5 mL, 17.2 mmol, 1.0 equiv., Aldrich). Se enfrió a -14°C con un baño hielo-sal. Se agregó gata a gota con jeringa ácido fórmico 88% (0.7 mL, 17.2 mmol, 1.0 equiv. destilado 30°C/35-40 mm Hg) tomando la adición 10 minutos. Se agitó energicamente durante 5 minutos, observándose fuerte desprendimiento gaseoso y la aparición de un precipitado blanco. Se agregó CH_2Cl_2 seco (3 mL) recién destilado, secado sobre tamiz molecular 4 Å, obteniéndose una solución amarilla que se agitó durante 1 h. Se llevó a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h, hasta obtener una solución rosa viejo que se enfría a 0°C con un baño agua/hielo. En otro balón de 5 mL, flameado, bajo atmósfera de Ar, se preparó una solución de 2-propilpentanol (1.8 mL, 11.5 mmol, 0.68 equiv., Aldrich), piridina (1.4 mL, 17.3 mmol, 1.0 equiv.) recién destilada y diclorometano seco (5 mL), secado sobre tamiz molecular 4 Å. Esta solución se agregó con jeringa, gota a gota, a 0°C sobre la primera. Se observó desprendimiento de vapores blancos. Se agitó durante 17h de 0°C a temperatura ambiente (25°C), controlándose la reacción por cromatografía en capa fina (CCF).

Se evaporó en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg), obteniéndose 6.14 g de un sólido amarillo claro.

Se agregó 50 mL de CH_2Cl_2, obteniéndose un insoluble, que se eliminó con sucesivos lavados solución saturada de ClNa (3 * 15 mL), PH=2-3, HCl 1 N (2 * 15 mL), solución saturada de $NaHCO_3$ (3 * 15 mL), solución saturada de ClNa (3 * 15 mL), PH=7. Las fases orgánicas se juntaron y se secaron con SO_4Na_2 anhidro, se filtró y se evaporó en rotavapor a presión reducida (40 mm de Hg), y se secó con bomba de alto vacío (1 mm de Hg), obteniéndose 2.00 g de un sólido amarillo. El sólido se sometió a cromatografía en columna de Gel de Sílice (40g, 0,063-0,200 mm), Ø de la columna 3 cm, #1-22, 390 mL, CH_2Cl_2, #23-84, 700 mL, CH_2Cl_2 : MeOH (40:1); obteniéndose un sólido blanco (#35-53, 765 mg) con un 32 % de rendimiento.

R_f: 0.33 (placa SiO_2 de 6.6 cm ; FM: CH_2Cl_2).

P.f: 60- 61 °C

IR (pastilla KBr) υ: 3362 y 3272 (st NH_2), 2957, 2931, 2866, 2725, 2622, 1534, 1463, 1347 (st S-O), 1173 (st S-O), 1024, 954, 921, 825, 696, 625, 548, 477 cm^{-1}.

^{1} H-RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ: 0.85-0.92 (m, 3H, $-H_3$), ,1.29-1.35 (m, 8H, $-H_2$), 1.68 (m, 1H, 2-H_1), 4.09 (d, $J \approx 5.4$ Hz, 2H, 1-H_2), 5.29 (s, señal ancha , 2H, NH_2),

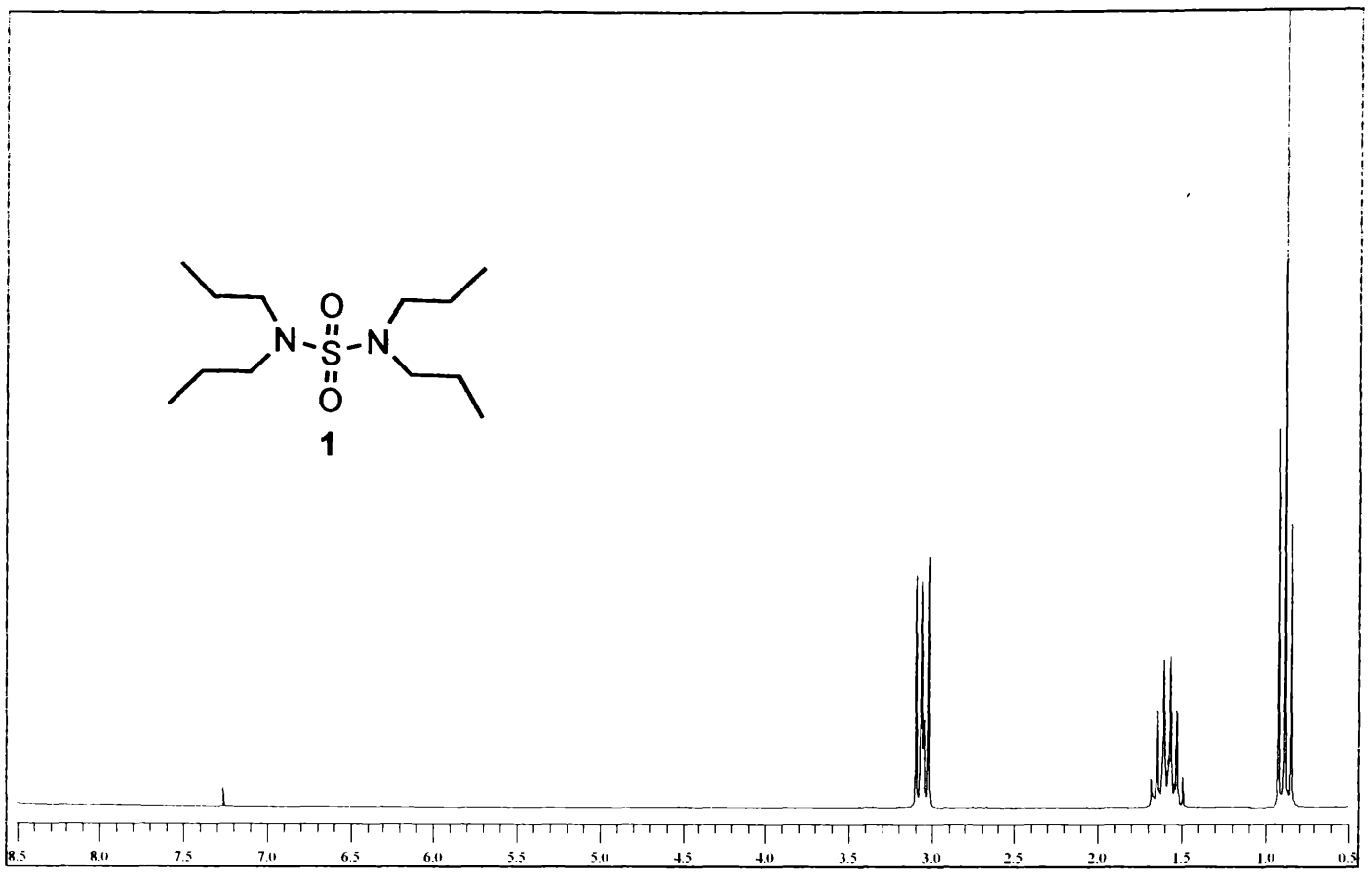
^{13}C-RMN (50.3 MHz, CDCl3)δ: 14.5 (CH_3, C5), 19.9 (CH_2, C4), 33.2 (CH_2, C3), 37.3 (CH, C), 74.2 (C, C1).

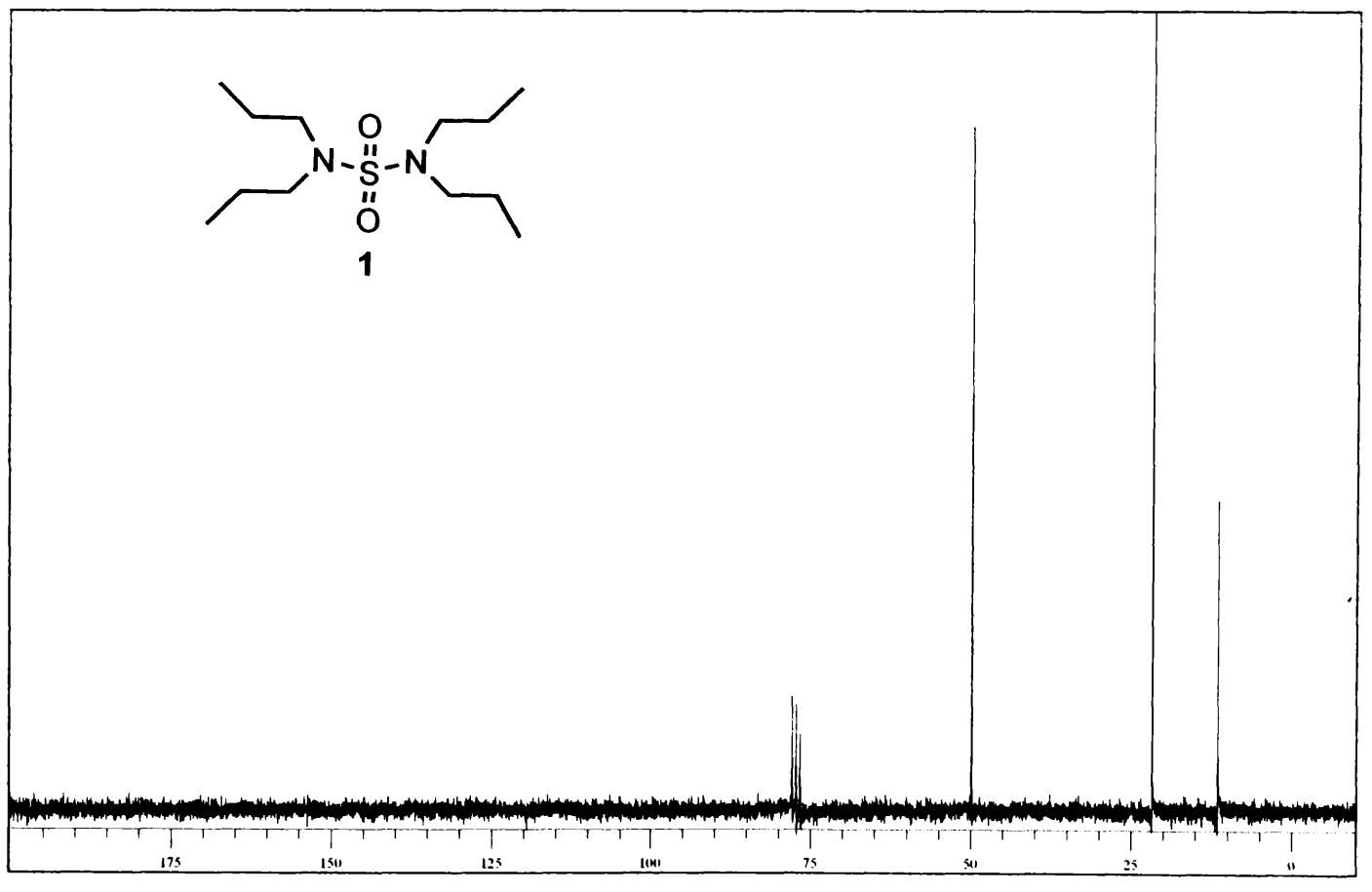
Análisis Elemental:

Calculado para $C_8H_{19}NO_3S$: C:45.9% H: 9.2% N:6.7 % S:15.3% O:22.9%.

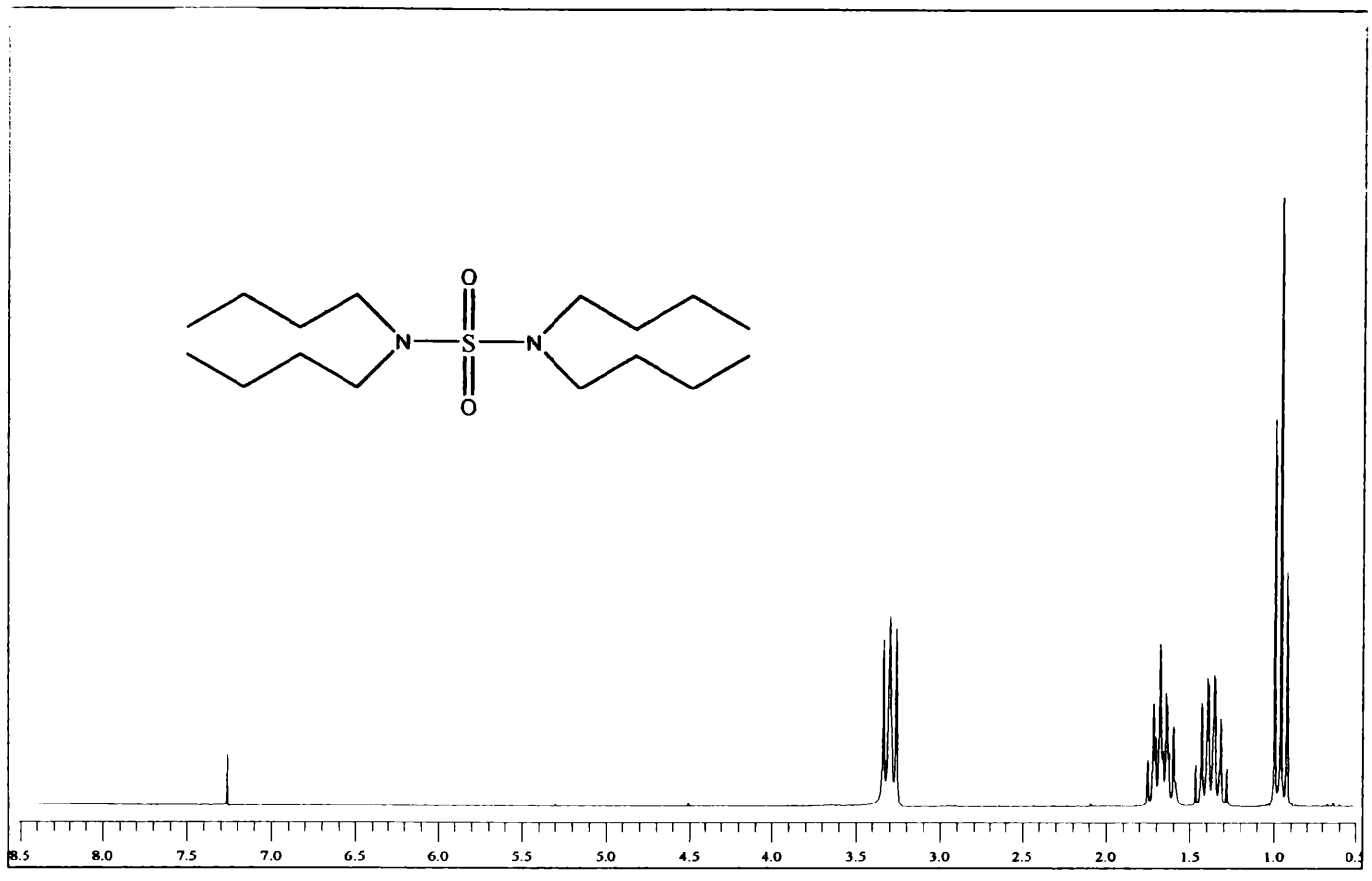
Encontrado : C:46.2% H: 9.0% N:6.8 % S:15.0 % O:23.0%.

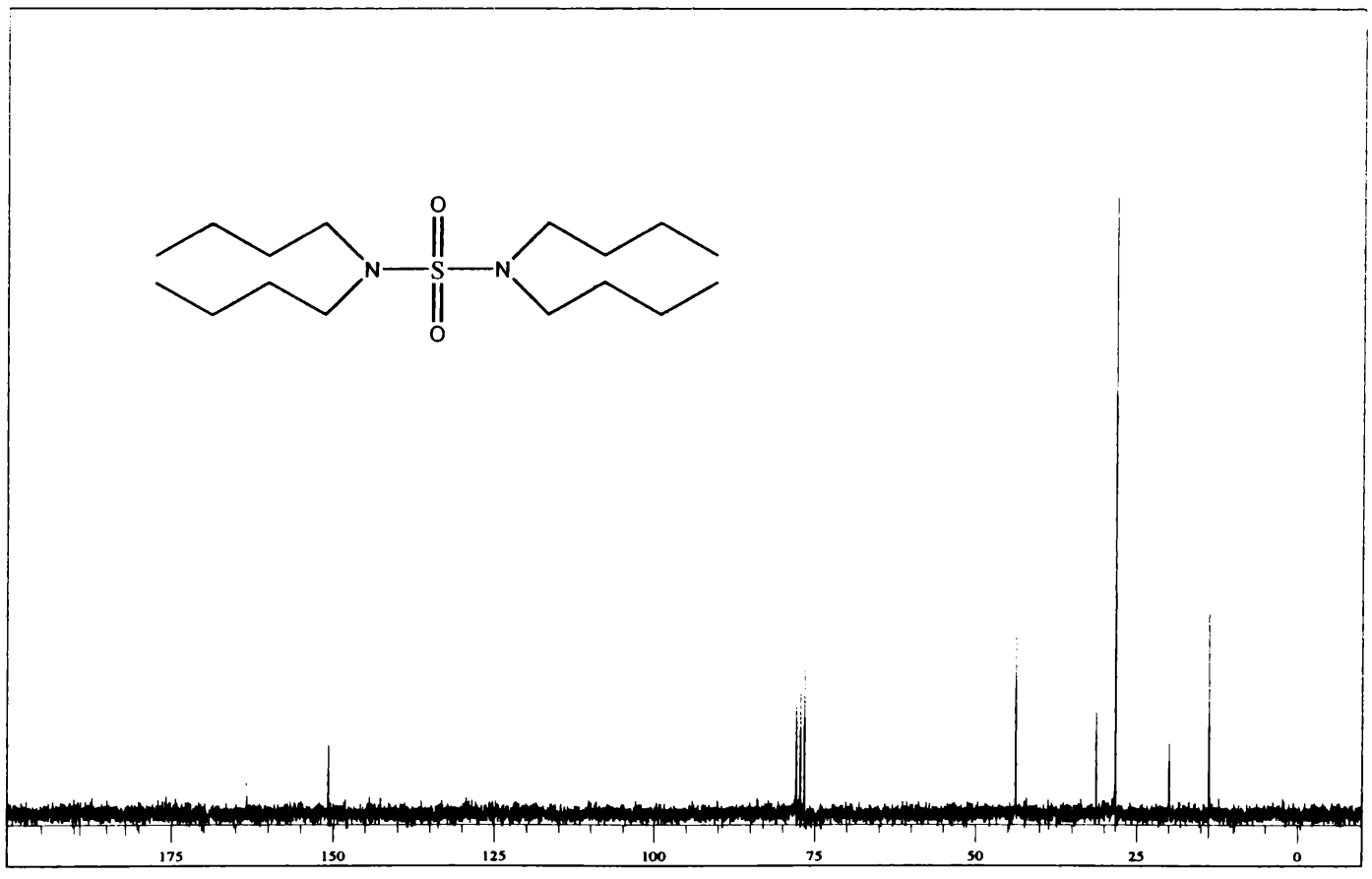
Espectros ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN e IR



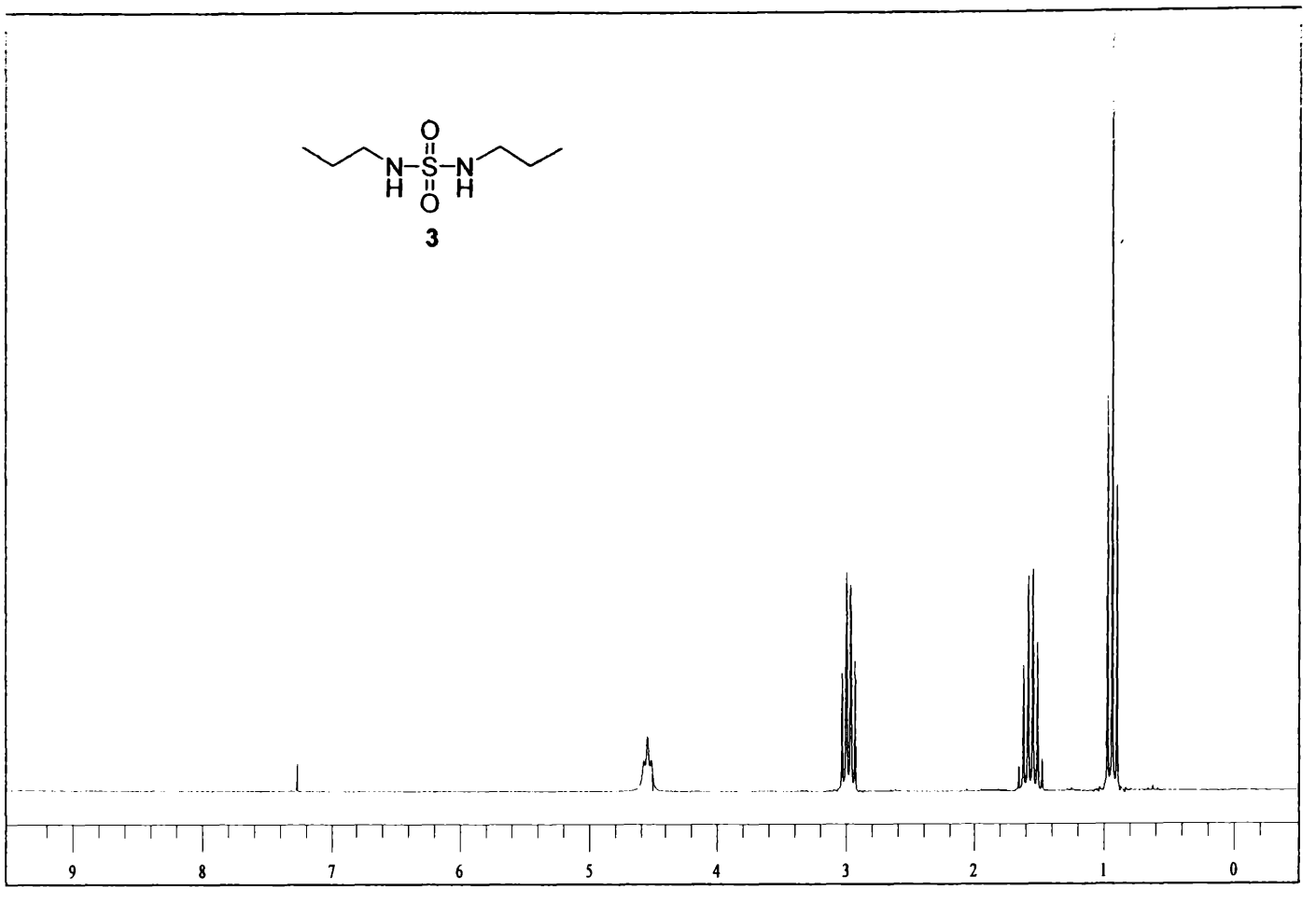


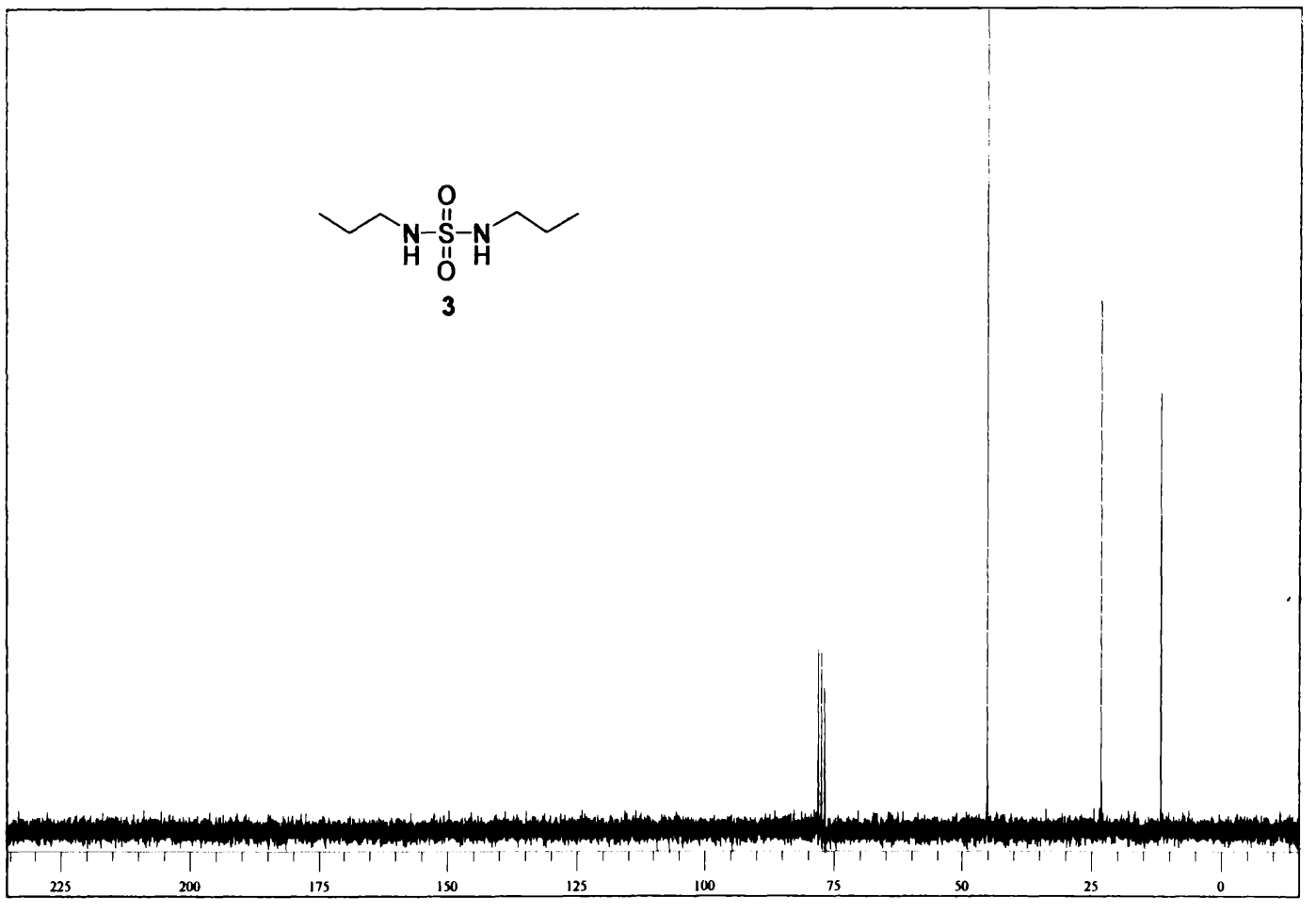
N, N, N'; N'-Tetrapropilsulfamida, **1**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



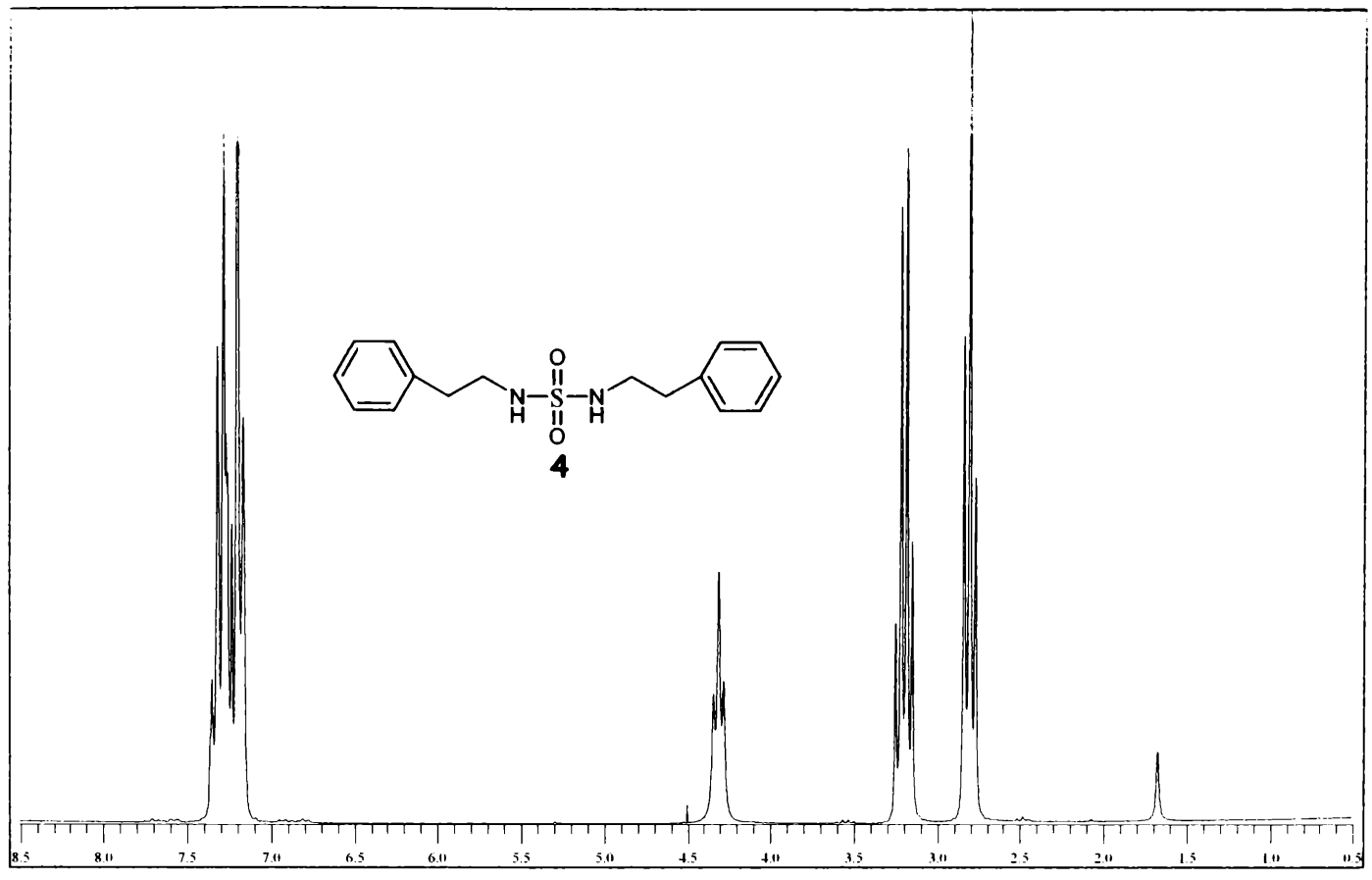


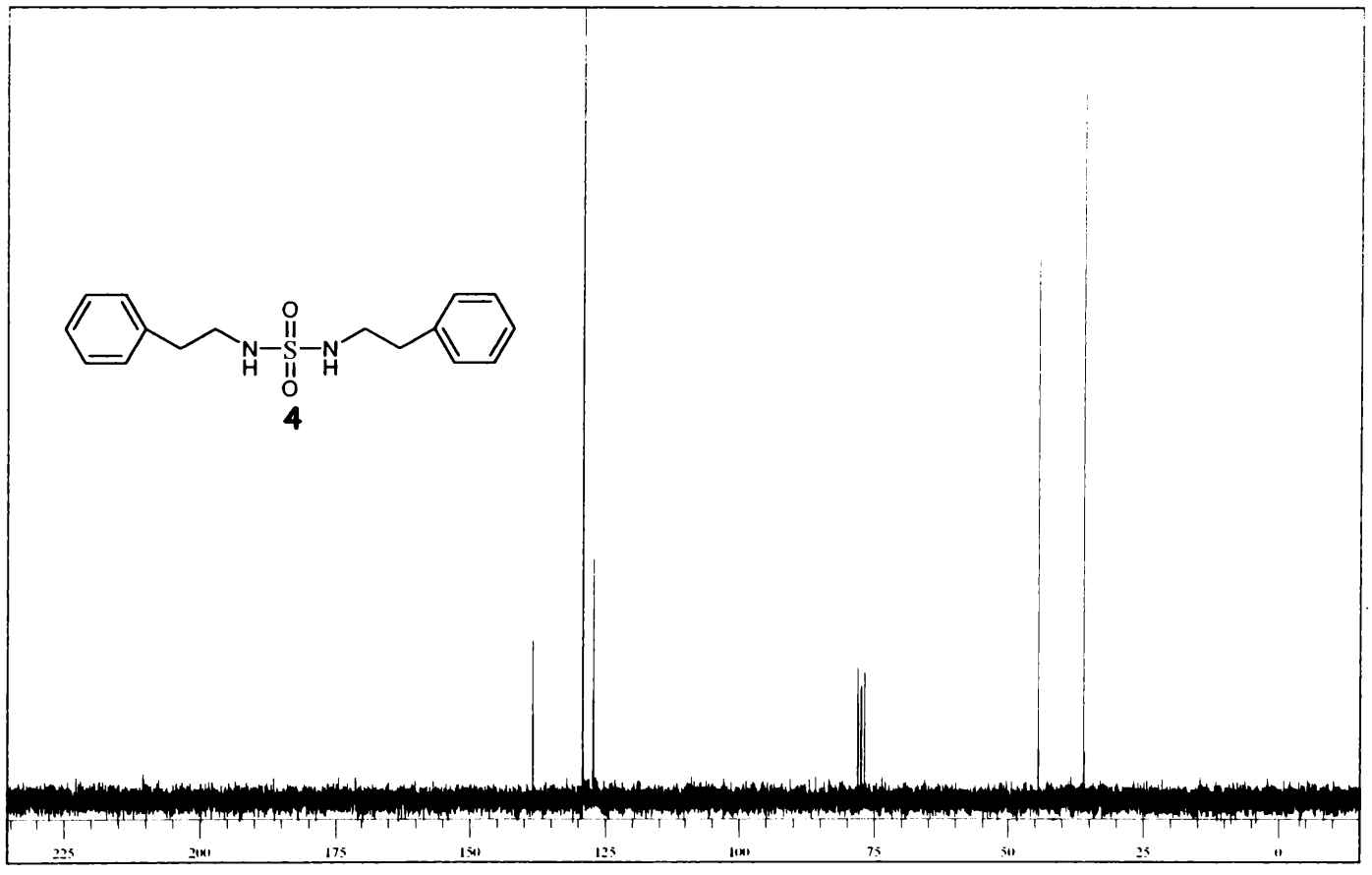
N, N, N'; N'-Tetrabutilsulfamida, **2**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



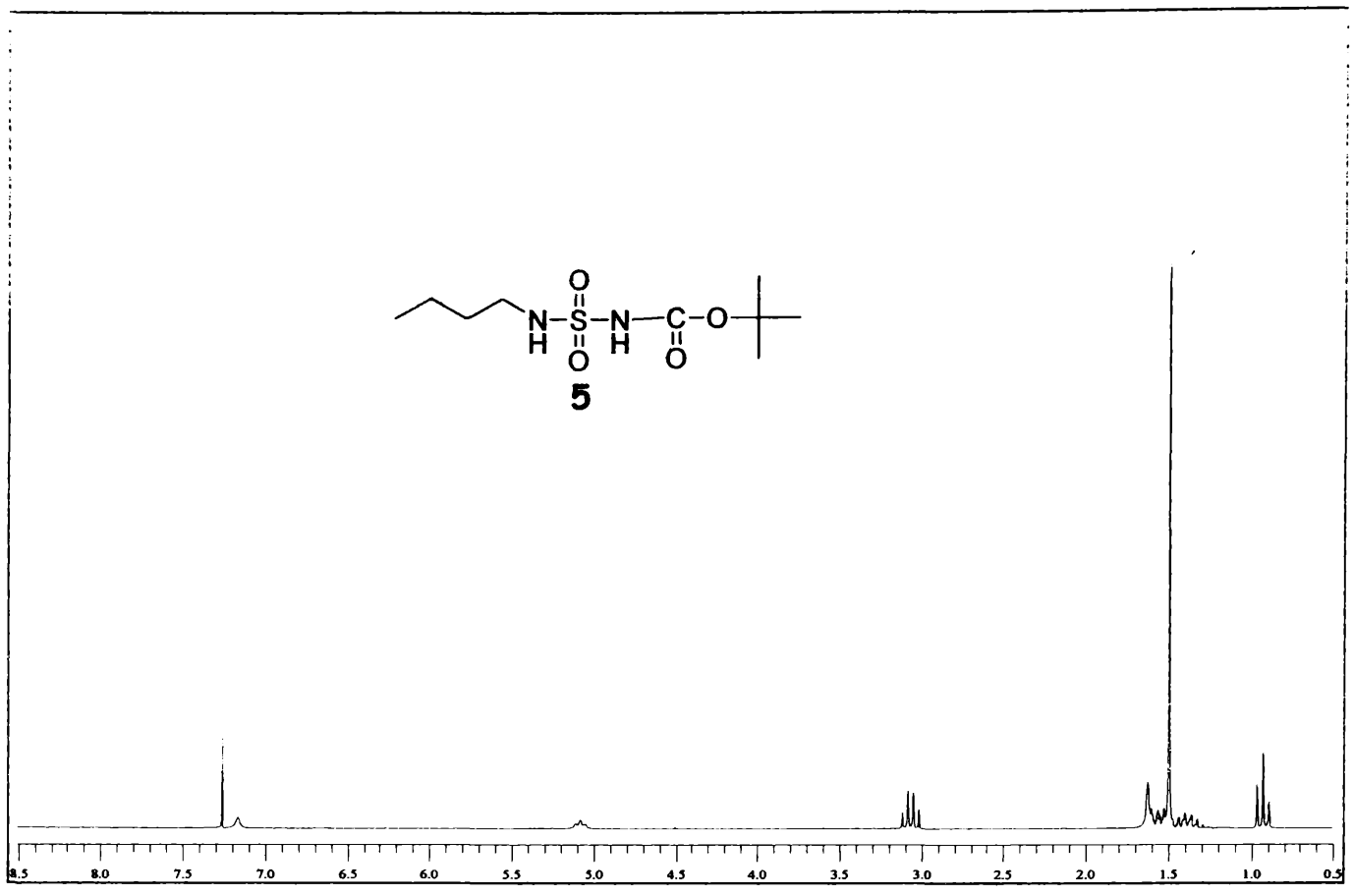


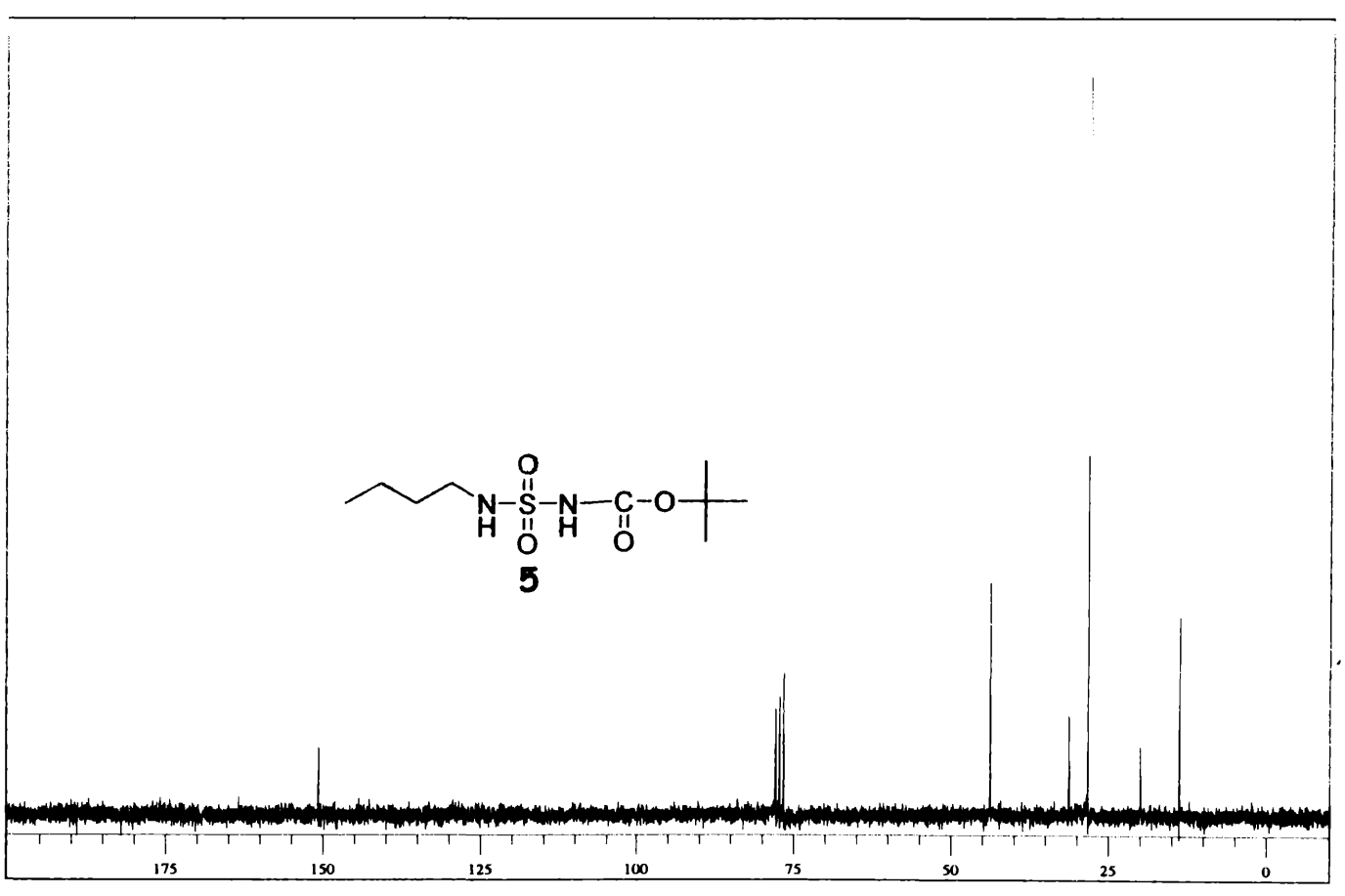
N, N'-Dipropilsulfamida, **3**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



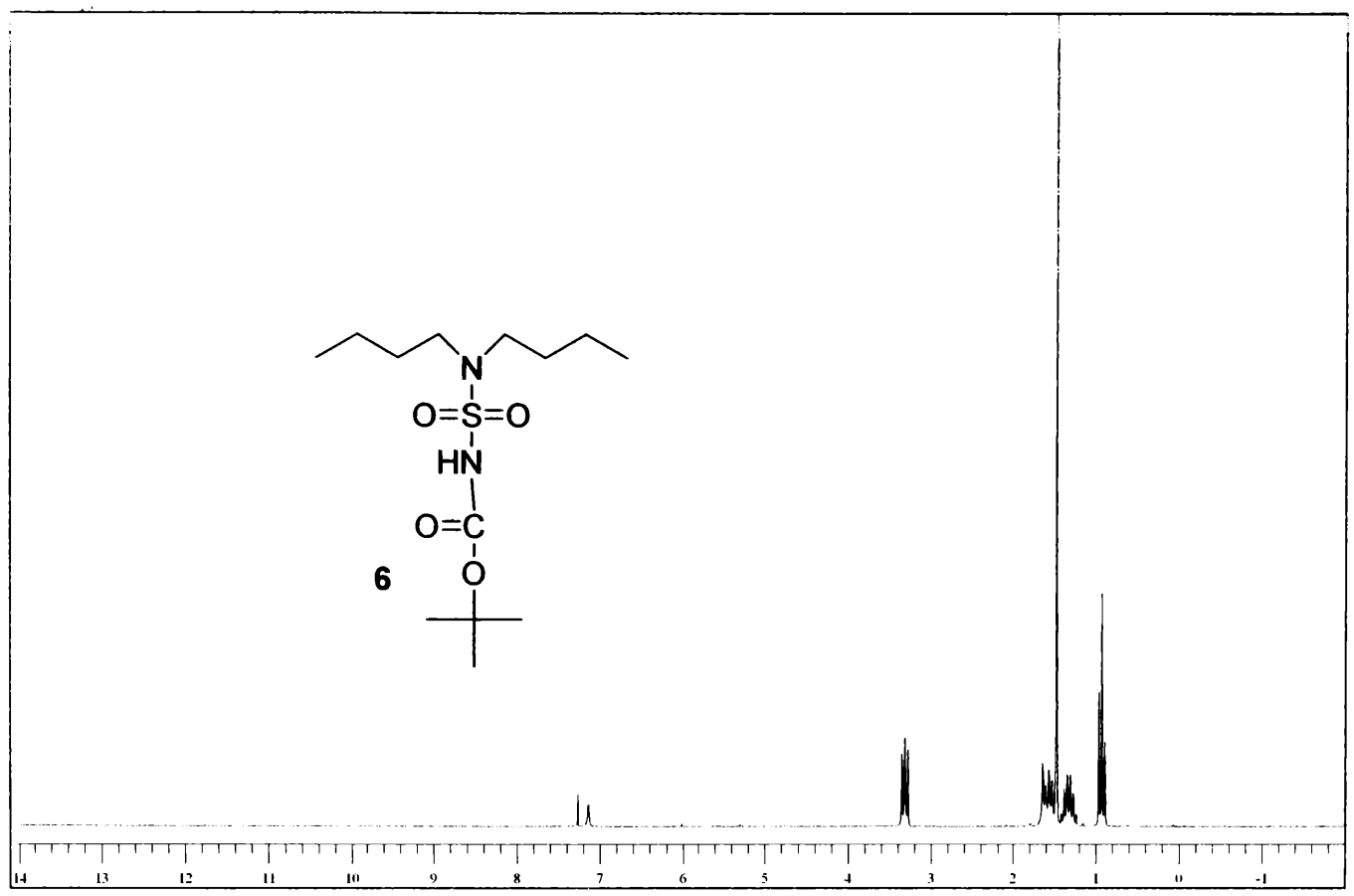


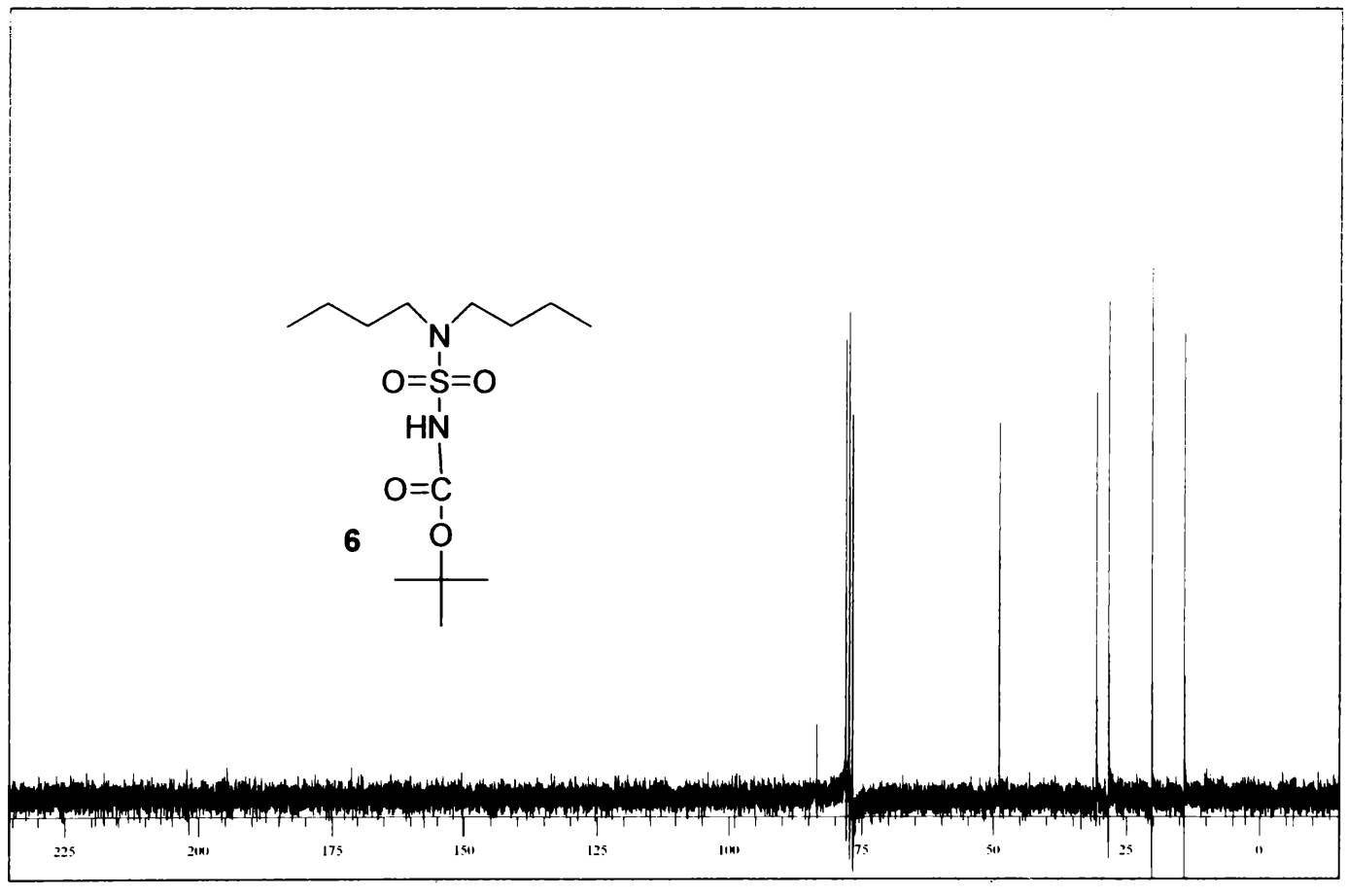
N, N'-Difenetilsulfamida, 4. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



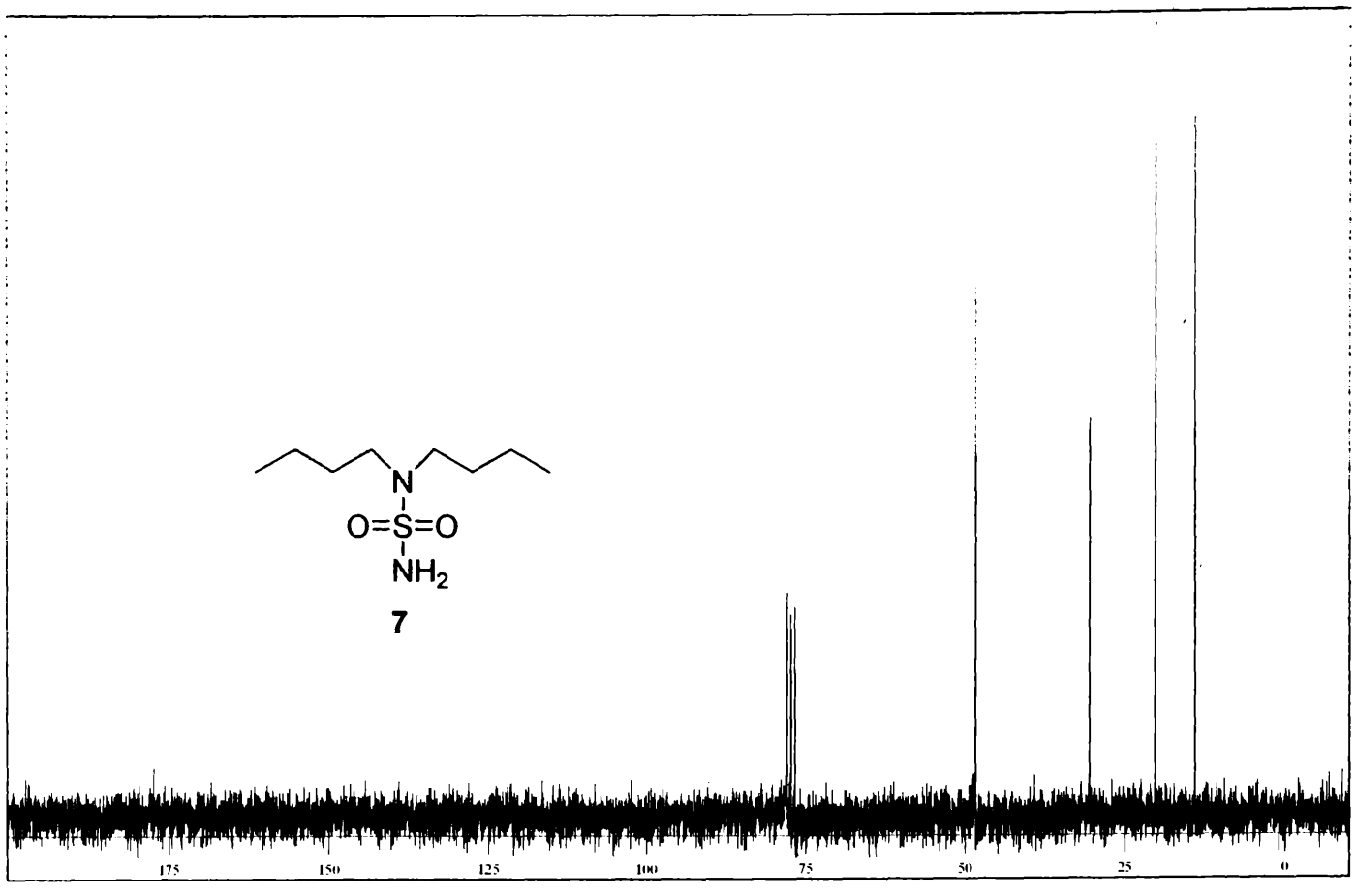


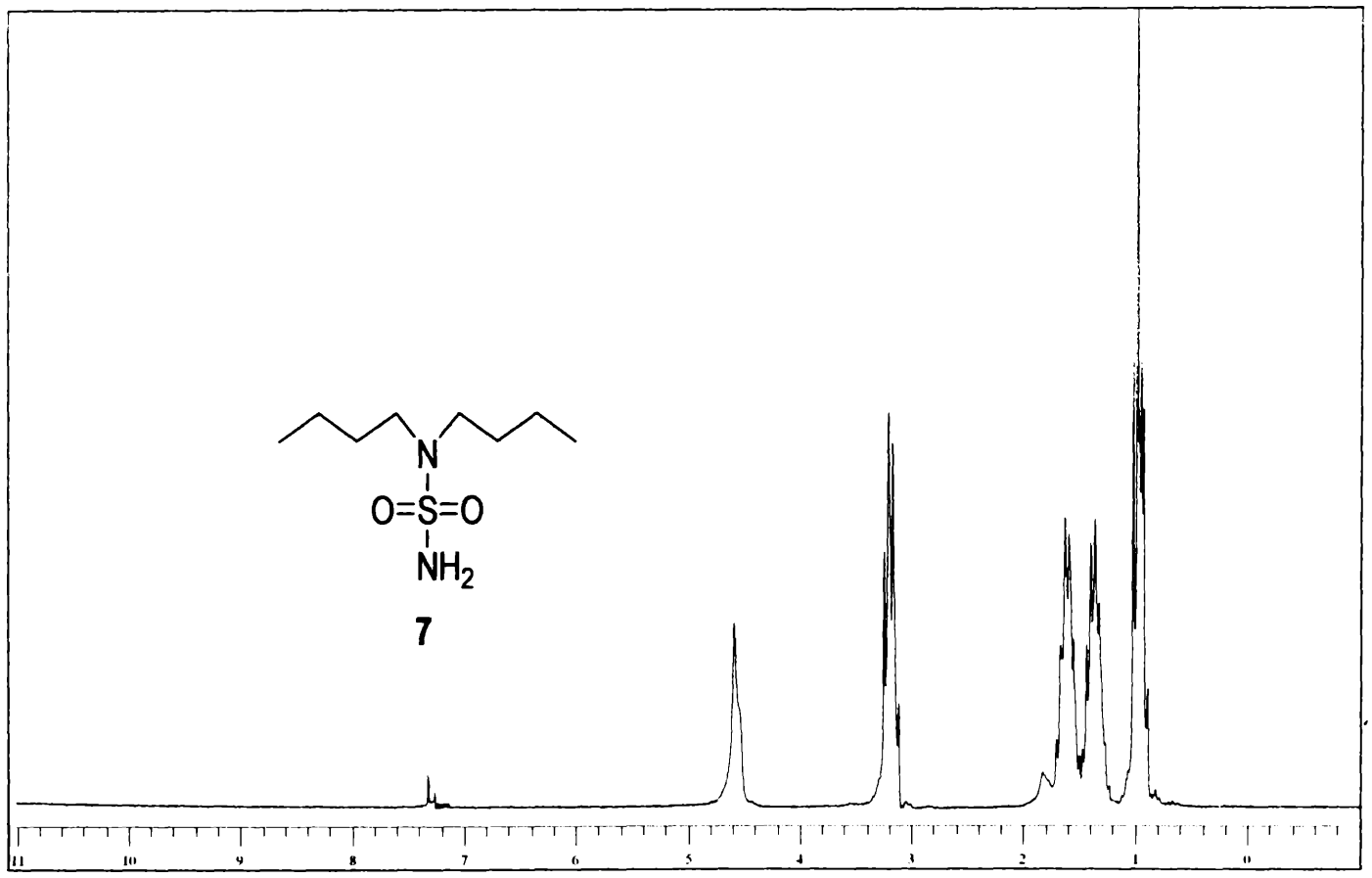
N-(*tert*-butoxicarbonil)- N'-butilsulfamida, 5. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



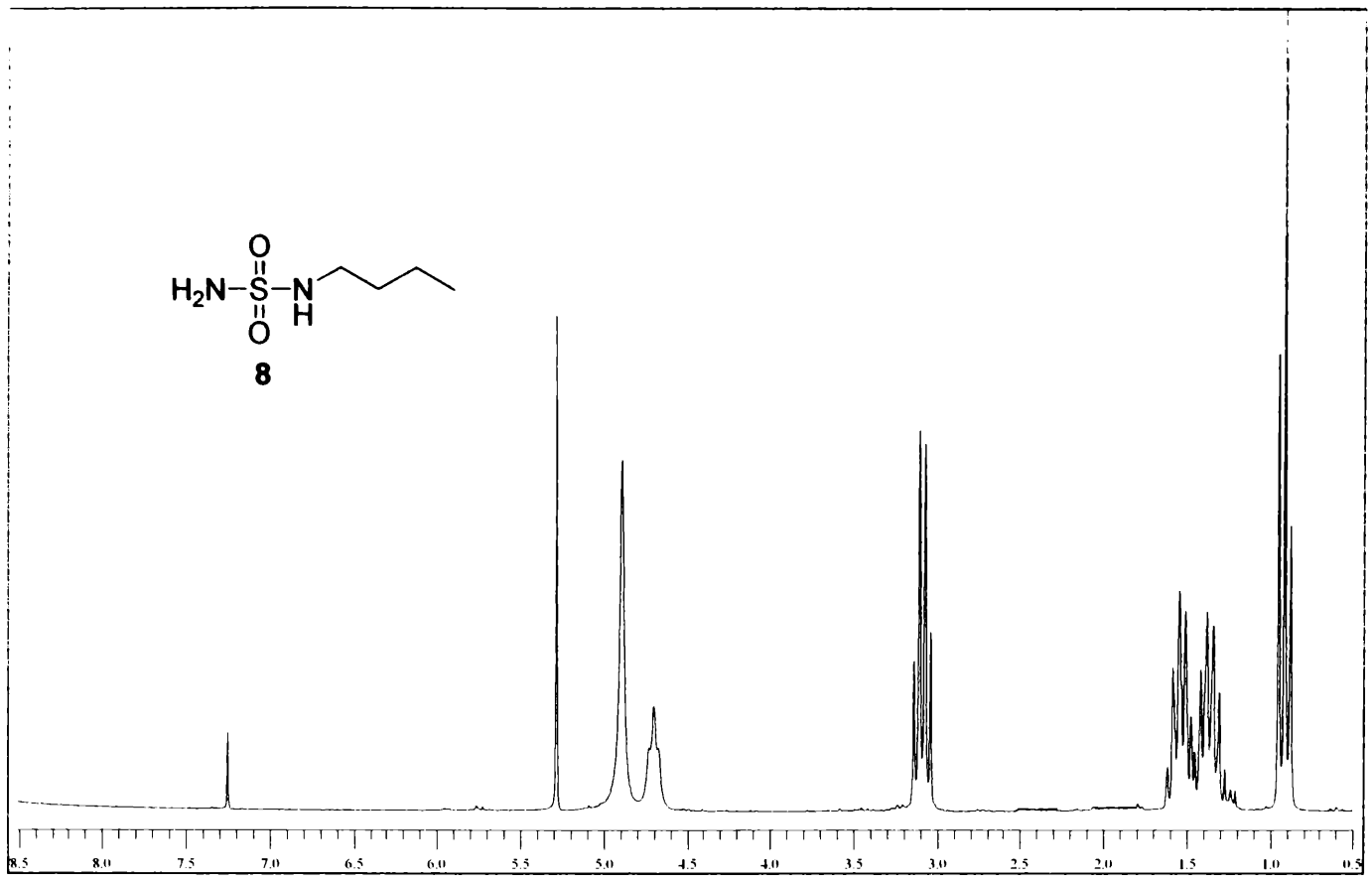


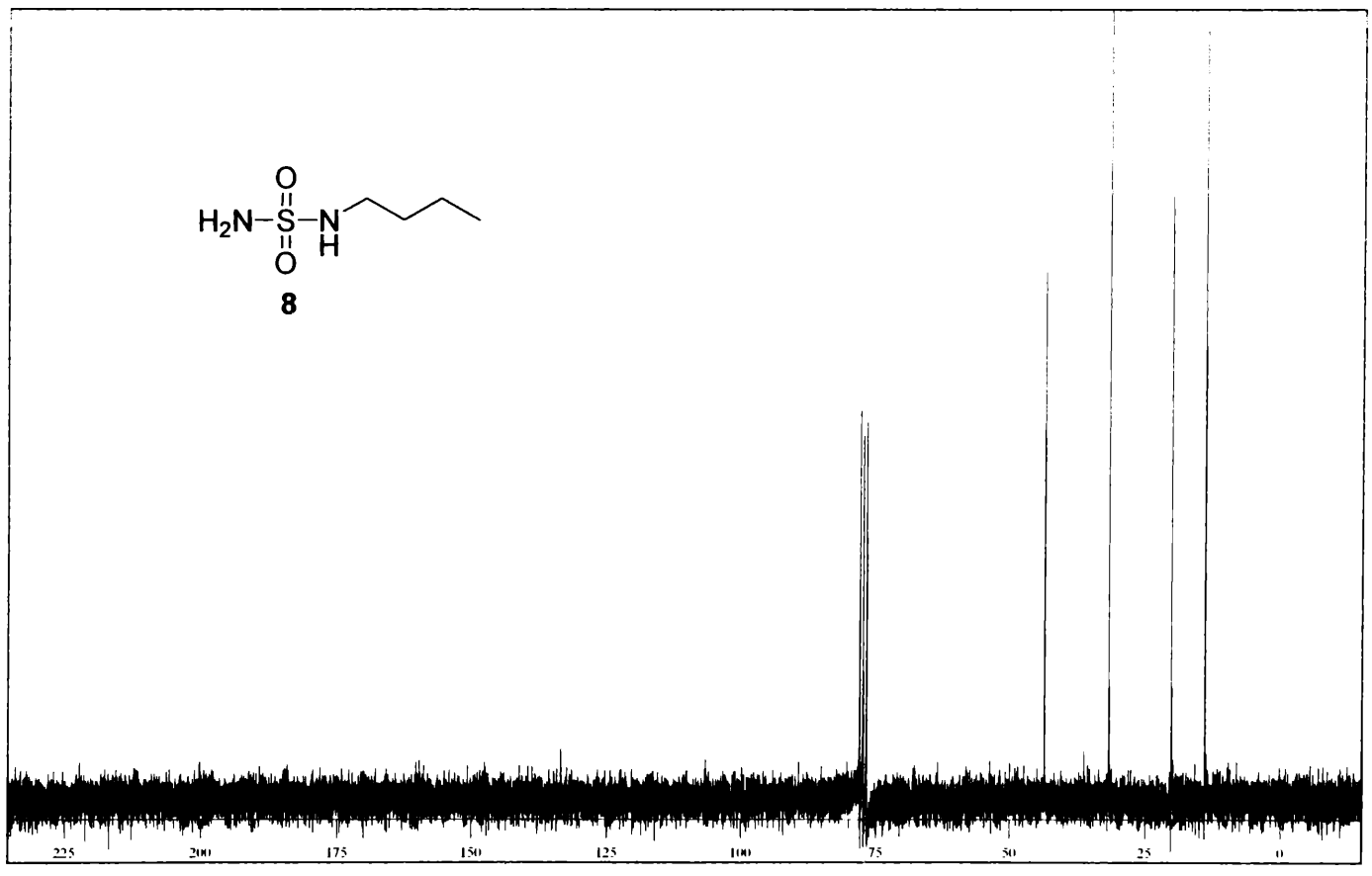
N-(*tert*-butoxicarbonil)- N'-dibutilsulfamida, **6**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



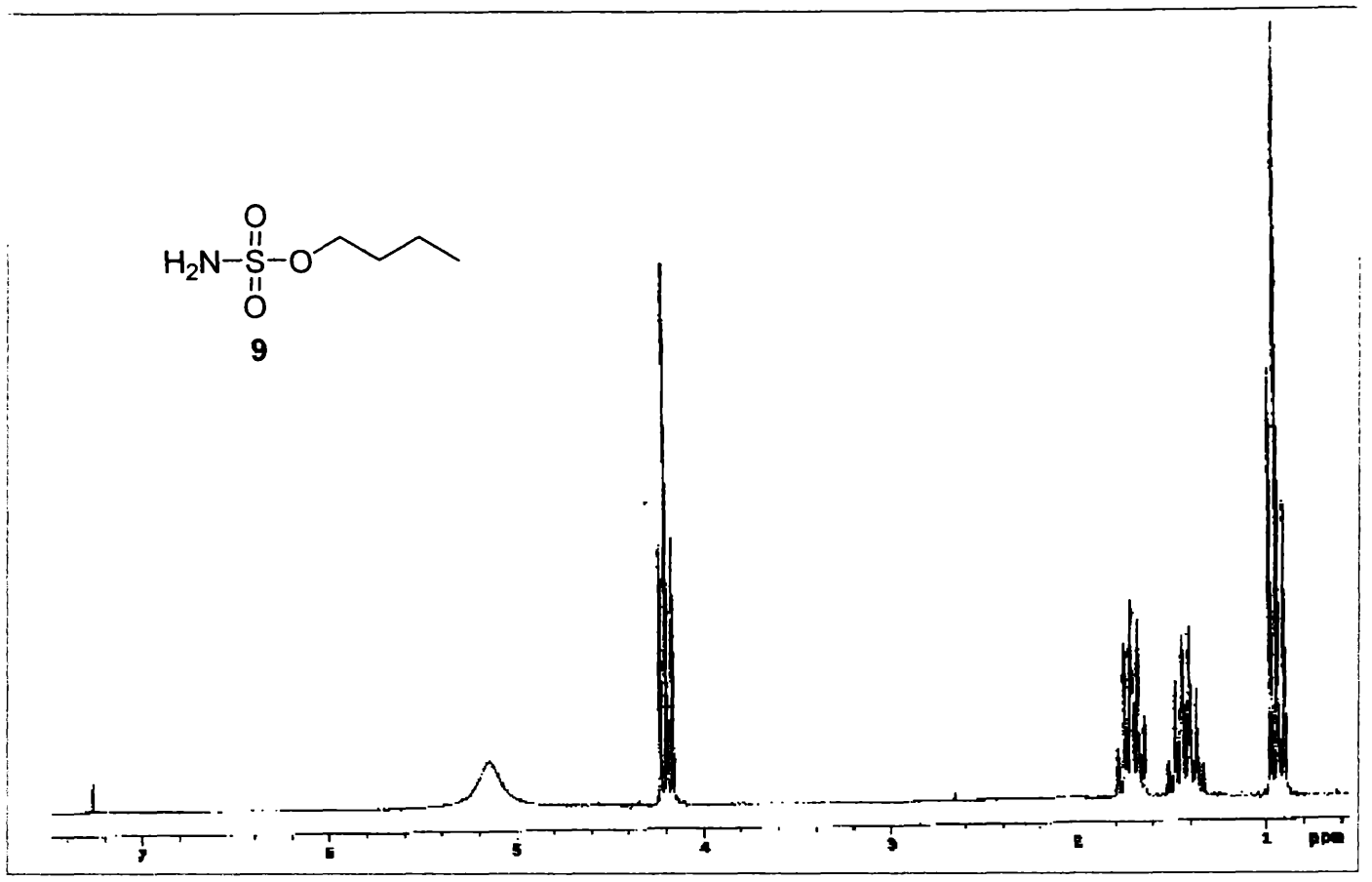


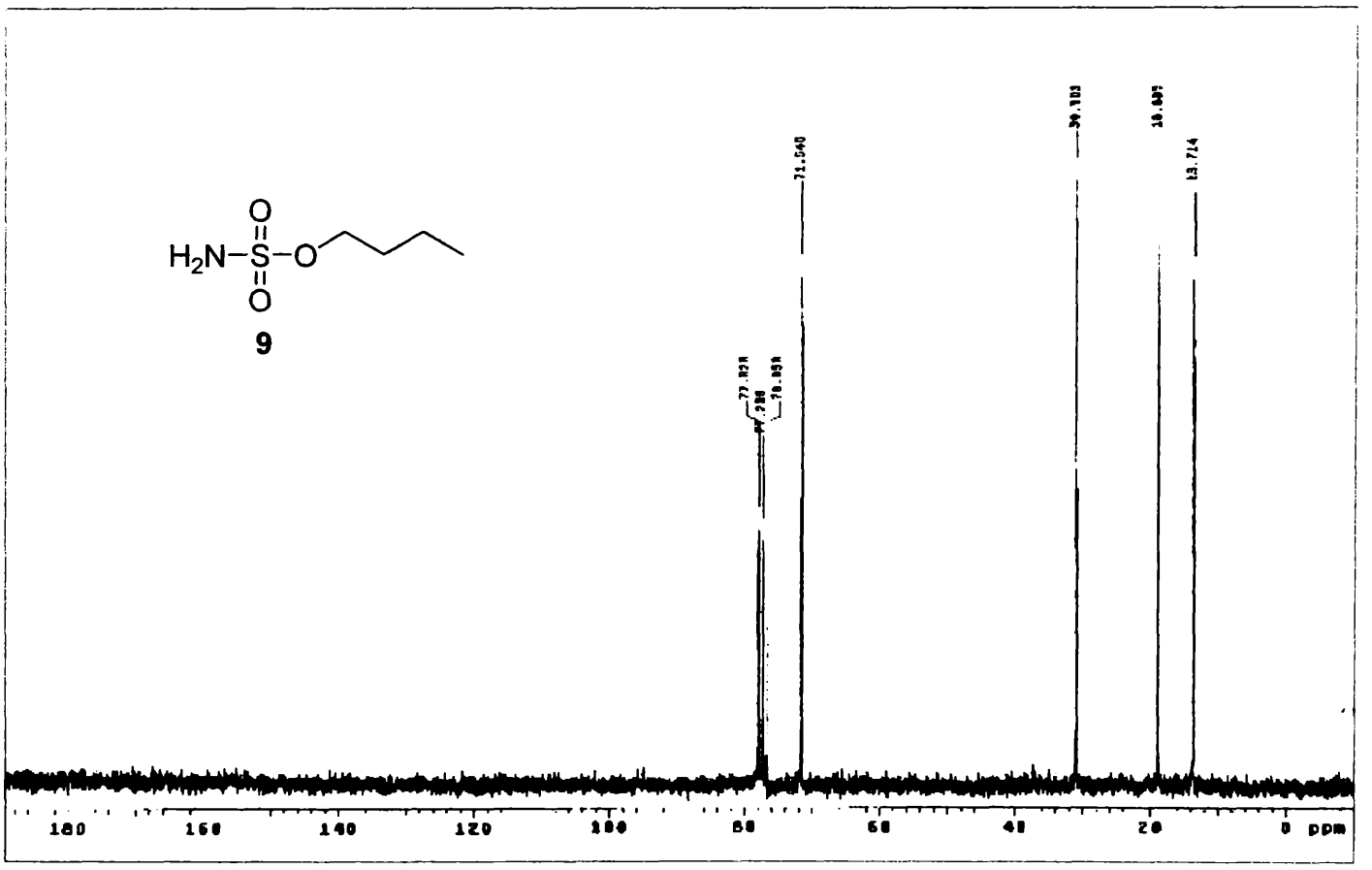
N, N-dibutilsulfamida, **7**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



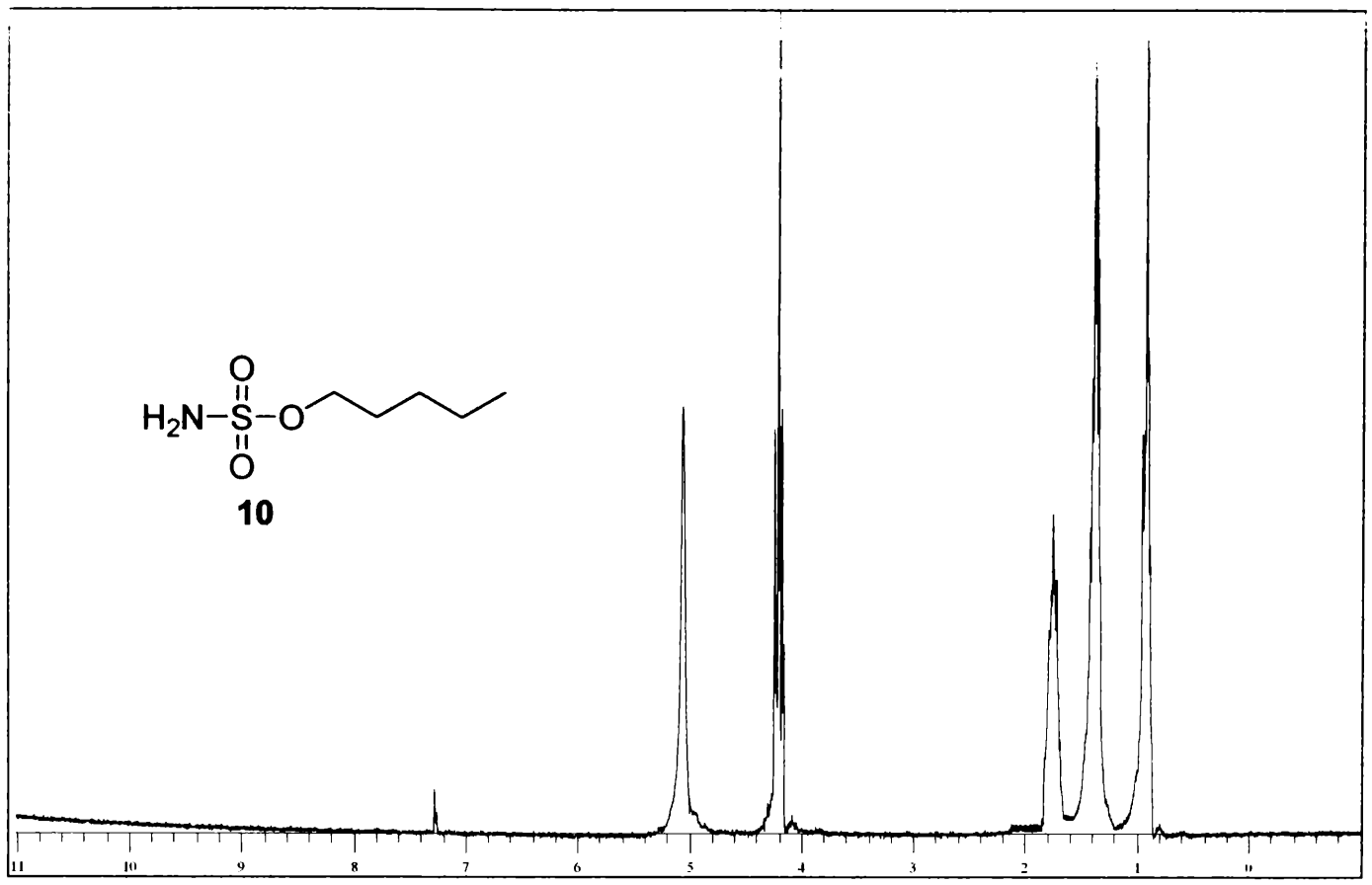


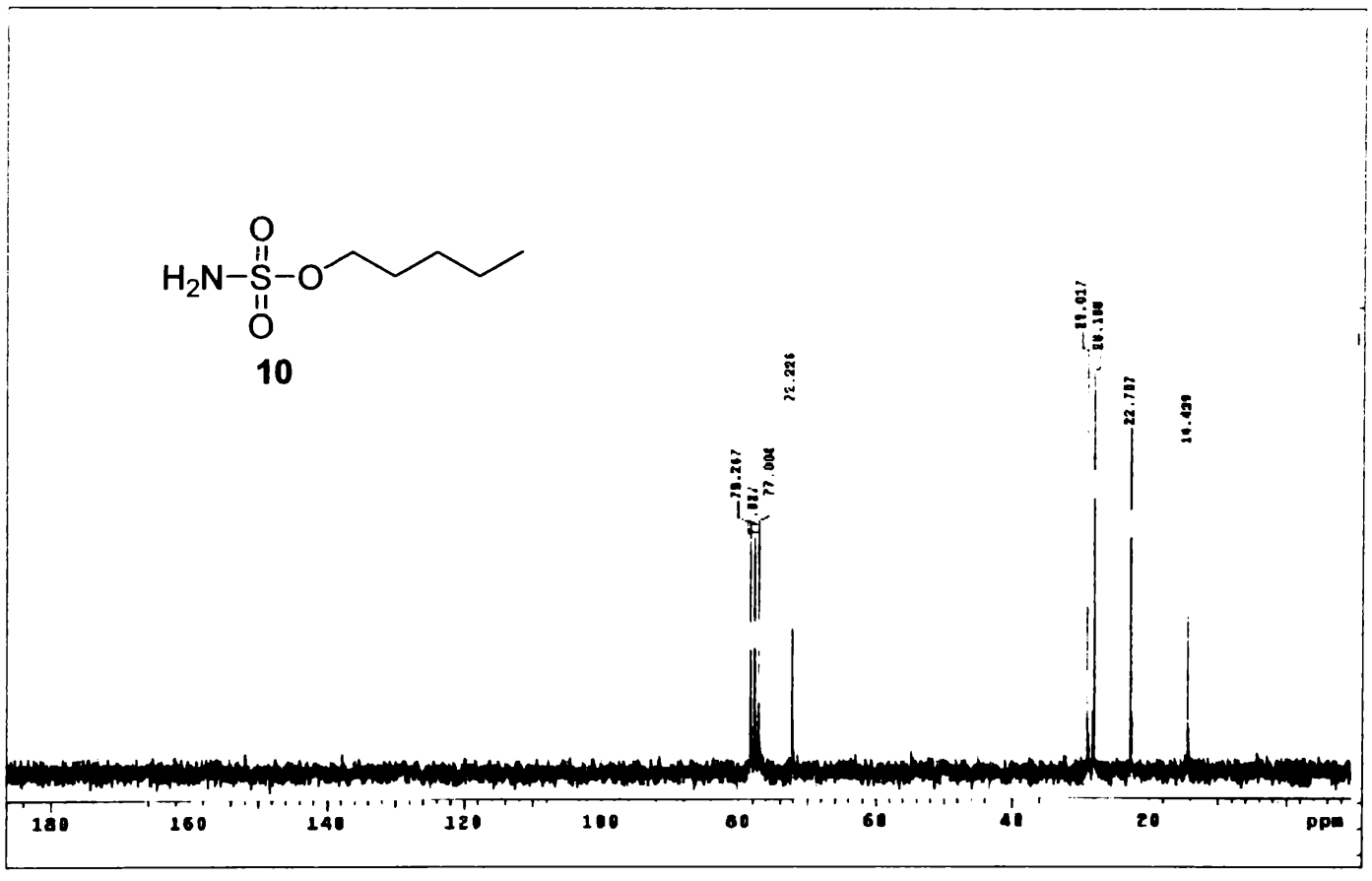
N- butilsulfamida, **8**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



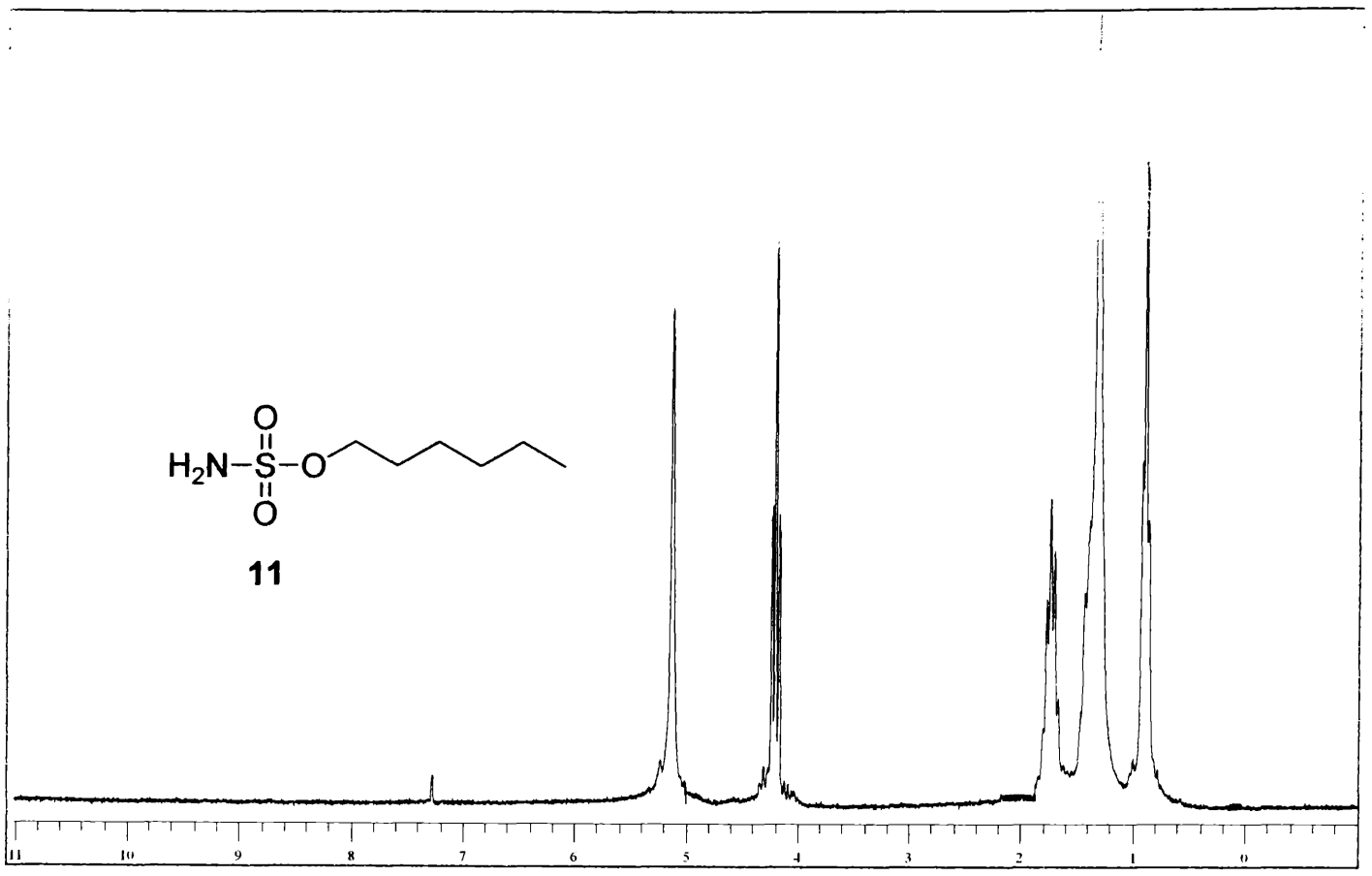


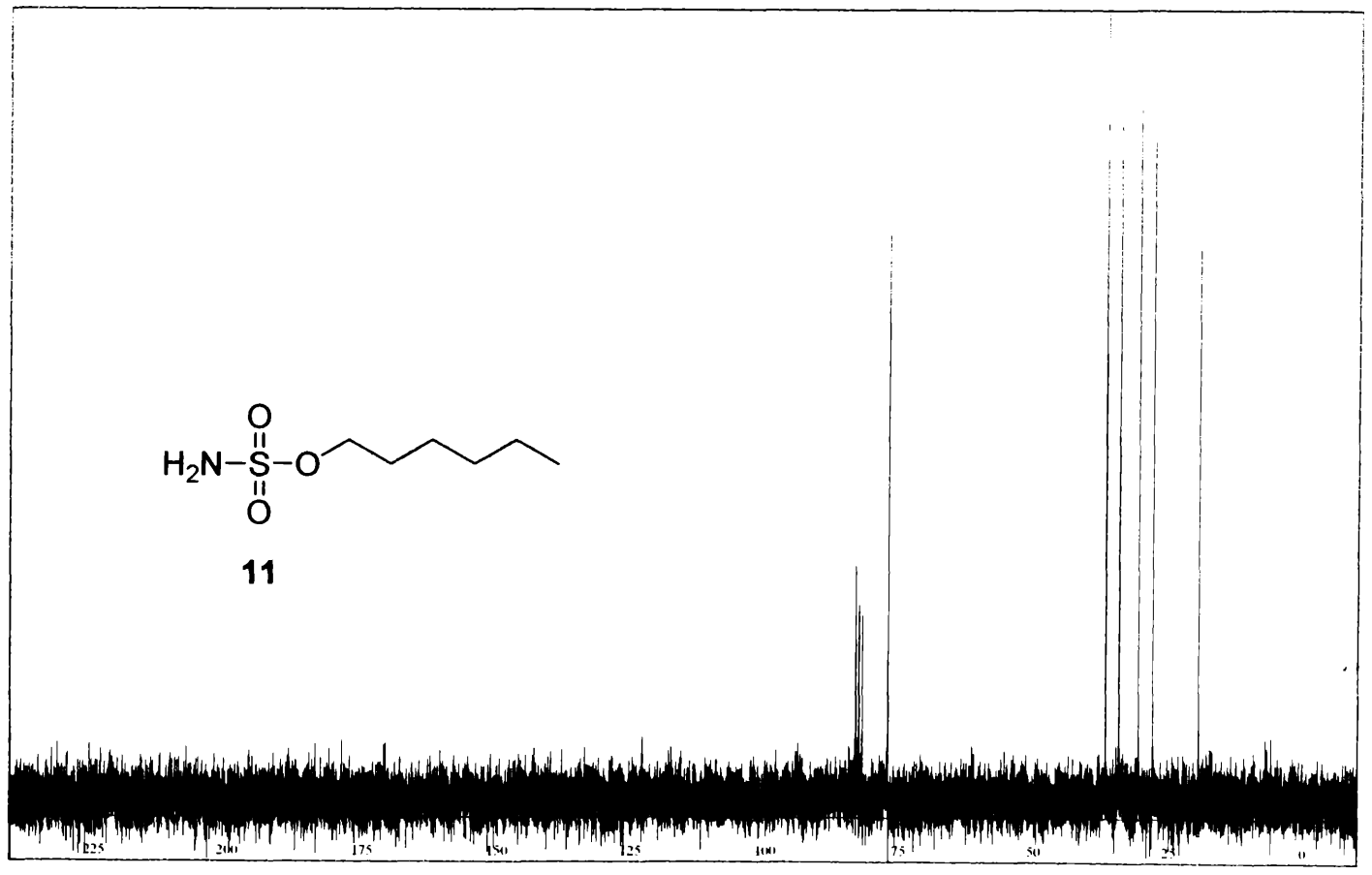
n-butilsulfamato, **9**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



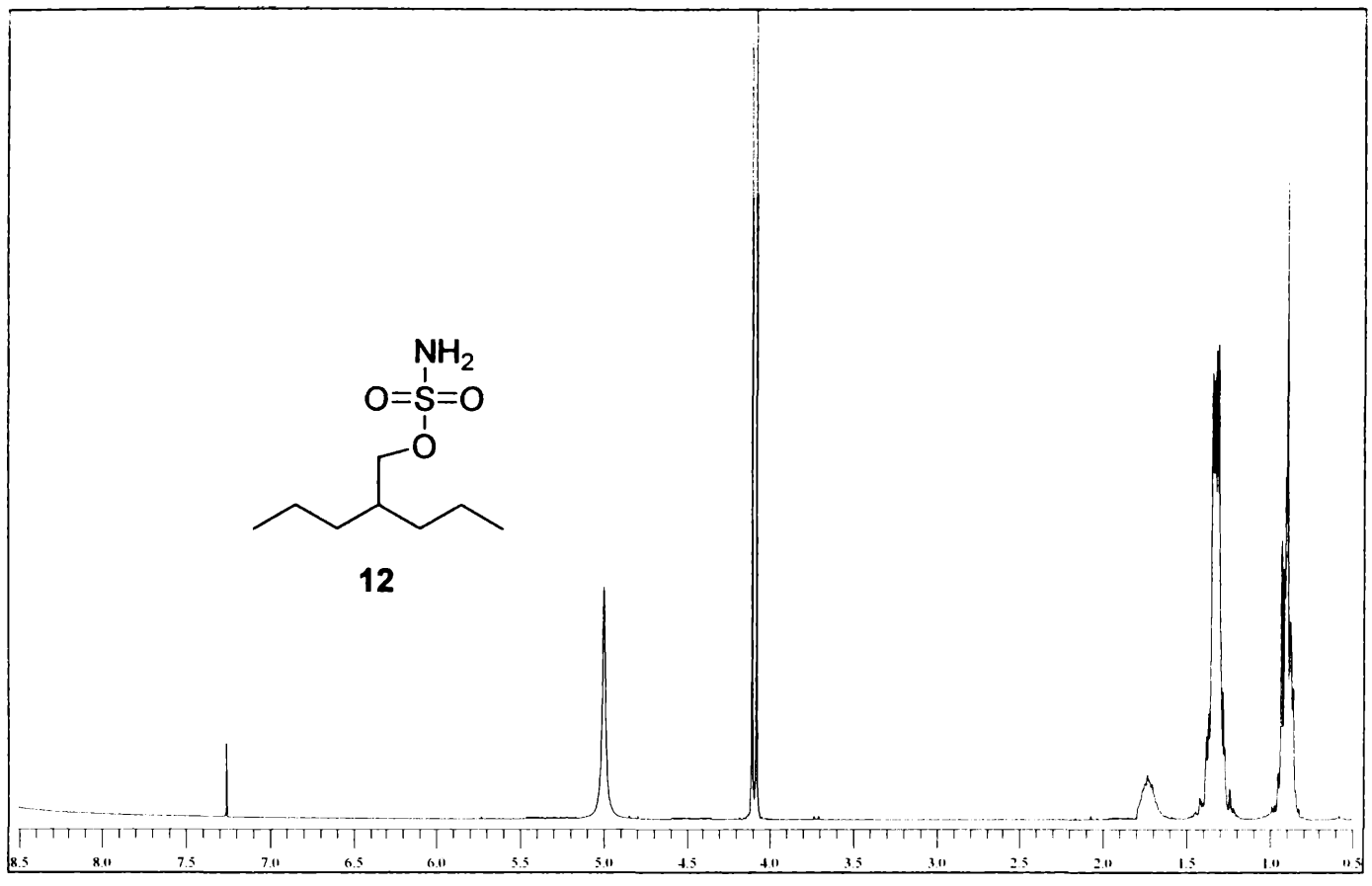


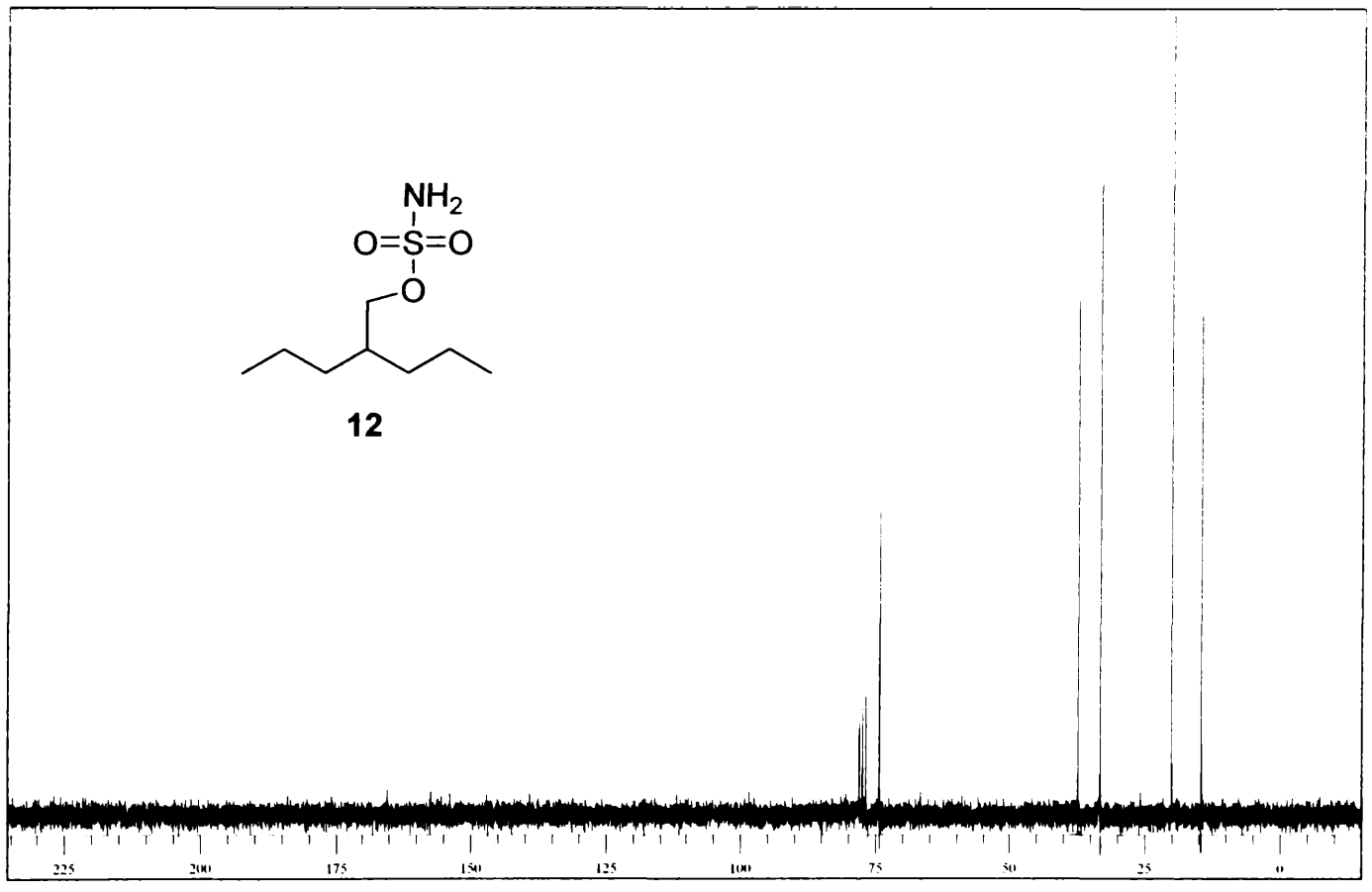
n-pentilsulfamato, **10**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



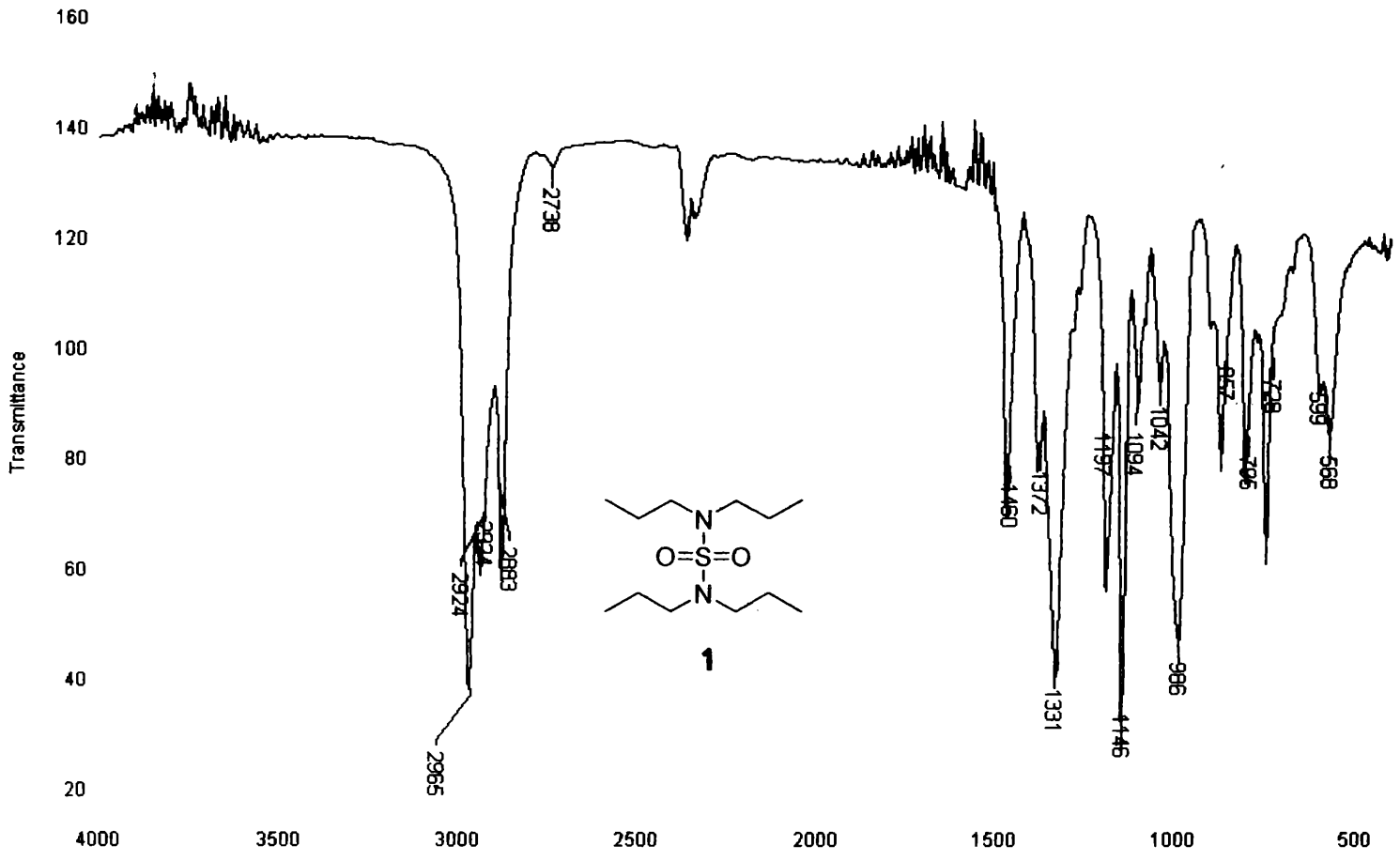


n- hexilsulfamato, **11**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



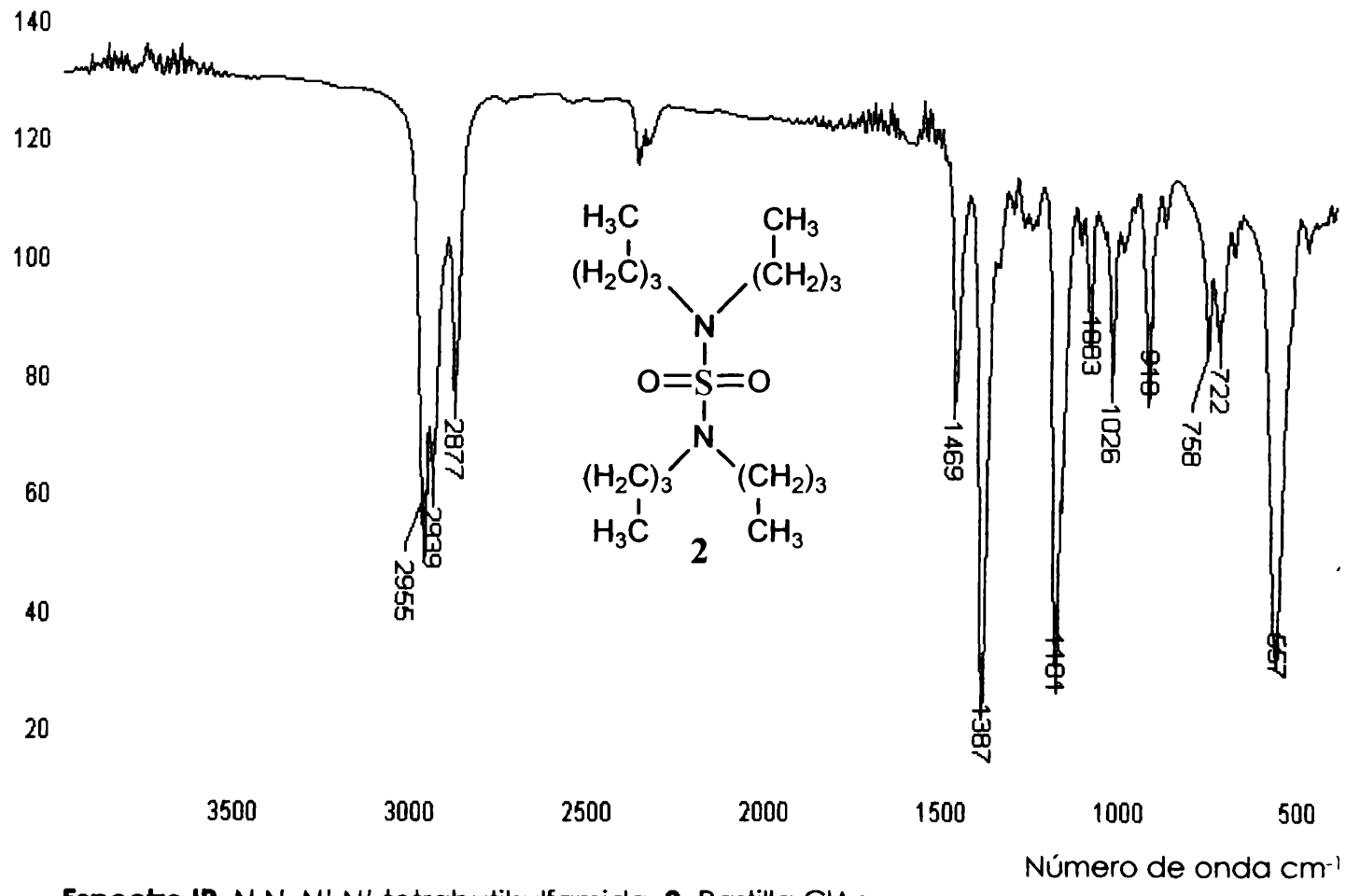


2-propilpentilsulfamato, **12**. Espectro ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN en $CDCl_3$.



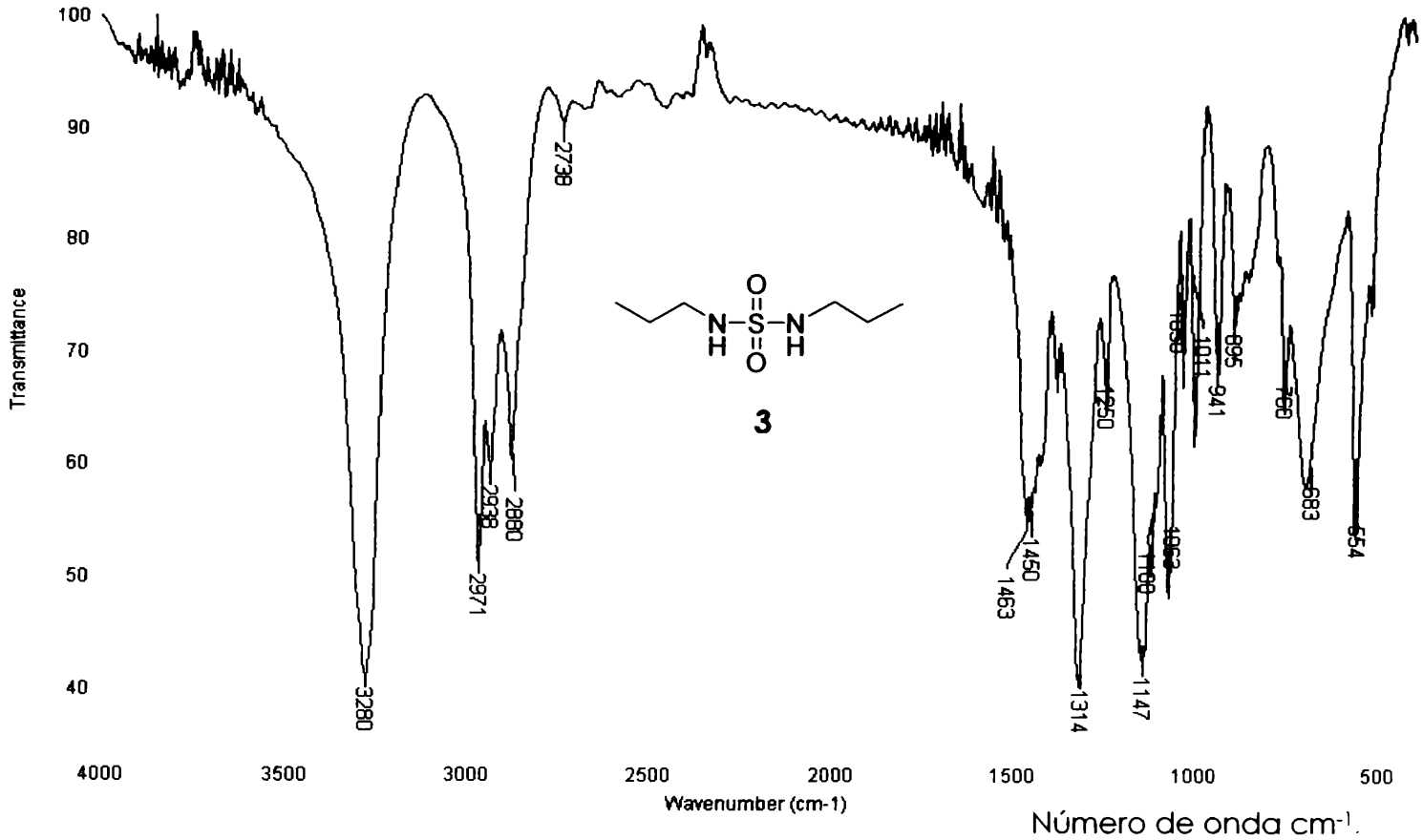
Número de onda cm $^{-1}$.

Espectro IR- *N,N,N',N'*-tetrapropilsulfamida, **1.** Pastilla ClAg.

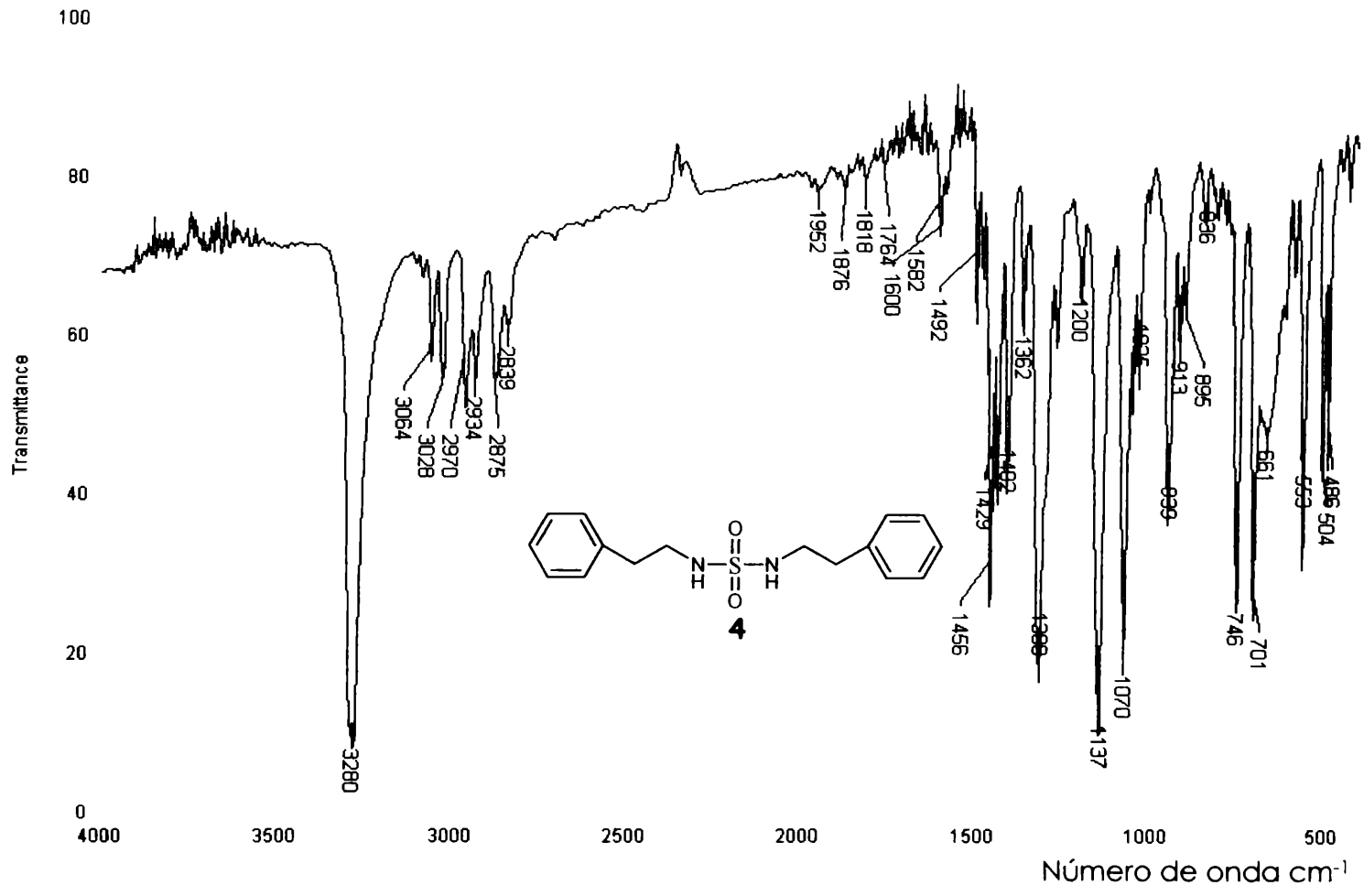


Número de onda cm^{-1}

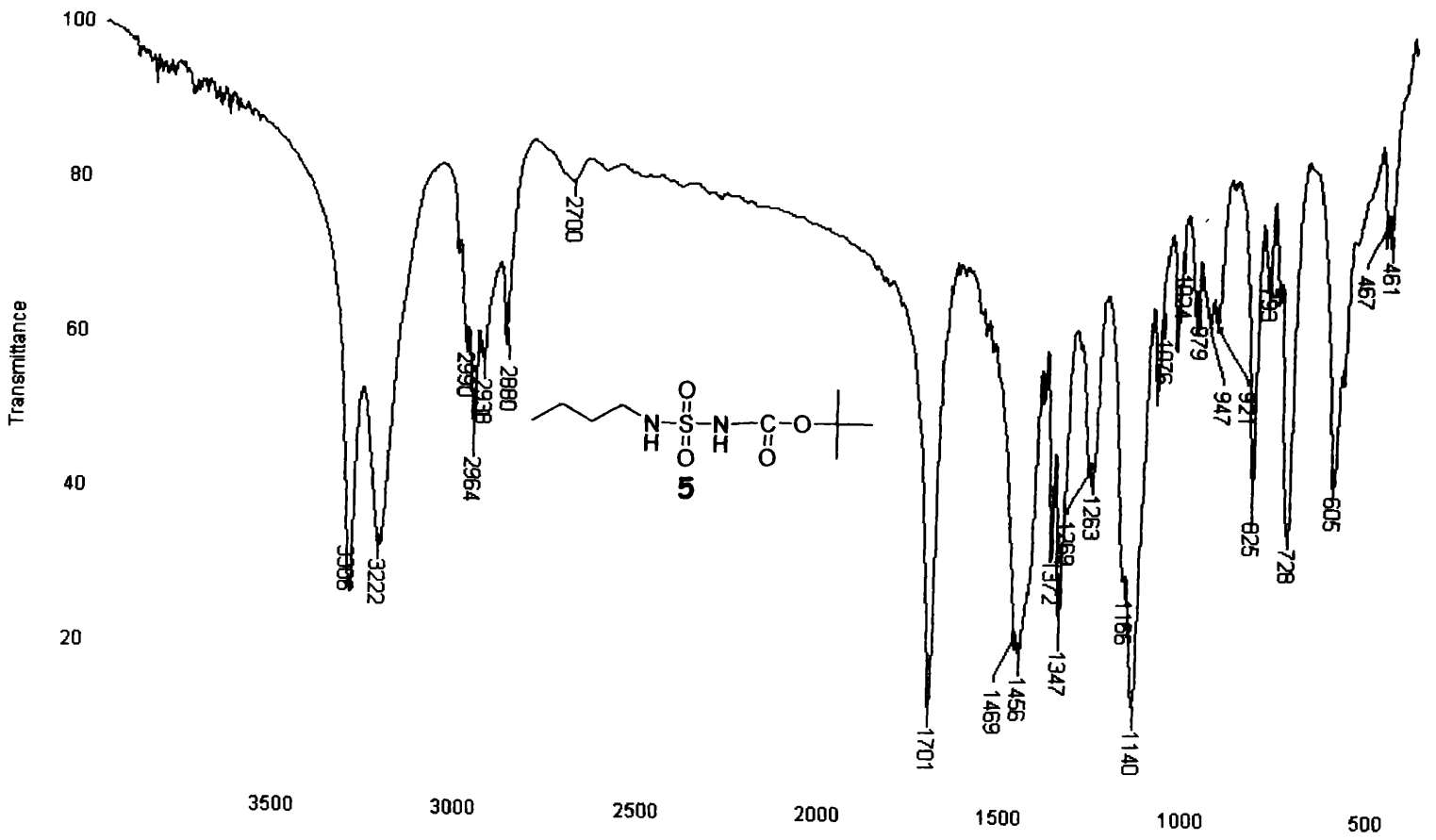
Espectro IR. *N,N, N',N'*-tetrabutilsulfamida, **2.** Pastilla ClAg.



Espectro IR . *N,N'*-dipropilsulfamida, **3.** Pastilla KBr

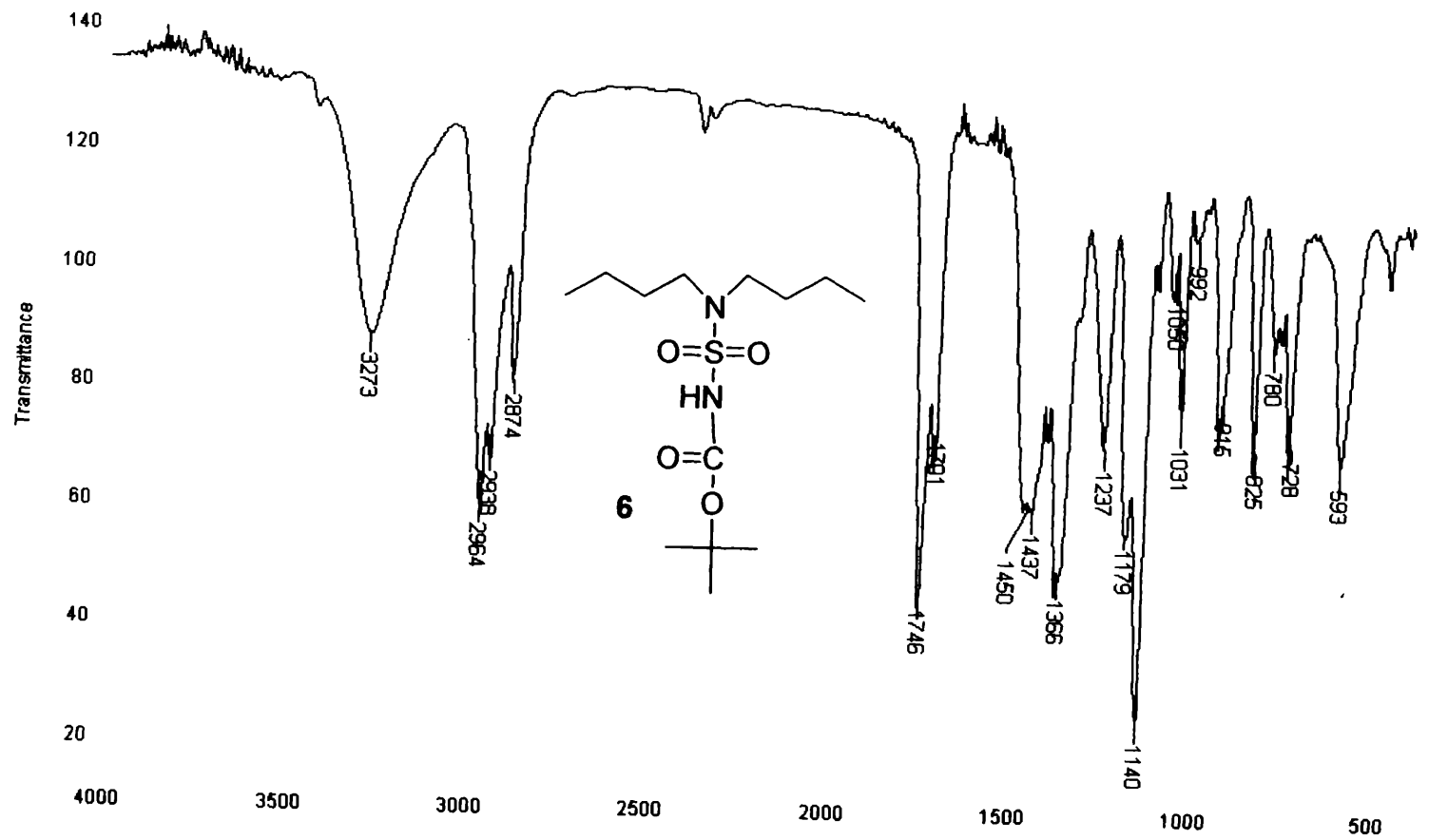


Espectro IR. *N, N'*-difeniletilsulfamida, **4.** Pastilla KBr.



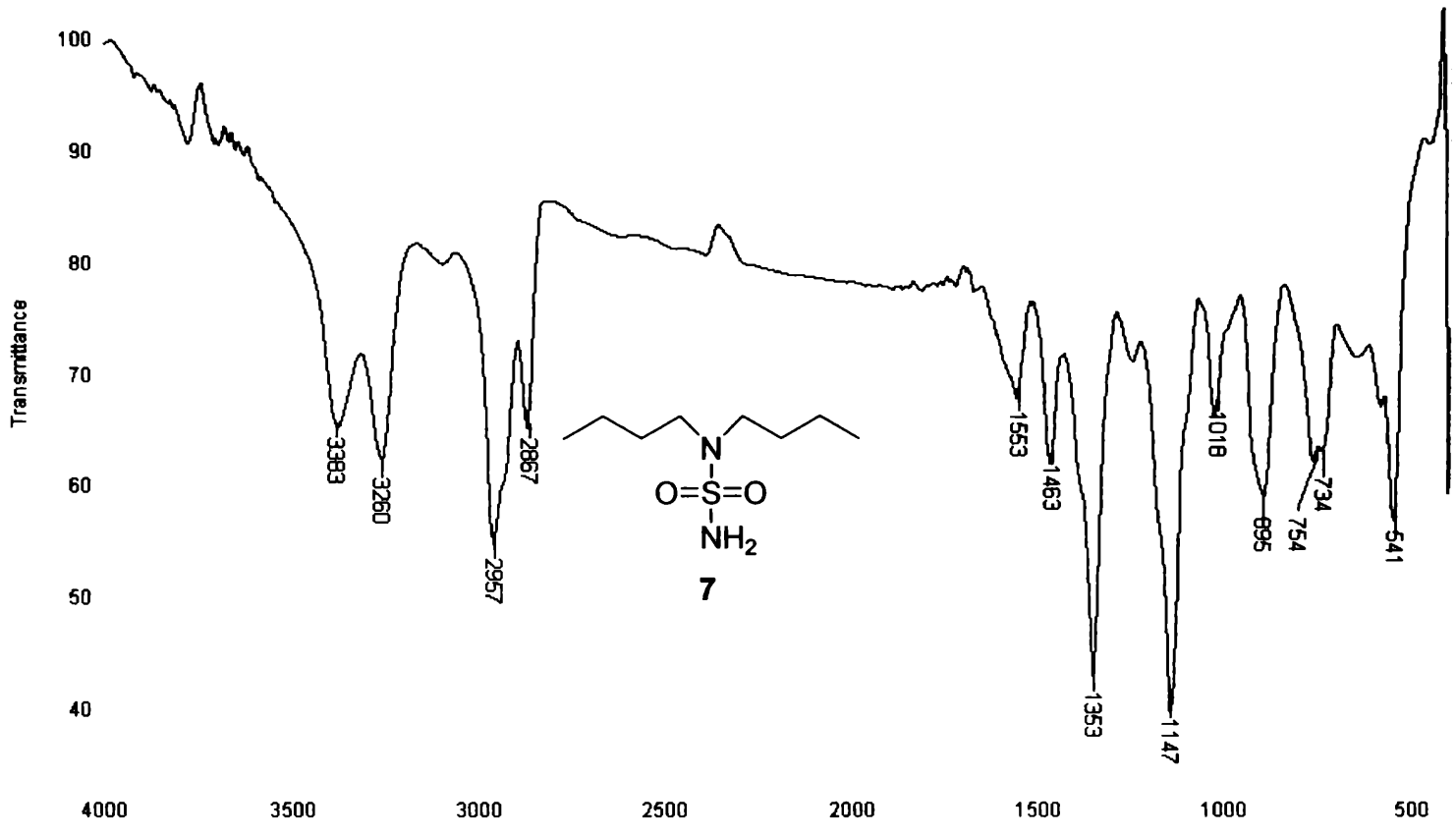
Número de onda cm^{-1}.

Espectro IR. *N* -(*tert*-butoxicarbonil)- *N'*-butilsulfamida, **5.** Pastilla KBr.



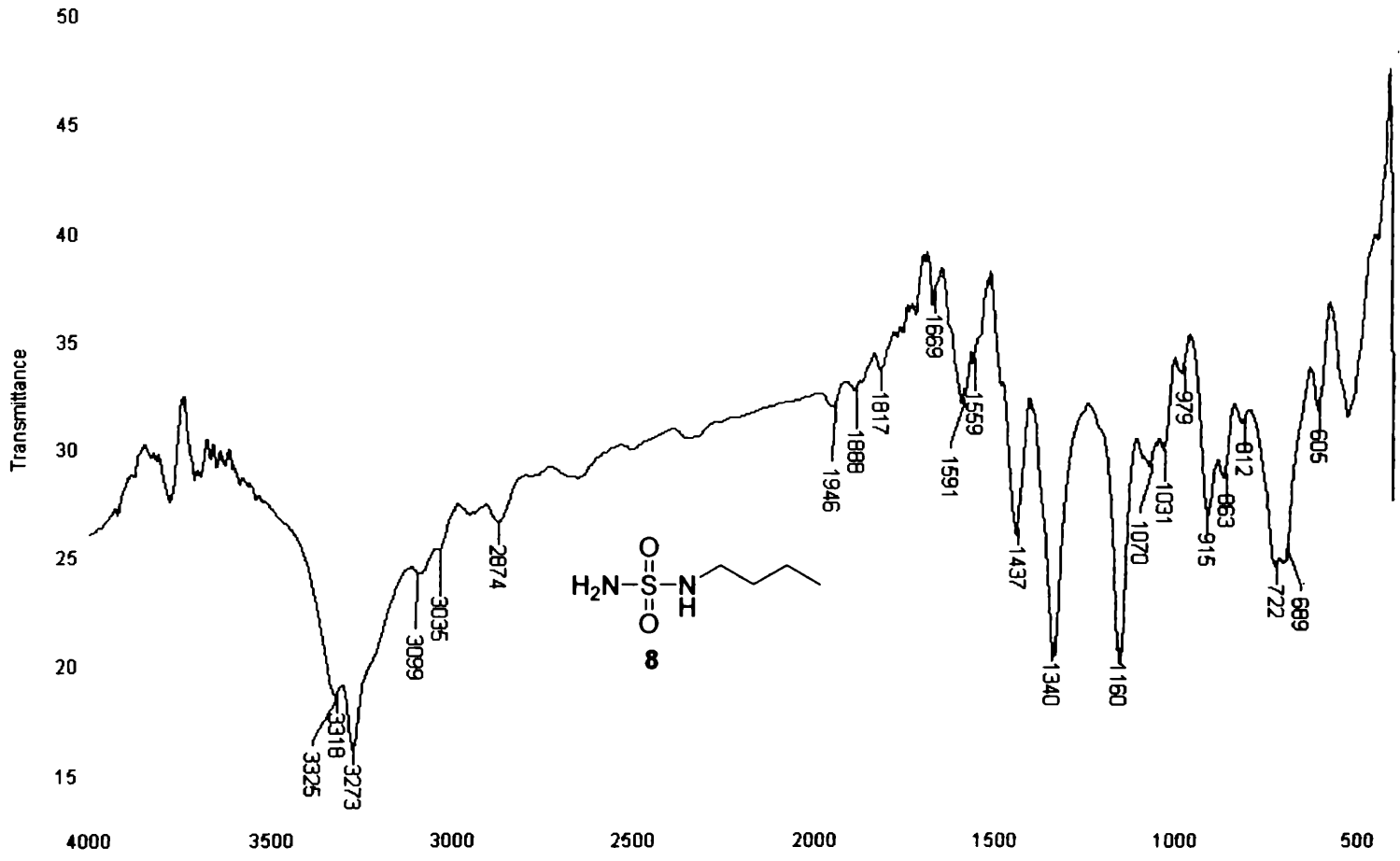
Número de onda cm^{-1}.

Espectro IR. *N* -(*tert*-butoxicarbonil)- *N'*, *N'*-dibutilsulfamida, **6.** Pastilla ClAg.



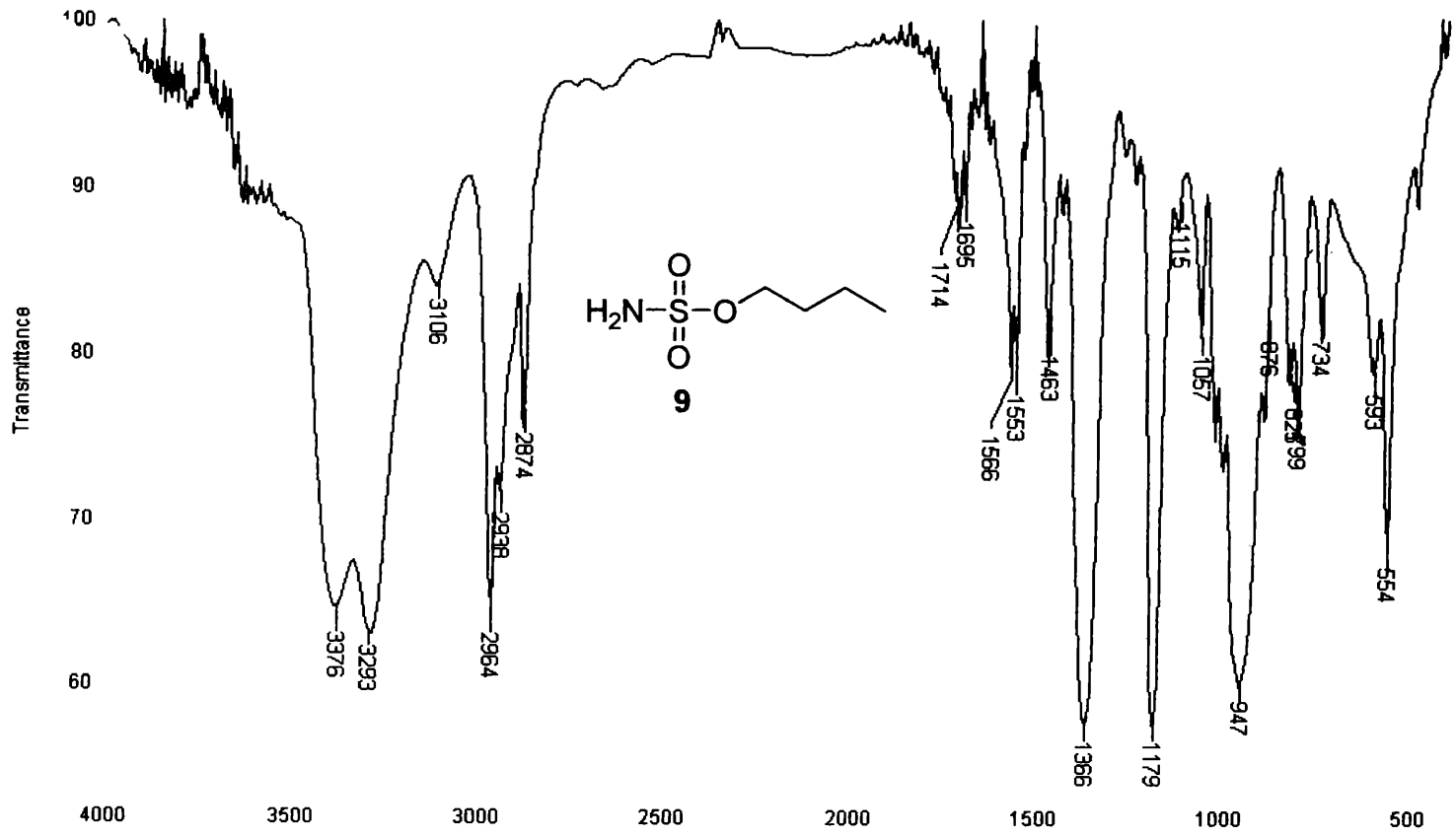
Número de onda cm^{-1}.

Espectro IR. *N, N*-dibutilsulfamida, **7.** Pastilla KBr.



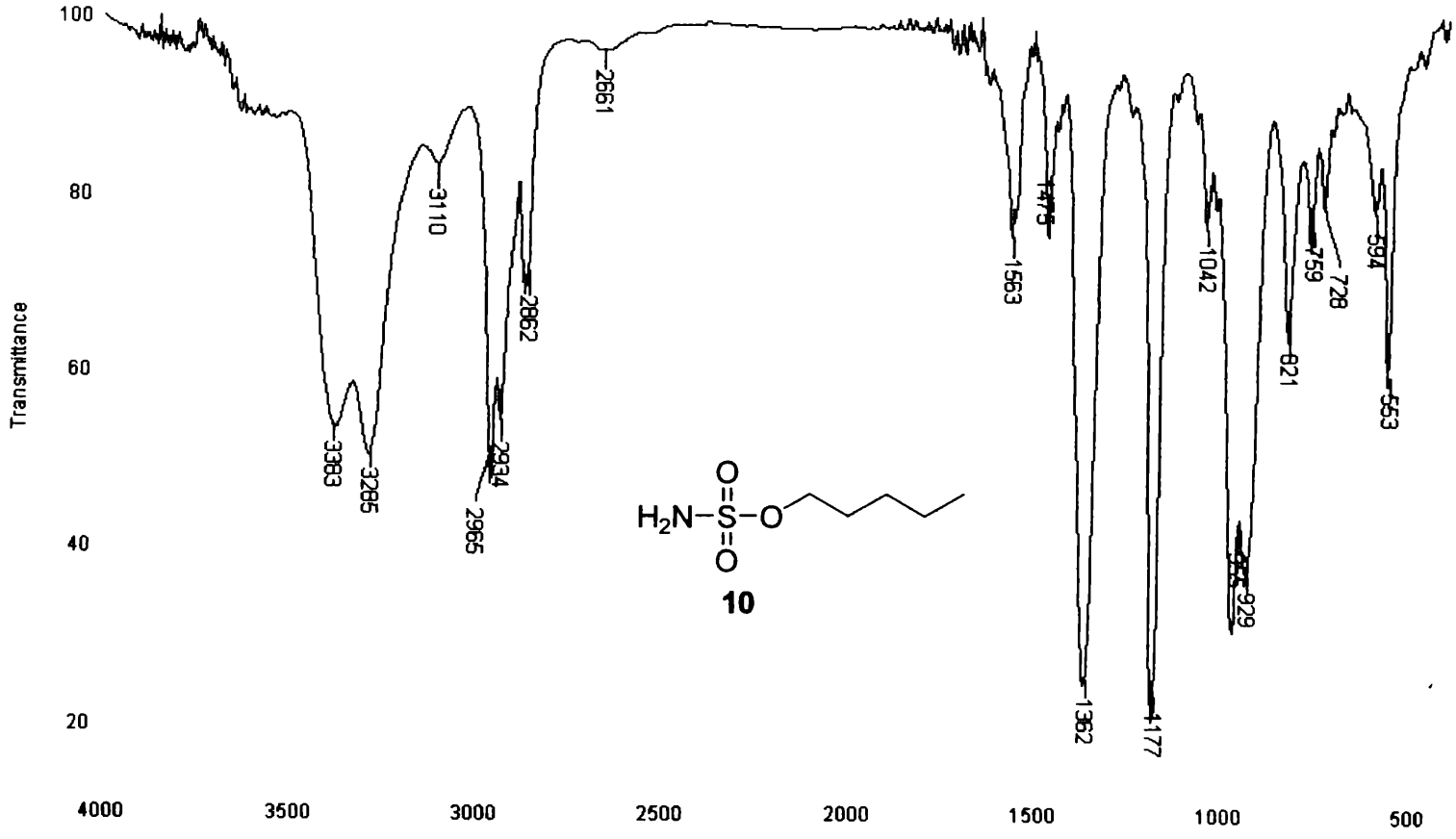
Número de onda cm^{-1}.

Espectro IR. *N* -butilsulfamida, **8.** Pastilla KBr.



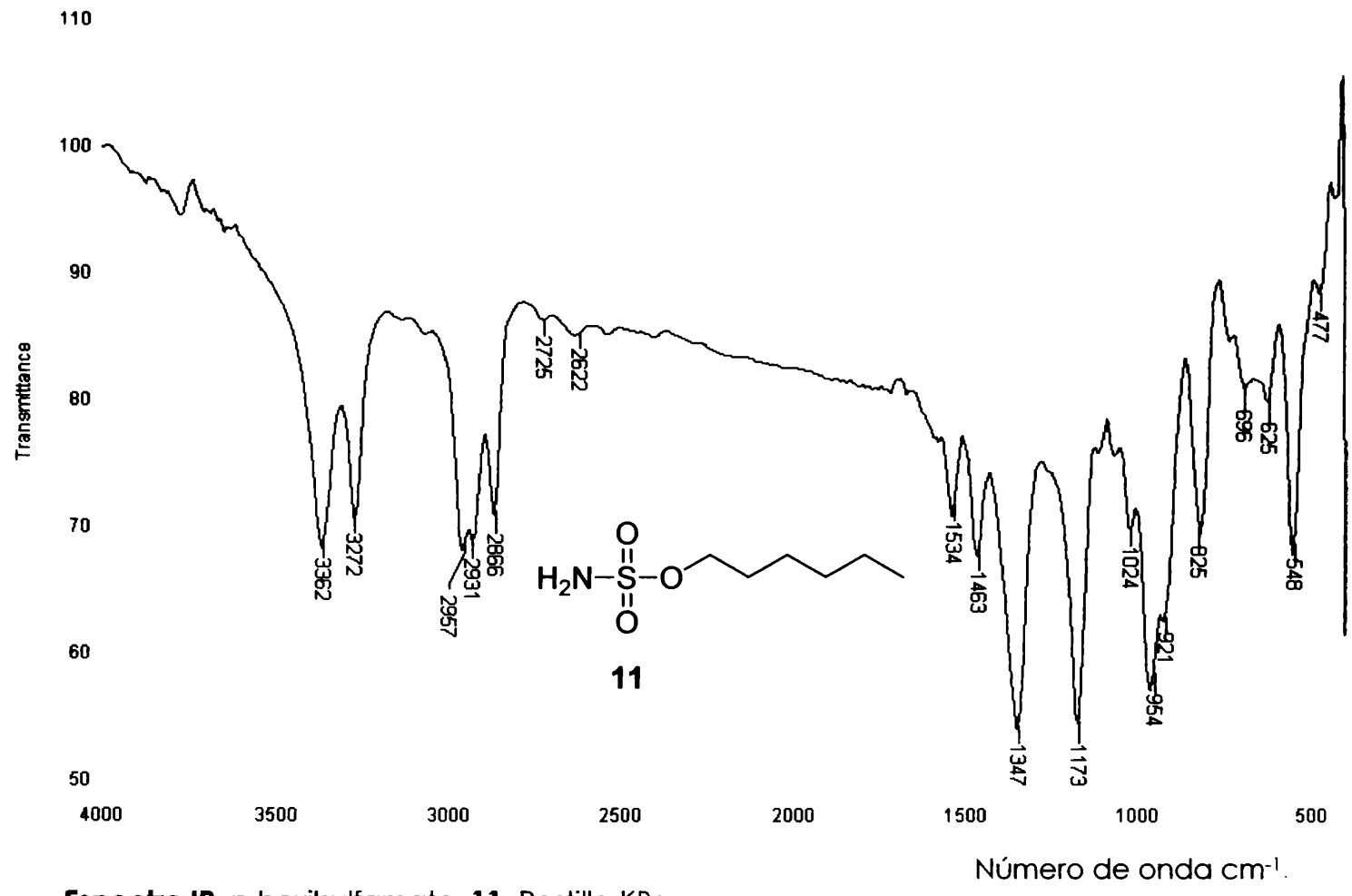
Número de onda cm^{-1}.

Espectro IR. n-butilsulfamato, **9.** Pastilla ClAg.

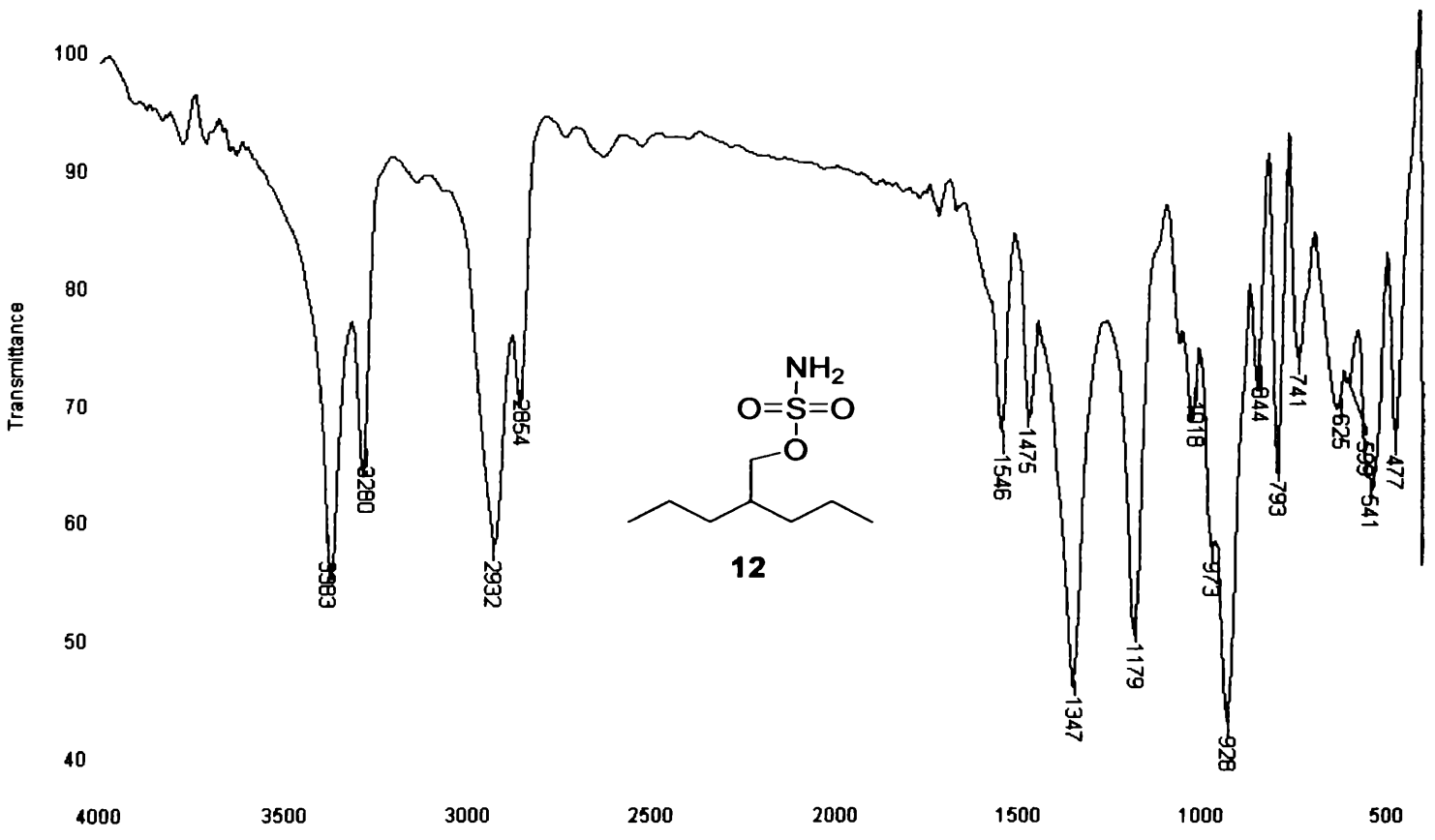


Número de onda cm^{-1}.

Espectro IR. n-pentilsulfamato, **10.** Pastilla KBr.



Espectro IR. n-hexilsulfamato, **11.** Pastilla KBr.



Espectro IR. 2-propilpentilsulfamato, **12.** Pastilla KBr.

Referencias

[1] Avendaño López, M.C.; Introducción a la Química Farmacéutica, *Capítulo 19: Síntesis de fármacos. Principios Generales*, **1993**, 549.

[2] Serratosa, F. *Heiriskó Introducción a la Síntesis Orgánica, Capítulo 2,Primera Edición*, **1975**, 6-27.

[3] Para una revisión del ácido sulfámico y sus derivados ver: Benson, G. A.; Spillane, W. J. *Chem. Rev.* **1980**, *80*, 151.

[4] Berglund. *Bull. Soc. Chim.*, **1878**, *[2] 29*, 422.

[5] Raschig. *Ann.*, **1887**, *241*, 161.

[6] Franklin: *The Nitrogen System of Compounds*, **1935**, *Reinhold Publishing Corporation*, New York , 171.

[7] Gordon and Cupery. *Ind. Eng. Chem.* , **1939**, *31*, 1237.

[8] Cupery. *Ind. Eng. Chem.*, **1938**, *30*, 627 .

[9] Audrieth, L.F.; Sveda, M.; Sisler, H.H.; Butler, M. J. *Chem. Rev.*; **1940**; 26(1); 49-94.

[10] Traube, Hoerenz, Wunderlich. *Ber.*, **1919**, *62*, 1272.

[11] Schawarz, Giese. Ber., **1934**, *67*, 1108.

[12] Baumgarten.Ber., **1929**, *62*, 820.

[13] Sisler: Thesis, University of Illinois, **1939**.

[14] Audrieth, L.F.; Sveda, M. *J. Org. Chem.*, **1944**, *9 (1)*, 89-101.

[15] Schaefer and Griessbach. German patent, **1931**, 564,123. cf. *Chem. Abstract*, **1933**, *27*,1101.

[16] Hantzsch and Stuer. Ber., **1905**, 38,1022.

[17] Kojima, I,; Watanabe, T.; Eguchi, T. Japanese Patent 10045, **1971**, *Chem. Abstr.*, *75*, 23320.

[18] Hofmeister, H.Z. German Patent 19 15 723; Chem. Abstr., **1971**, *74*, 5147.

[19] Regnault. Ann. Chim. Phys. **1838**,*[2]* 69, 170.

[20] Audrieth, L.F.; Sveda, M.; Sisler, H.H.; and Butler, M.J. *Chem. Rev.*, **1940**, *49*, 26.

[21] Ito, y.; Masuda, E. Kogyo Kagaku Zasshi, **1964**, *67*, 777. Chem. Abstr., **1964**, *61*, 6654.

[22] Sowada, R. *J. Prakt. Chem.*, **1963**, *20*, 310.

[23] Sowada, R. *J. Prakt. Chem.*, **1964**, *25* , 88 .

[24] Sowada, R. *J. Prakt. Chem.*, **1966**, *33*, 247.

[25]Lafferty, J.J.; Loev, B. US. Patent 3 147305, **1964.** *Chem. Abstr.*, **1964**, 81, 13243f .

[26] J. D. Catt and W. L. Matler, *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 566 .

[27] Rasmussen , J.K.; Hassner, A. *Chemical Reviews*, **1976**, *76(3)*, 389.

[28] Masui, T.; Kabaki, M.; Watanabe, H.; Kobayashi, T.; Masui, Y. *Organic Process Research & Development*, **2004**, *8*, 408-410.

[29] Casini, A.; Winum, J-Y:; Montero, J-L-; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2003**, *13*, 837–840.

[30] Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Aouf, N.; Favre, G.; Mor6re, A.; Montero, J-L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,**1996**, 4, (8), 1227-1235.

[31] Winum, J-L.; Toupet, L.; Barragan, V.; Dewynter, G.; Montero, J-L.*Org. Letters*, **2001**, *3(14)*, 2241-2243.

[32] Esteve, C.; Vidal, B.*Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 1019.

[33] Zabawa, T.P.; Kasi, D.; Chemler, S.R. *J. Am. Chem. Soc.*, ***2005***,*127 (32)*, 11251.

[34] Regainia, Z.; Winum, J-Y.; Smaine, F-Z:; Toupet, L.; Aoufb, N-E.; Montero, J-L. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 6051–6056.

[35] Schaal, W.; Karlsson, A.; Ahlsen, G.; Lindberg, J.; Andersson, H.O.; Danielson,H.; Classon, B.; Unge, T.; Samuelsson, B.; Hulte n, J.; Hallberg, A.; Karlen, A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 752.

[36] Williams, A.; Chakthong, S.; Gray, D.; Lawrence, R.M.; Gallagher, T. *Org. Lett.*, **2003**, *5 (6)*, 811-814.

[37] Vorreither, H. K.; Ziegler, E. Synthesen von Heterocyclen.64. Mitt.: Uber Reaktionen mit Schwefelsaurediamid (About Reactions of Sulfuric Acid Diamide). *Monatsh. Chem.* **1965**, 96, 216-219.

[38] (a) Timberlake, J. W.; Ray, W. J.; Stevens, E. D.; Klein, C. L. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5824-5826.(b) Lee, C.-H.; Korp, J. D.; Kohn, H. *J. Org. Chem.***1989**, *54*, 3077-3083.(c) Lee, C.-H.; Kohn, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6098-6104. (d) Aouf, N.; Dewynter, G.; Montero, J. L. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6545-6546.(e) Dewynter, G.; Aouf, N.; Regainia, Z.; Montero, J. L. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 993-1004.
(f) Muller, G. W.; DuBois, G. E. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4471-4473.(g) Hanewacker, G. A.; Mester, Z.; Unterhalt, B. *Arch.Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1993**, *326*, 497-505.

[39] Albericio, F.; Bryman, L.M.; Garcia, J.; Michelotti, E.L.; Nicola´s, E.; Tice, M.L.*J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 290-300.

[40] Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. *Med Res Rev*, **2003**; *23*, 146–189.

[41]Maryanoff, B.E.; Nortey, S.O; Gardocki, J.F.; Shank, R.P.; Dodgson, S.P. *J Med.Chem*, **1987**; *30*, 880–887.

[42] Maryanoff, B.E.; Costanzo, M.J; Nortey, S.O.; Greco, M.N.; Shank, R.P; Schupsky, J.J.; Ortegon, M.P.; Vaught, J.L *J. Med. Chem.* **1998**, *41(8)*, 1315-1343.

[43] Behrend, R. *Ann.*, **1884**, 222, 116.

[44] Karplus, M.; Lawlwe, R.G.; Franenkel, K. *J.Am.Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5261.

[45] Zielger, P.F.; Orchin, M.*J.Org.Chem.* **1968**, *33*, 1.

[46] Behrend, R. *Ann.*, **1884**, *222*, 116.

[47] (a) Binkely, W.W.; Degering, E.F.*J.Am.Chem.Soc.*, **1939**, *61*, 3250. (b) Appel, R.; Senkpiel, W.*Anorg.Chem.*, **1961**, *310*, 94. (c) White, E.H.; Elliger, C.A.*J.Am.Chem.Soc.*, **1965**, *87*, 5261. (d) Otto, E.; Muschaweck, R. *German Patent* 2 418 217, **1975**.

[48] White, E.H.; Elliger, C.A.*J.Am.Chem.Soc.*, **1965**, *87*, 5261.

[49] Hedayatullah, M.; Guy, A. *Phosphorus and Sulfur*, **1979**, *7*, 95.

[50] (a) Hedayatullah, M.; Guy, A. *Synthesis*, **1978**, 357. (b) *Tetrahedron Lett.* , **1975**, 2455.

[51] Hedayatullah, M., Brault, J.F. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, **1977**, *285*, 153.

[52] Lohaus, G. *Chem. Ber.*, **1972**, *105*, 2791.

[53] Sowada, R. *J. Prakt. Chem.*, **1965**, *29*, 328.

[54] Weinstein, B.; Chang, H. *Tetrahedrom Lett.*; **1974**, 901.

[55] Hedayatullah, M.; Guy, A. *Phosphorus and Sulfur*, **1979**, *7*, 95.

[56] Ref hedayatullah, a synthesis y b tetrahedron

[57] Spillane, W.J.; Taheny, A.P.; Kearns, M.M. *J.Chem.Soc., Perkin Trans 2*, **1974**, 1727.

[58] Guanti, G.; Riva, R.; Cascio, G.; Manghisi, E.; Morandotti, Grazia; Satta, G.; Sperning, R.*Il Farmaco*, **1998**, *53*, 173-180.

[59] Markind, J.E. *Am J Health-Syst Pharm*, **1998**, *Vol 55*, 554.

[60] Kloek, J.A.; Leschinsky, K.L.J.Org.Chem, **1976**, *25*, 4028.

[61] Weig, G. ; Schulze, G. Liebigs Ann. Chem. **1969**, *729*, 40-51.

[62] Behrend, R. *Justus Leibigs Ann. Chem.*, **1884**, *222*, 116..

[63] Appel, G.Berger. *Chem. Ber.*, **1958**, *91*, 1339-1341.

[64] Okada, M.; Iwashita, S.; Koizumi, N. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7047-7051.

[65] (a) Benson, G. A.; Spillane, W. J. *The Chemistry of Sulfamic Acids, Esters, and their Derivatives*; Patai, S., Rappoport, Z., Eds.; Wiley & Sons: Chichester, **1991**; 947-1036. (b) Timberlake, J. W.; Ray, W. J., Jr.; Stevens,E. D.; Klein, C. L. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5824-5826.

[66] Appel, R.; Berger, G. *Chem. Ber.*, **1958**, *91*, 1339.

[67] Park, J.D.; Kim, D.H.; Bioorganic and Medcinal Chemestry, **2004**,12,2349-2356.

[68] Para procedimientos alternativos usando $ClSO_2NH_2$, ver: Okada, M.; Iwashita, S.; Koizumi, N. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7047-7051.

[69] Kloek, J.A.; Leschinsky,K.L. *J.Org. Chem.*, **1976**, *41 (25)*, 4028.

[70] Park, J.D.; Kim, D.H.; *Bioorganic and Medcinal Chemestry*, **2004**, *12*, 2349-2356.

[71] Ciobanu, L.C.; Maltais, R.; Poirier, D. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 445-448.

[72] DuBois, G.E.; Stephenson, R.A. *J.Org.Chem.*, **1980**, *45*, 5371-5373.

[73] White, G.J.; Garst, M.E.*J. Org. Chem.* **1991**,*56*,3178-3181.

[74] Espino, C.G.; When, P.M.; Chow, J.; Bois, J.D. *J.Am. Chem.Soc.*, **2001**, *123*, 6935-6936.

[75] Meléndez, R. E.; Lubell, W.D. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 2581–2616.

[76]Gavernet, L.; Saraví Cisneros, H.; Bruno-Blanch, L. E.; Estiú, G. L. *Theor. Chem. Acc.*, **2003**, *110*, 434-440 .

[77] Bermann, M.; Van Wazer, J. R. *Synthesis*, **1972**, *10*, 576.

[78] Allen, H.R.; Maxon, R.N.*Inorg.Syntheses*, **1939**, *1*, 114.

[79] Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Aouf, N.; Favre, G.; Morere, A.; Montero, J.-L. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1227.

[80] Atkins, G. M.; Burgess, E. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, 4744.

[81] Atkins, G. M.; Burgess, E. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 6135.

[82] Burgess, E. M.; Penton, H. R.; Taylor, E. A. *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 26.

[83] Masui, Y.; Watanabe, H.; Masui T., *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 1853.

[84] Abdaoui,M.; Dewynter, G.; Aouf, N.; Favre, G.; Morere, A.; Montero, J. *Bioorg.and Med.Chem*, **1996**, *4*, 1227.

[85] Dewynter, G.; Aouf, N.; Criton M.; Montero, J.-L., *Tetrahedron*, **1993**, 49, 65.

[86] Rasmussen, J.K.; Hassner, A. *Chemical Reviews*, **1976**, *76 (3)*,389.

[87] Dewynter, G.; Aouf, N.; Criton, M.; Montero, J-L.*Tetrahedron*, **1993**, *49*, 65-76.

[88]Winum, J-Y; Vulo,D.; Casini, A.; Montero, J-L; Scozzafava; Supuran, C., *J.Med.Chem.*, **2003**, *48*, 2147-2204.

[89] Park, J.D.; Kim, D.H.; *Bioorganic and Medicinal Chemestry*, **2004**, *12*, 2349-2356.

[90] Appel, R.; Günter, B. *Chem.Ber.* **1958**, *91*, 1339.

[91] Park, J.D.; Kim, D.H.; *Bioorganic and Medcinal Chemestry*, **2004**,*12*, 2349-2356.

[92] Park, J.D.; Kim, D.H.; Bioorganic and Medcinal Chemestry, **2004**,12,2349-2356

[93] Hirai, H., Naito, H., Hara, H., Sato, K.. Pat US: 4,473,631, **1984**.

[94] Ohme, R.; Preuschhof, H.; Heyne, H-U. *Org. Syntheses*, **1972**, 52 (6), 11.

[95] Hirai, H., Naito, H., Hara, H., Sato, K. Pat US: 4,473,631, **1984**.

[96] Vandi A., Moeller T., Audrieth L F., *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 1136- 1138.

[97]Nachbur, H.; Hiestand, Armin; Rohringer, P. (Ciba Geigy A.G.)Ger Offen. 2,727,776 (Cl. D06M13/30), **1978**.

[98] Hirai, H., Naito, H., Hara, H., Sato, K. Pat US: 4,473,631, **1984**.

[99] Chai-Ho, Lee; Harold, Kohn. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 6098-6104.

[100] Winum, J.Y., Toupet, L., Barragan, V., Dewynter, G., Montero, J.L. *Org.Lett.*, **2001**, 3, 2241-2243.

[101] Hirai, H., Naito, H., Hara, H., Sato, K. Pat US: 4,473,631, **1984**.

[102] Paquin, A.M.; *Angew. Chem.* , **1948**, A60, 316-320.

[103] Park, J.D.; Kim, D.H. *Bioorg.Med. Chem.*, ***2004***, *12, 2349-2356.*



Capítulo 3

Ensayos farmacológicos

1. Introducción

1.1 Ensayos Biológicos

Uno de los criterios más importantes para el éxito de cualquier programa de desarrollo de nuevos fármacos, es la elección apropiada del modelo de evaluación farmacológica. [Anexo 1- Sección: Ensayos Biológicos]

En nuestro caso particular, los compuestos sintetizados, purificados y caracterizados son evaluados farmacológicamente frente a modelos animales *in vivo*.

Existe una gran variedad de ensayos destinados a la evaluación de los distintos tipos de antiepilépticos. [Anexo 5]

Las características del ensayo biológico deben ser capaces de detectar la acción anticonvulsiva frente a las convulsiones inducidas en animales de laboratorio, las cuales deben ser similares a las manifestaciones clínicas en humanos, así como los efectos adversos asociados a la dosis de cada evaluación.

Por razones prácticas los modelos animales más usados no son los que manifiestan epilepsia crónica sino aquellos en donde se inducen convulsiones simples por medios eléctricos o químicos. [Anexo 6]

Ensayos MES, PTZ, y Rotorod

Dentro del Programa de Evaluación de Drogas Antiepilépticas [Anexo 6] el *ensayo MES* (Maximal Electroshock Seizure, MES test) y el *ensayo Met o PTZ* (pentilentetrazol, PTZ test), son los métodos de primera elección. El primero se basa en la inducción eléctrica de la convulsión, mientras que el segundo en la inducción química por administración de pentilentetrazol. [1]

De hecho todos los antiepilépticos clínicos, a excepción de Levetiracetam, son capaces de proteger frente a por lo menos uno de estos dos ensayos. [Anexo 4]

Los efectos adversos presentes en drogas de acción central, son evaluados en este programa en la fase preclínica cuantificando su neurotoxicidad mediante el *ensayo de Rotorod*. [Anexo 6: Rotorod]

Si los compuestos evaluados frente a estos ensayos resultan ser Clase I pasan a la Fase II del Programa de Evaluación de Drogas Antiepilépticas, en donde se cuantifica su actividad anticonvulsivante.

Ensayo biológico *vs* tipo de epilepsia en humanos.

Los ensayos preclínicos de los compuestos sintetizados, MES y PTZ, se usan como indicadores de potencial actividad frente a distintas crisis convulsivas en humanos. Tabla 1. [Ver Anexo 5, Tabla 1, pag. 235]

- La protección frente al ensayo MES está asociada a un modelo de convulsiones generalizadas tónico-clónicas primarias y secundarias

- La protección frente al ensayo PTZ es indicativa de eficacia frente a crisis de ausencias generalizadas y/o convulsiones mioclónicas en humanos.

Mecanismo de acción asociado

Se acepta que las drogas que poseen acción frente al ensayo MES y resultan ser inactivas frente al ensayo PTZ, poseen un perfil farmacológico semejante a Fenitoína (PHEN) y se les asocia el mecanismo de acción por bloqueo de canales de sodio voltaje dependiente. [2, 3]

2. Descripción de la Metodología de Evaluación Anticonvulsiva y Neurotóxica.

Programa de Evaluación de Drogas Antiepilépticas. ADD

El Programa de Desarrollo de Drogas Antiepilépticas (ADD♣) creado por el NIH♠, incluye las fases de evaluación preclínicas dentro del ASP♦. En 1994, se revisaron los procedimientos de evaluación de nuevos fármacos antiepilépticos del ADD[4] dentro del ASP. Este protocolo revisado es el utilizado a nivel mundial como modelo de los lineamientos a seguir durante la evaluación anticonvulsiva de una nueva droga. [5, 6] Consta de siete fases [5]. [Ver Anexo 6, Tabla 1, pag. 241]

En el presente trabajo se desarrollan las fases I y II del programa ADD que involucran la *identificación* anticonvulsiva (*perfil farmacológico*) y la *cuantificación* de la actividad antiepiléptica a través de la Dosis Efectiva 50

♣ ADD; Antiepileptic Drug Development Program: Programa de Evaluación de Drogas Antiepilépticas.

♠ Epilepsy Branch del National Instiute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS): Sección Epilepsia del Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos y Comunicativos y Accidentes Cerebrovasculares dependiente del Instituto Nacional de Salud (NHI) de Estados Unidos.

♦ Anticonvulsant Screening Project: Proyecto de Screening Anticonvulsivo.

$(ED_{50})^{\bullet}$. Este último valor permite una comparación válida entre diferentes potencias anticonvulsivas de distintas drogas antiepilépticas.

Fase I

La evaluación de las drogas preparadas frente a los ensayos MES y PTZ y la actividad neurotóxica frente al ensayo de Rotorod permitió obtener el *perfil farmacológico*.

Perfil Farmacológico

Siguiendo los lineamientos del ADD[7], los ensayos se realizan a tres niveles de dosis, determinados a dos tiempos distintos.

- Niveles de dosis: 30, 100, 300 mg/kg.
- Tiempos evaluados: 30 y 240 minutos.
- Número de animales ensayados: En este punto se realizó una modificación con respecto al programa. El uso de un animal para el testeo de las dosis a 30 y 300 mg/kg se consideró insuficiente, principalmente teniendo en cuenta que en este punto se determina si se sigue evaluando según el programa o se descarta el compuesto.
  Para el ensayo MES se utilizaron tres ratones por dosis ensayada.
  En el ensayo PTZ, por tratarse este de un test concluyente y muy cruento se utilizaron dos ratones por dosis ensayada.

La clasificación de las estructuras ensayadas en cuatro categorías[8] permitió decidir cuáles serán capaces de continuar dentro del programa, y cuáles se descartan.

- Categoría 1: Actividad anticonvulsivante a 100 mg/kg o menos.
- Categoría 2: Actividad anticonvulsivante a más de 100 mg/kg.
- Categoría 3: Compuestos no activos a dosis mayores a 300 mg/kg.
- Categoría 4: Compuestos inactivos a 300 mg/kg o tóxicos a 30 mg/kg.

Aquellas estructuras que presentan actividad a 30 mg/kg pero también efectos neurotóxicos (Categoría 4) se evalúan a dosis menores.

$^{\bullet}$ ED_{50}: Dósis a la cuál la droga protege al 50% de los animales ensayados.

Fase II

Los compuestos Categoría 1 pasan a la Fase II del Programa de evaluación de drogas antiepilépticas.
En esta Fase se cuantifica la actividad anticonvulsiva frente al ensayo MES. Para describir la potencia de los nuevos compuestos anticonvulsivos el parámetro que se usa es la Dosis Efectiva 50 (ED_{50}).

Tiempo de Efecto Máximo

Inicialmente se determina el Tiempo de Efecto Máximo (TEM), el cuál surge de la evaluación de la droga a distintos tiempos (30, 60, 120, 240 minutos) empleando 5-6 animales por tiempo. Los porcentajes de protección se grafican en función del tiempo y se determina el TEM por inspección visual de la curva (Figura 1).

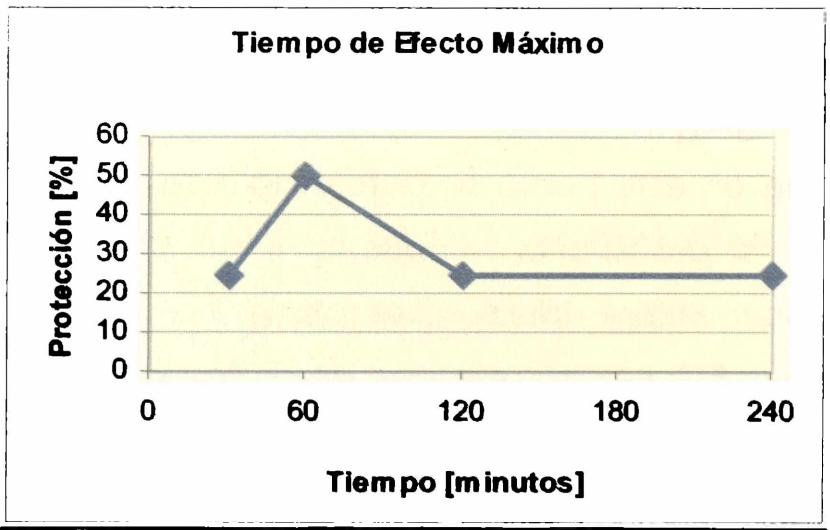


Figura 1. Curva de tiempo de efecto máximo. En este ejemplo TEM es 60 min.

Dosis Efectiva 50 (ED_{50}).

Una vez que se ha determinado el tiempo de efecto Máximo, se procede a efectuar la ED_{50} (empleando el ensayo MES). Grupos de 6 animales son evaluados al TEM. La evaluación se realiza hasta tener al menos 4 dosis distintas comprendidas entre aquellas que no inducen protección (0 %) y la que provoca protección total (100%). Los porcentajes de protección convertidos a probit[9] se grafican en función del logaritmo de la dosis. (Figura). Mediante el tratamiento estadístico de los datos (Anexo 6) se elige la recta más adecuada, y se extrapola a probit 5 el valor de la ED_{50}.

Animales empleados en el Ensayo

Los animales utilizados en los ensayos son ratones albinos adultos de 18-23 g de peso[10, 11, 12,13] al momento de la evaluación (Figura 2). Los ratones provienen del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Los animales recién recibidos se dejan estabilizar en el Bioterio del Area Diseño de Fármacos de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP; se mantienen en jaulas colectivas de 12 animales, en una habitación exclusiva para los ratones. Se separan por sexo, y etapas de crecimiento (hembras preñadas, crías en etapa de amamantamiento, jóvenes y adultos), animales en reproducción. Se alimentan con alimento balanceado y agua *ad libitum*. Se rigen bajo un ciclo día/noche de 12 horas (7 a.m – 7 p.m: día; 7 p.m- 7 a.m: noche).



Figura 2. Ratones albinos. En casilleros individuales para la realización de los ensayos biológicos.

Los ensayos se realizan en una habitación exclusiva para Ensayos Biológicos. Durante el ensayo los animales se colocan en jaulas individuales (Figura 2) privados de alimento y agua. Finalizados los ensayos los ratones se vuelven a las jaulas colectivas y cada lote de ratones perteneciente a un ensayo se mantiene en observación durante 72 horas para detectar posibles efectos tóxicos a largo plazo que pueden ocasionarles la muerte.

Los animales no se vuelven a utilizar en otro ensayo y su manejo se hace de acuerdo a Normas Internacionales de animales de Laboratorio.

3. Preparación y administración de las drogas a ensayar

Los compuestos a ser evaluados deben ser lo suficientemente lipofílicos como para atravesar la Barrera Hematoencefálica (BHE). A su vez se deben poder solubilizar en agua, o formar una suspensión o emulsión homogénea para la correcta administración. En el Programa de evaluación de Drogas Antiepilépticas

se admite el empleo de solución fisiológica, metilcelulosa y polietilenglicol 400 (PEG 400)[14] para la preparación de las suspensiones o emulsiones.

- ❖ Si la droga no es soluble en agua, se utiliza PEG 400 para solubilizarla. Los solventes utilizados en investigaciones farmacológicas y toxicológicas no deben superar en concentración un cuarto del valor de la dosis letal 50 (LD_{50}) del mismo. En el caso de PEG 400 la LD_{50} es de 12.9 mg/kg en ratones inyectados vía intraperitoneal[15]. Este se emplea en concentraciones no mayores a 3 mg/kg, solo o en proporciones que llegan a 30% PEG 400 y 70% de agua.

- ❖ Cuando la droga es sólida, se morterea y solubiliza en PEG 400. Se somete 20 minutos a ultrasonido para favorecer la disolución y si no se logra obtener una solución límpida se calienta a 37°C. Luego se agrega el agua en pequeñas proporciones. La solución final debe ser límpida, las suspensiones homogéneas o las emulsiones finas sean estas en PEG 400 o en PEG/agua.

- ❖ Volúmenes de administración: estos varían entre 0.08 mL hasta 0.31 mL, dependiendo del peso de cada animal y de los volúmenes de PEG 400/ agua utilizados.

Vías de administración

- ✓ Vía intraperitoneal (*i.p*): La inyección se realiza en el abdomen del animal, formando un ángulo de 30° con el plano del cuerpo. (Figura 3). Las agujas que se utilizan para el caso de soluciones son 27G ½ y para cuando se trata de suspensiones o emulsiones 25G 5/8. Al retirar la aguja se presiona suavemente con un trozo de algodón para verificar posibles pérdidas de volumen.

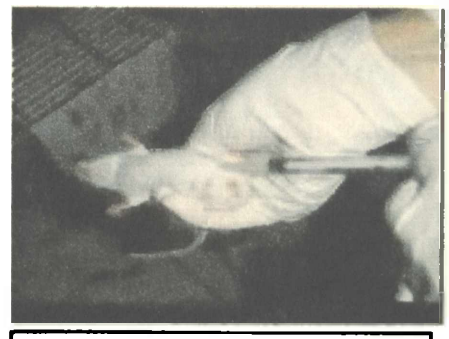


Figura 3. Vía de administración *i.p.*

- ✓ Vía subcutánea (s.c): La inyección se efectúa en un pliegue suelto de la piel de la línea media de la nuca del ratón (Figura 4). Se utiliza aguja 27G ½ y se controla que no haya pérdida de la solución de la droga.



Figura 4. Vía de administración s.c.

En este trabajo la vía de administración *s.c* se utiliza para la aplicación del agente convulsivo (PTZ). La inyección *i.p* se utiliza para la administración de las drogas a evaluar.

4. Ensayos MES y PTZ

- ***Ensayo MES***

Este ensayo consiste en la aplicación de una *descarga eléctrica controlada* a animales de experimentación (en este caso ratones[⊗]) con el objeto de provocarles un episodio convulsivo.

Se mide la capacidad que tiene una droga, administrada previamente de *prevenir la convulsión*.

Este modelo identifica compuestos que previenen la *propagación de la descarga convulsiva.*

Equipo Utilizado:

El equipo utilizado para la generación del estimulo eléctrico responde en líneas generales al diseño original propuesto por Woodburry y Davenport[16]

En el Laboratorio de Química Medicinal se cuenta con un generador de pulsos de corriente constante, diseñado y construido en la Facultad de Ingeniería de la UNLP. Este equipo fue diseñado para cubrir específicamente las necesidades de este tipo de ensayo y se desarrollo a semejanza de la unidad ECT[♣] (Ugo Basile-Biological Research Apparatus, Varese, Italia), uno de los modelos de aparatos de electroshock más nuevos usados actualmente en las pruebas de convulsión. En este aparato se puede fijar:

- ✓ Corriente a aplicar: entre 10 y 100 mA, ya que la corriente necesaria para provocar una convulsión varía según la especie animal.
- ✓ Ancho de pulso de corriente (AP): entre 0.1 y 9.9 milisegundos.

[⊗] Ver sección animales utilizados en el ensayo de este Capítulo

[♣] ECT: Electro Convulsive Treatment, Unidad de tratamiento electroconvulsivo.

- ✓ Duración total de la descarga: entre 0.1 y 9.9 segundos.
- ✓ Frecuencia (*f*) del estímulo (cantidad de pulsos por segundo): entre 1 y 250 Hz.

Para ensayos en ratones se emplean los parámetros típicos de estimulación para lograr una convulsión máxima [17] :

- ✓ corriente de 50 mA,
- ✓ frecuencia de 60 Hz,
- ✓ ancho de pulso de 2.8 milisegundos,
- ✓ aplicación del estímulo durante 0.2 segundos.

Con los parámetros en estos valores se logra obtener un tren de onda rectangular logrando una respuesta convulsiva máxima, ya que el estímulo aplicado responde a 4-5 veces el necesario para llegar al umbral de convulsión.

Hay que destacar en este punto la diferencia entre *convulsión mínima o umbral convulsivo* y *convulsión máxima*.

- ➢ Umbral convulsivo: se caracteriza por una reacción de movimientos clónicos de la cara y miembros anteriores.
- ➢ Convulsión Máxima: Comprenden un período corto de flexión tónica seguido de un período más largo de extensión tónica de los miembros posteriores y finalmente se observa un episodio clónico[17] (Figura 5).



A: Flexión tónica B: Extensión tónica C: Fase clónica

Figura 5. Fases de la convulsión Máxima provocada en el ensayo MES.

Criterio de protección:

La *supresión de la fase de extensión tónica* de los miembros posteriores (Figura 5, B) en las convulsiones por electroshock máximo es lo que determina si el animal se encuentra protegido o no.

Como resultado de cada ensayo se obtiene el *porcentaje de protección* de la droga que se expresa:

$$\% \text{ de Protección} = \frac{\text{número de animales protegidos x 100}}{\text{número total de animales}}$$

Existen distintos tipos de electrodos. Los corneales y los de orejas son los más usados.
En el Laboratorio de Química Medicinal se cuenta con ambos tipos. En este trabajo los datos que se presentan fueron obtenidos empleando electrodos de oreja.
Los electrodos son humedecidos con solución fisiológica en el momento de la aplicación en las orejas del animal, a fin de favorecer el contacto y asegurar la conducción de la corriente eléctrica.

- ***Ensayo PTZ***

Se analiza la capacidad de un fármaco, administrado previamente de prevenir la convulsión donde el agente convulsivo utilizado, inductor de los episodios, es el pentilentetrazol (PTZ) o metrazol.
Este modelo identifica compuestos que elevan el umbral convulsivo.

- La solución de PTZ se prepara momentos antes de ser utilizada.

- La cantidad de PTZ administrada de 85 mg/ Kg, corresponde a la CD_{97} en ratones, aquella capaz de inducir convulsión en el 97 % de los animales.[14, 17]

El PTZ puede administrarse por varias vías.[18, 19] La más utilizada es la s.c y es la usada en este trabajo.

Procedimiento:

Se administra la droga o compuesto a evaluar su capacidad anticonvulsiva. Una vez inyectados con PTZ los animales son observados durante 30 minutos para determinar si se produce alguna convulsión.
El PTZ provoca inicialmente sacudidas clónicas, que luego se hacen más sostenidas, y pueden conducir a un episodio tónico-clónico.

Criterio de Protección:

Como criterio para decidir protección o no frente a la convulsión se toma la aparición de al menos de un episodio clónico continuo durante 5 segundos de duración.

El porcentaje de protección se expresa como:

$$\% \text{ de Protección} = \frac{\text{número de animales protegidos x 100}}{\text{número total de animales}}$$

Ensayo RotoRod

Con este ensayo se mide el efecto neurotóxico, manifestado como sedación o ataxia, provocado por la droga anticonvulsiva.

Aparato utilizado:

El equipo que se utiliza fue construido en la Facultad de Ingeniería de la UNLP (Figura 6), en base al diseñado inicialmente por Dunham y Miya [20] y a semjanza del Rota Rod tredmill for mice (Ugo Basile-Biological Research Apparatus, Varese, Italia). Este aparato consiste en un cilindro de 3 cm de diámetro que gira a 15 rpm. [21] Sobre este cilindro se colocan los animales separados unos de otros por paneles circulares. Los animales que caen lo hacen sobre una bandeja situada debajo del cilindro. La velocidad de rotación puede

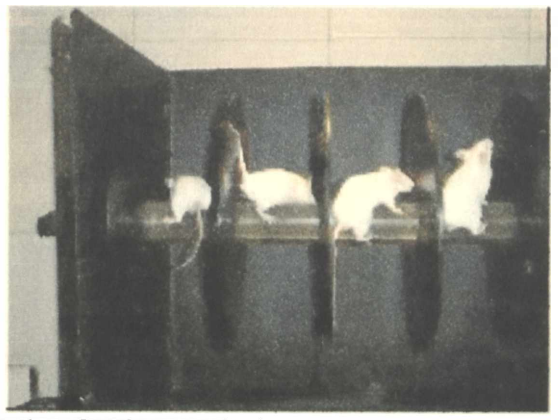


Figura 6. Equipo de Rotorod.

graduarse en forma continua.

Criterio de Neurotoxicidad:

Un ratón normal es capaz de mantener el equilibrio en un cilindro giratorio durante largos períodos de tiempo.
La incapacidad de un ratón de mantener la caminata durante un minuto sobre el cilindro en cada uno de los tres ensayos sucesivos, se considera como signo de sedación o ataxia.

Como resultado de cada ensayo se obtiene el porcentaje de toxicidad de la droga que se expresa como:

$$\% \text{ de Toxicidad} = \frac{\text{número de animales que caen x 100}}{\text{número total de animales}}$$

5. Resultados

Se presentan los resultados obtenidos a partir de la evaluación biológica de los doce compuestos preparados.

Se utilizan como referencia los datos experimentales del ácido valproico y fenitoína obtenidos en el laboratorio de Química Medicinal frente al MES test, PTZ test y su neurotoxicidad. Esto se realizo a fin de confirma la validez de los datos obtenidos de los compuestos preparados al cotejarlo respecto a drogas estándar.[22]

N,N'-difenetilsulfamida presentó problemas de solubilidad en la preparación de la solución a dosis altas, por lo que no se pudo evaluar a 300 mg/kg.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en Fase I frente al MES test, PTZ, y Rotorod, de los compuestos preparados. Adicionalmente se incluye la clasificación de los compuestos de acuerdo a la actividad observada, así como los valores de log P calculados con el programa Hyperchem 7.01.

A continuación en la Figura 7 se muestran las estructuras de los compuestos preparados y ensayados, para una mejor compresión de la tabla 1 y 2 así como la posterior discusión de resultados.

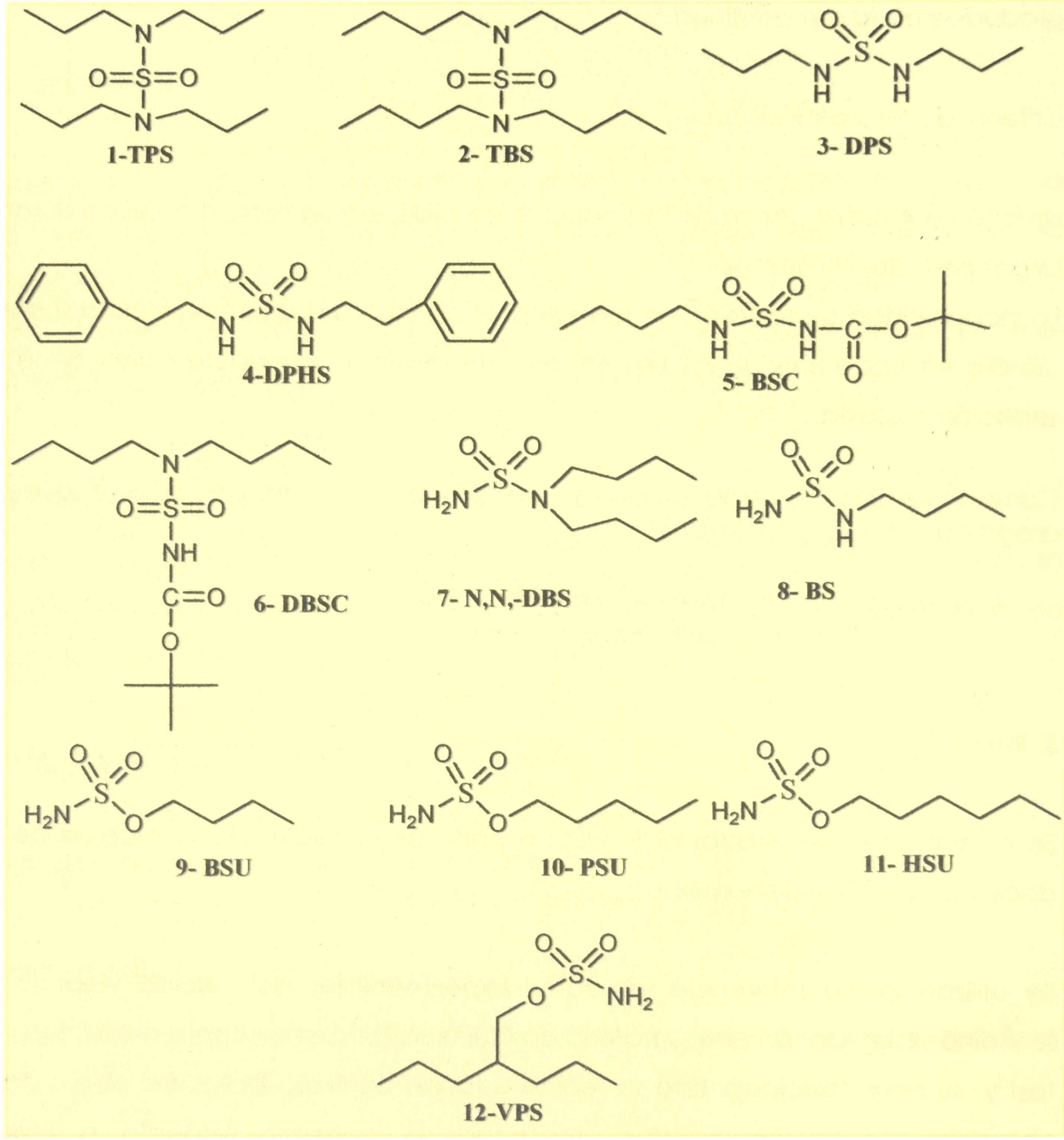


Figura 7. Compuestos preparados y evaluados como anticonvulsivos en este trabajo.

Compuesto	Categoría[f] 1,2,3,4	Log P[d]	Dosis (mg/Kg)	Actividad MES[a] tiempo (h) 0.5	Actividad MES[a] tiempo (h) 4	TOX[b] tiempo (h) 0.5	TOX[b] tiempo (h) 4	Actividad PTZ[c] tiempo (h) 0.5	Actividad PTZ[c] tiempo (h) 4
1-TPS	3	2.49	30	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
			100	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
			300	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2-TBS	3	4.69	30	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			100	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			300	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2
3-DPS	2	1.04	30	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3
			100	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3
			300	3/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3
4-DPHS	1	1.95	30	0/3	0/3	0/3	03	0/2	0/2
			100	3/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			300	i	i	I	I	i	i
5-BSC	1	0.67	30	1/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			100	3/3	1/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			300	3/3	1/3	0/3	0/3	0/2	0/1
6-DBSC	1	1.79	30	1/3	1/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			100	2/3	1/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			300	2/3	2/3	0/3	0/3	0/2	0/2
7-N,N-DBS	1	1.53	30	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
			100	2/3	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3
			300	G	G	3/3	3/3	-	-
8-BS	1	0.41	30	0/3	1/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			100	-	1/2	2/3	0/3	-	0/2
			300	-	-	-	-	-	0/2
9-n-BSU	1	0.73	30	1/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			100	AC	0/2	3/3	1/3	AC	-
			300	AC	AC	3/3	3/3	AC	AC
10-n-PSU	1	1.13	30	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			100	3/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			300	A	A	3/3	3/3	A	A
11-n-HSU	1	1.52	30	1/3	3/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			100	3/3	1/3	0/3	0/3	0/2	0/2
			300	A	A	3/3	3/3	A	A
12-VPS	1	2.32	30	2/3	1/3	0/3	0/3	0/2	0/3
			100	0/3	3/3	0/3	0/3	1/2	2/3
			300	A	A	3/3	3/3	A	A

Tabla 1. Perfil farmacológico de los compuestos preparados. [a]Maximal electroshock test (número de animales protegidos/número de animales ensayados). [b] Toxicidad evaluada en Rotorod (número de animales que caen/ número total de animales); [c]Pentilentetrazol test (número de animales protegidos/número de animales ensayados); [d]Log P (Coeficiente de partición octanol/agua) Calculado con el programa Hyperchem 7.01.Tiempo en horas, f: Clasificación según su actividad[23] i: insoluble; AC: Acción convulsivante, G: los ratones giran sobre si mismos ; A: ataxia.

La Tabla 2 es un resumen de los resultados obtenidos del *perfil farmacológico* Fase I, frente a los ensayos MES, PTZ y Rotorod, de los sulfamatos y sulfamidas preparados.

Compuesto	Categoría[f]	Dosis minima con protección MES[a] mg/Kg	Dosis minima con proteccion PTZ[b] mg/kg	Dosis Tóxica[c] mg/Kg
1-TPS	3	NO	NO	NO
2-TBS	3	NO	NO	NO
3-DPS	2	300	100	NO
4-DPHS	1	100	NO	NO[♦]
5-BSC	1	30	NO	NO
6-DBSC	1	30	NO	NO
7-N,N-DBS	1	100	NO	300
8-BS	1	30	NO	100
9-BSU	1	30	NO	100
10-PSU	1	100	NO	300
11-HSU	1	30	NO	300
12-VPS	1	30	100	300

Tabla 2. Perfil farmacológico de los compuestos preparados. [a]Maximal electroshock test (dosis mínima con protección, NO: no protege frente a este test). [b]Pentilentetrazol test (dosis mínima con protección, NO: no protege frente a este test); [c] Toxicidad evaluada en Rotorod (dosis a la que presentan toxicidad, NO: no es tóxica a la mayor dosis evaluada), [♦]: No es tóxica a 100 mg/Kg, insoluble a 300 mg/Kg; [f]Clasificación según su actividad[25] :

Categoría 1: Actividad anticonvulsivante a 100 mg/kg o menos.
Categoría 2: Actividad anticonvulsivante a más de 100 mg/ kg.
Categoría 3: Compuestos no activos a dosis mayores a 300 mg/kg.
Categoría 4: Compuestos inactivos a 300 mg/kg o tóxicos a 30 mg/kg.

3/3 (animales protegidos / animales evaluados)
2/3 (animales protegidos / animales evaluados)
1/3 (animales protegidos / animales evaluados)

De los doce 12 compuestos preparados y evaluados en Fase I, diez (10) resultaron ser activos y de ellos nueve (9) clase 1, frente al MES test (Ver Tabla 2). En el PTZ test, 10 de los 12 compuestos evaluados no presentaron actividad. El sulfamato 12-VPS y la sulfamida 3-DPS resultaron ser activos frente a ambos ensayos. Respecto a la neurotoxicidad, seis de los doce compuesto no son tóxicos a la mayor dosis evaluada, 300 mg/Kg. La sulfamida **8**-BS, si bien es activa a 30 mg/kg resultó ser tóxica a 100 mg/kg. El sulfamato **9**-n-BSU resultó tener acción a 30 mg/kg y acción convulsivante a 100 mg/kg.



Los compuestos **7-N,N-DBS**; **10-PSU**; **11-HSU**; **12-VPS** presentaron ataxia a 300 mg/kg.

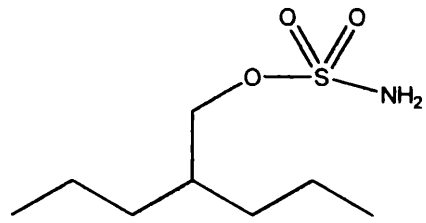
Según la clasificación en categorías deberíamos evaluar todos los compuestos clase 1 en Fase II. En este trabajo para seleccionar las estructuras a evaluar en Fase II, no sólo se tuvo en cuenta la actividad sino la toxicidad y la estabilidad química de las moléculas. Si bien los carbamatos **5-BSC** y **6-DBSC** son activos a bajas dosis y no presentan toxicidad a 300 mg/kg, no son estables en el tiempo y se hidrolizan parcialmente a las respectivas sulfamidas primarias **8-BS** y **7-N,N-DBS**. Estas sulfamidas, si bien mantienen la actividad muestran toxicidad a dosis muy cercana la activa (ver Tabla 1).

Por lo tanto los compuestos seleccionados en base a estos criterios, para ser evaluados en fase II fueron la sulfamida **4-DPHS** y el sulfamato **12-VPS** por presentar actividad frente a ambos test MES y PTZ a dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg respectivamente. Con respecto a la toxicidad de **12-VPS** (300 mg/kg) es 10 veces superior a la dosis en la que presenta actividad (30 mg/kg).

El sulfamato **11-HSU** por ser activo a 15 mg/kg y selectivo en su acción ya que a las dosis evaluadas sólo presenta actividad frente al MES test.

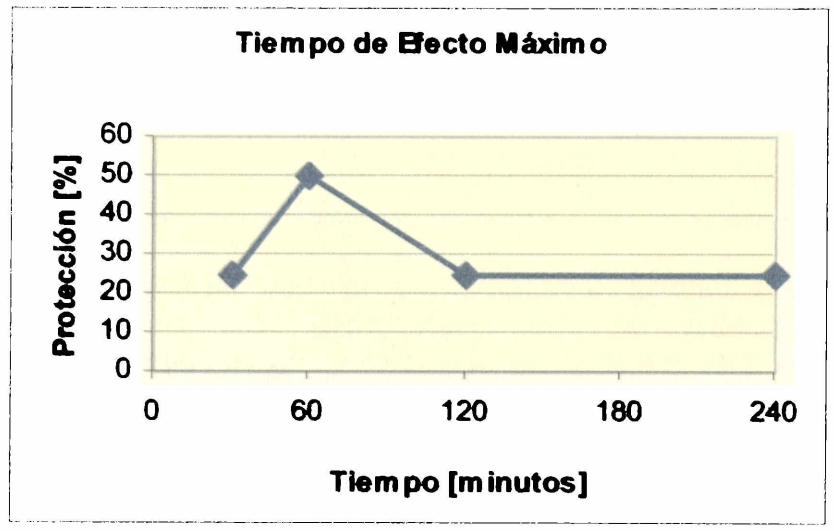
Resultados Fase II

Cálculo de la DE_{50} para 12-VPS

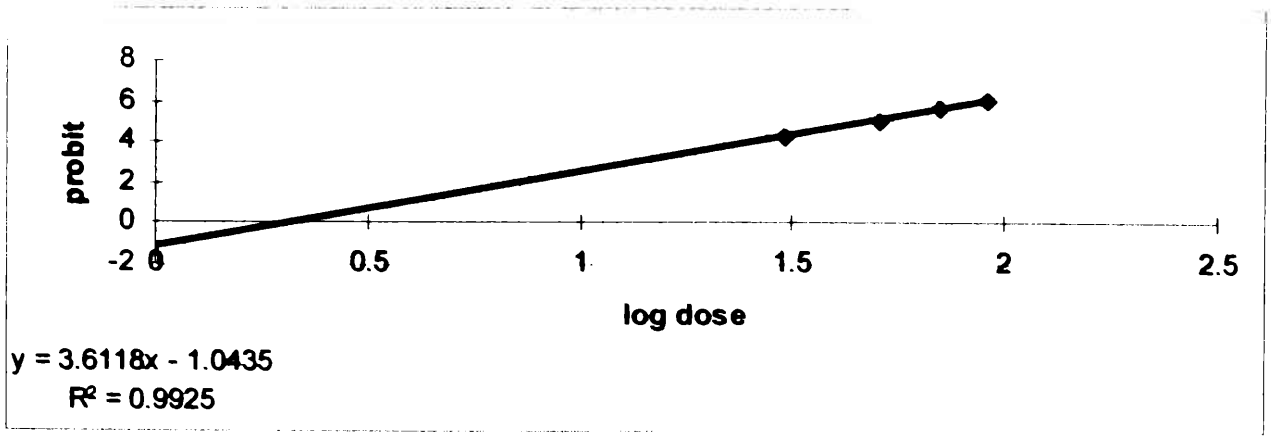


TE MAx (tiempo de efecto máximo): **60 min.**

% Protección	Tiempo [minutos]
25	30
50	**60**
25	120
25	240



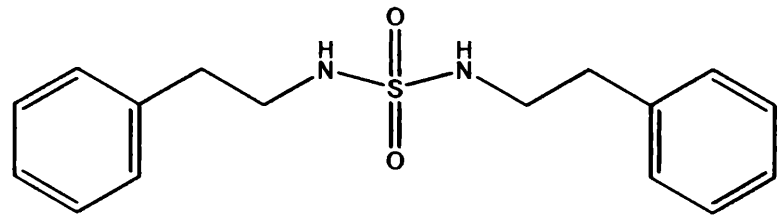
Cálculo de ED_{50}



ED_{50}: 47 mg/Kg [30- 73]

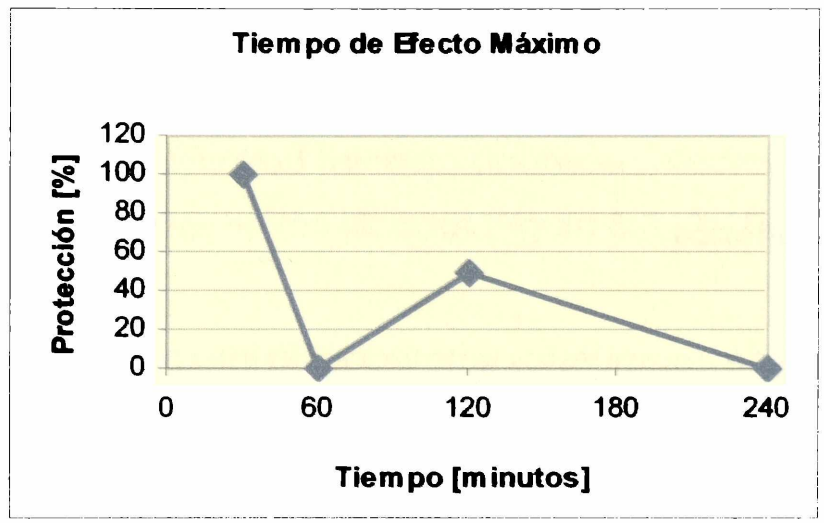
ED_{50}: 224 µmol/Kg [151- 363]; **S**: 1.88 [0.66-5.37].

Cálculo de la DE_{50} para 4-DPHS

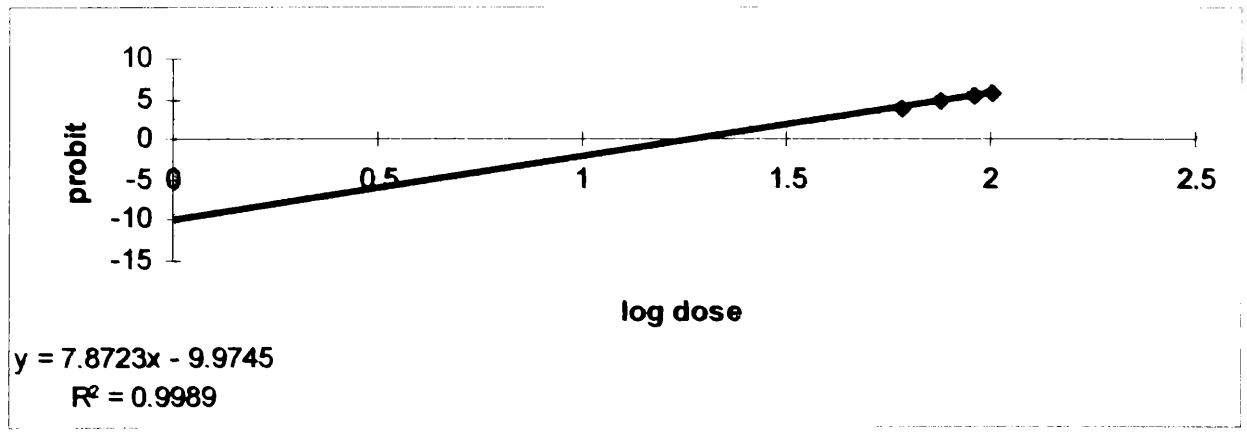


TE MAx (tiempo de efecto máximo): **30 min.**

% Protección	Tiempo [minutos]
100	**30**
0	60
50	120
0	240



Cálculo de ED_{50}



ED_{50}: 80 mg/Kg [67- 95]

ED_{50}: 263 µmol/Kg [220 - 313]; **S**: 1.33 [0.22-8.06].

Fármaco	TEMax (min)	DE_{50} MES test (µmol/Kg)	Toxicidad (µmol/Kg)	log P
12-VPS	60	224 [151- 363]	1435	2.32
4-DPHS	30	263 [220 - 313]	-	1.95
Valpramida	60	353 [267 - 466]	600*	2.23
Ácido Valproico	15	1008 [792-1282]	1700*	2.77
Fenitoína	120	22 [16-32]	260 [208-286]*	0.97

Tabla 3. Datos obtenidos en el ensayo MES de: Tiempo de Efecto Máximo, Dosis Efectiva 50, log P de los compuestos preparados y evaluados en Fase II. Se incluyen los valores para Ácido valproico, Fenitoína, Valpramida. Todos estos datos fueron obtenidos en el Laboratorio de Química Medicinal.

* Valor de la TD_{50}. Valpramida presenta una TD_{50}= 600 µmol/Kg, a las 2h. 4-DPHS no es tóxica a 329 µmol/kg (la máxima dosis evaluada).

6. Discusión de los resultados

En función del número de compuestos sintetizados la interpretación y la variación estructural de los mismos, no es posible encontrar una relación estructura-actividad cuantitativa. Podemos observar una tendencia cualitativa, y así plantear conclusiones parciales.

De los doce 12 compuestos preparados y evaluados en Fase I, diez (10) resultaron ser activos frente al MES test y nueve (9) clase 1(Ver Tabla 2). En cuanto al ensayado PTZ, 10 de los 12 compuestos evaluados no presentaron actividad. El sulfamato **12-VPS** y la sulfamida **3-DPS** resultaron ser activos frente al ensayo MES y PTZ.

En los compuestos preparados la tetra-sustitución del grupo sulfamida trae aparejado una anulación de la actividad.

Sin embargo las sulfamidas simétricas *N,N'*-sustituidas, **3-DPS**, **4-DPHS** y *N,N'*-di-butilsulfamida[24] resultaron ser activas. De igual manera los sulfonil carbamatos, mono y di substituidos, resultaron activos a 30 mg/kg.

Analizando la influencia que tiene la mono y di-sustitución sobre el mismo átomo de N en la actividad se pude decir que los compuestos **7-N,N-DBS** y **8-BS** son

activos frente al MES test a bajas dosis (30 mg/kg) presentando neurotoxicidad a 300 y 100 mg/kg respectivamente.

La inserción en la cadena lateral de un grupo voluminoso **4-DPHS** adyacente a la porción polar, o sea sobre el átomo de N, contribuye al incremento de la actividad. Sin embargo se observa que cuando ambos N del grupo sulfamida se sustituyen por grupos voluminosos (**1-TPS**, **2-TBS**) los compuestos resultan ser inactivos. Probablemente la presencia de un átomo de H sobre el átomo de N sea necesaria para la actividad. Los compuestos **1-TPS** y **2-TBS** resultaron ser inactivos frente a ambos test.

Si bien varios autores sintetizaron y evaluaron gran cantidad de ácidos monocarboxílicos derivados del ácido valproico (**VPA**), modificando la longitud de las cadenas, saturación y ramificación, no se ha planteado con anterioridad a este trabajo el reemplazo bioisostérico de la función ácida del VPA y sus análogos hidrocarbonados, por una función sulfamato o sulfamida. Kaene[25], en 1983, encontró una correlación significativa entre la longitud de las cadenas laterales y la potencia anticonvulsiva en ácidos carboxílicos análogos al VPA. Sin embargo vio que al aumentar la longitud también aparecen efectos sedativos y tóxicos. En el caso de los compuestos no ramificados (Figura 8; 1, 2, 3) no presenta actividad.

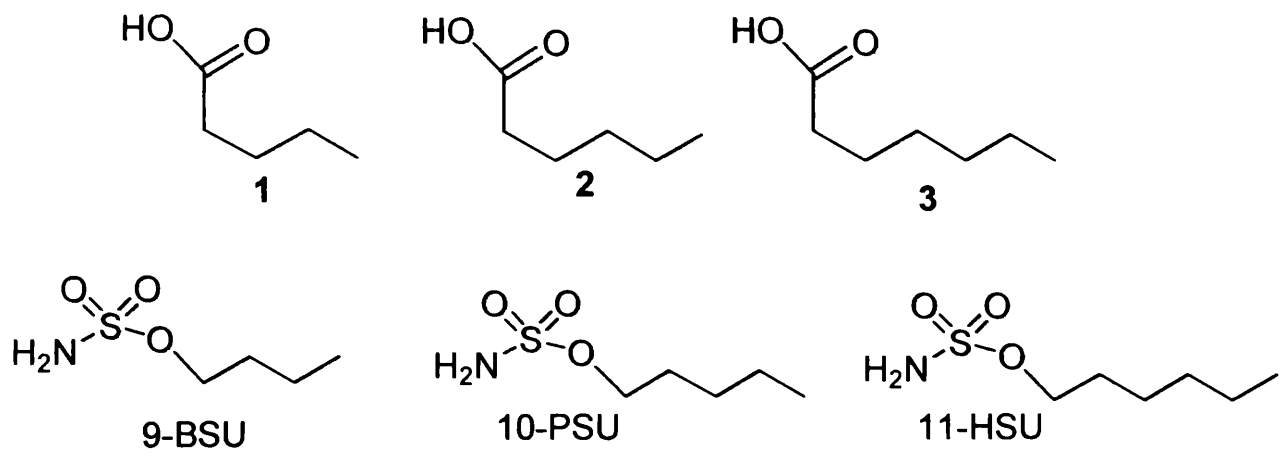


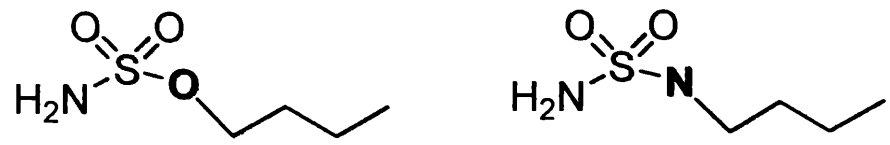
Figura 8. Comparación estructura-actividad de ácidos carboxílicos y sulfamatos.

Con relación a lo anterior, en este trabajo de Tesis se observó que el reemplazo bioisostérico del grupo carboxílico por la función sulfamato (**9-BSU**; **10-PSU**; **11-HSU**) da como resultado compuestos activos frente al MES test.

En la serie de sulfamatos alifáticos se observa que al aumentar la longitud de la cadena (C_n; n= nro de átomos de C) desde n=4 hasta n=6, trae aparejado un

aumento de log P y se incrementa la actividad anti-MES, así como la neurotoxicidad (Tabla 1). Esto indicaría que el aumento en la lipofília permite que la droga atraviese la BHE con mayor facilidad.

Los compuestos **9-BSU** y **8-BS** un cambio de un átomo de N por un átomo de O (Figura 9) trae aparejado acción convulsivante.



9-BSU 8-BS

Figura 9. Cambio de un átomo de N por un átomo de O lo convierte en un agente convulsivante.

Se observó que los compuestos lineales sulfamatos (9-BSU, 10-PSU, 11-HSU) y sufamidas (**4-DPHS**, **5BSC**, **6-DBSC**, **7-N,N-DBS**, **8-BS**) sólo presentan actividad frente al MES test.

El compuesto **12-VPS**, análogo bioisósterico del VPA, al igual que este último es activo frente a MES test y PTZ.

Comparando los grupos funcionales: ácido (VPA), amida (VPD), alcohol (Val-OH), sulfamato (**12-VPS**), fosfónico (VPO) y fofínico (VPI) (Figura 10), se observa que si bien la cadena lipofílica es importante para que la droga llegue al sitio de acción (SNC), es importante la distribución electrónica sobre el grupo funcional. El grupo funcional sería responsable de la determinación de la actividad.

Datos obtenidos en nuestro laboratorio (Tabla 3), y recopilados de bibliografía para VPO[26] muestran que mantenido constante la cadena alifática, y variando la funcionalización podemos tener compuestos activo e inactivos.

Si comparamos las ED_{50} frente a MES test de los compuestos de la Figura 10, vemos que el compuesto **12-VPS** es el más activo. Resulta ser 4 veces más activo que VPA, y 1.5 veces más activo que VPD. Los tres compuestos son activos frente al ensayo PTZ.

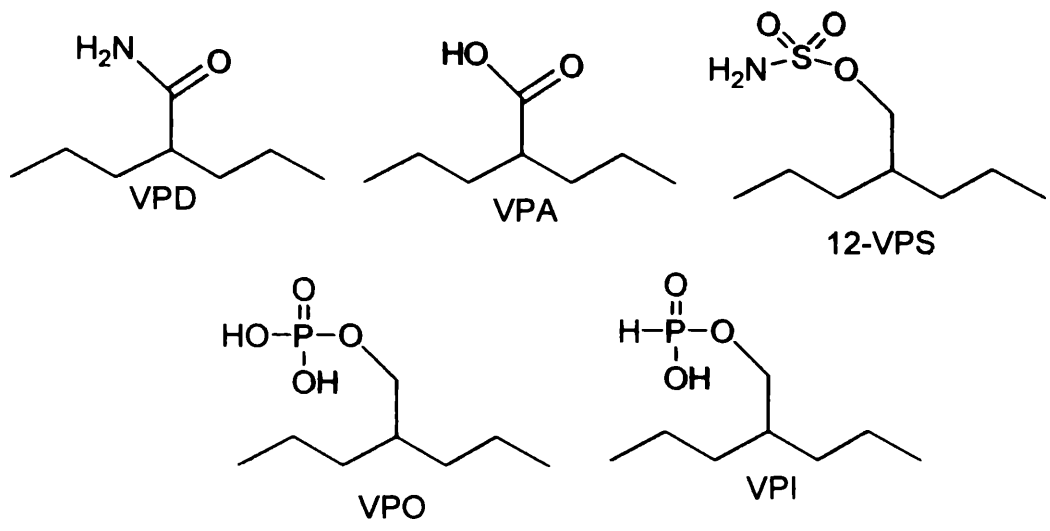


Figura 10. Cambio de la funcionalización sobre la cadena 2-propilacética.

El cambio bioisotérico del grupo ácido carboxílico del VPA por el grupo fosfónico (VPO) o fosfínico (VPI) conduce a una perdida de la actividad.[29]

La valpramida (VPD), amida primaria del ácido valproico, ha sido usada en clínica en muchos países europeos para el tratamiento de las convulsiones epilépticas y como anti-psicótico.[27, 28, 29, 30] Si bien es más activa que VPA, en humanos, a diferencia de lo que ocurre en animales, se biotransforma en un 77-81% a VPA[31]. Es decir actúa como forma de liberación retardada de VPA.

Resumen:

- Con respecto a los requerimientos estructurales, electrónicos y conformacionales necesarios para la actividad anticonvulsivante los derivados sintetizados cumplen con los requisitos determinados por el farmacóforo postulado en nuestro grupo de trabajo.

- De los doce compuestos sintetizados 10 resultaron ser activos y 9 clase 1(Tabla 2).

- En el ensayo MES estos compuestos son menos activos que Fenitoína pero 4 veces más activos que el anticonvulsivante de uso clínico ácido valproico.

- Si bien es importante la presencia de la cadena lipofílica para que las drogas lleguen al sito de acción SNC, la presencia de los grupos funcionales sulfamato y sulfamida tienen un papel primordial en la actividad.

- Se logró en un trabajo interdisciplinario al obtener nuevos compuestos estructuralmente sencillos con actividad anticonvulsiva superando en algunos casos a compuestos de uso clínico.

- Se debe seguir trabajando para modular la neurotoxicidad (ataxia) de los compuestos preparados en este trabajo.



Referencias

[1] Löscher, W.; Schmidt, D. *Epylepsy Res.*, **1994**, *17*, 95.

[2] Vamecq, J.; Bac, P.; Herrenknecht, C.; Maurois, P.; Delcourt, P.; Stables, J. *J.Med.Chem.*, **2000**, *43*, 1311.

[3] White, H. S. *Epilepsya,* **1999**, *40* (Suppl. 5), S2; (b) White, H.S. *Epilepsya* **2003**, *44(Suppl. 7)*, 2.

[4] Kupferberg, H.J. Antiepileptic drug development program: A cooperative effort of government and industry. *Epilepsia*, **1989**, *30 (suppi.1)*, S51-S56.

[5] Porter, RJ.; Cereghino, J.J.; Gladding, G.D.; Hessie, B.J.; Kupferberg, H.J.; Scoville, B.; Whitte, B.G. *Clev. Clin. Q.*, **1984**, *51*, 193-305.

[6] Stables, J.P.; Kupferberg, H.J. *Cap.16: The NHI anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: Preclinical anticonvulsan screening project.* En: Avanzini, G.; Regesta, G.; Tanganelli, P.; Avoli, M. (Eds.) *Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs*. John Libbey & Company Ltd. **1997**, 191-198.

[7] Stables, J.P.; Kupferberg, H.J. *Cap.16: The NHI anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: Preclinical anticonvulsan screening project.* En: Avanzini, G.; Regesta, G.; Tanganelli, P.; Avoli, M. (Eds.) *Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs*. John Libbey & Company Ltd. **1997**, 191-198.

8 Malawska, B., Kulig, K.; Spiewaka, A.; Stables, J.P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* , **2004**, *12*, 625–632.

[9] Goldstein, A.; Aronow, L. S. *Principles of drugs action : The Basis of Pharmacology 2 nd Ed.* J. Wiley & Sons, New York, **1974**, 449-470.

[10] Shck, E.; Murakami, T.; Natch, Ch.; Pop, E.; Bodor, N. *J. Pharm. Res.*, **1989**, *78*, 837-843.

[11] Löscher, W.; Esenwein, H.; *Drug Res.* **1978**, *28 (1)*, 782-787.

[12] Löscher, W.; *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **1981**, 249, 158-163.

[13] Löscher, W.; Nau, H. *Neuropharmacology*, **1985**, *24 (5)*, 427-435.

[14] Swinyard, E.A.; Woodhead, J.H.; White, H.S.; Franklin, M.R. *Cap.5: Experimental Selection , Quantification, and Evaluation of Anticonvulsant.* En: Levy, R.; Mattson, R.; Meldrum, B.; Penry , J.J.; Dreifuss, F.E. (Eds) *Antiepileptic Drugs, 3 rd Ed.*, Raven Press., Ltd., New York, **1989**, 85-102.

[15] Bartsh, W.; Sponer, G.; Dietmann, K.; Fuchs, G. *Arzneimittel Forschung (Drug Research)*, **1976**, *26 (8)*, 1581-3.

[16] Woodbury, L.A.; Davenport, V.D. *Arch.Int.Pharmacodyn.*, **1952**, *XCII (1)*, 97-107.

[17] Fisher, R.S. *Brain Research Reviews*, **1989**, *14*, 245-278.

[18] Stone, W.E. *Pharmacology*, **1970**, *3*, 367-370.

[19] Little, H.J.; Nutt, D.J.; Taylor, S.C. *Br.J.Pharmaceut. Assoc.* **1957**, *88*, 326.

[20] Dunham, N.W.; Miya, T.S.; *J.Am.Pharmaceut. Asoc.* **1957**, *46*, 3.

[21] Elmazar, M.M.A.; Hauck, R.S.; Nau, H. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1993**, *82 (12)*, 1255-8.

[22] Tasso, S. M. Tesis Doctoral para acceder al Título de Doctor en Filosofía y Farmacia, **2003**, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

[23] Malawska,B., Kulig,a, K.; Spiewaka, A.; Stablesb, J.P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, *12*, 625–632.

[24] Gavernet, L.; Dominguez Cabrera, M.J.; Bruno-Blanch, L.E.; Estiú, G.L. 3D- QSAR Design of Novel Antiepileptic Sulfamides. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, aceptado.

[25] Kaene, P.E.; Simiand, J.; Mendes, E.; Santucci, V.*Neuropharmacology*, **1983**, *22*, 875-879.

[26] Kehler, J.; Hansen, H.I.; Sanchez, C. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **2000**, *10*, 2547-2548.

[27] Favel, P.; Cartier, J.; Gratadou, J.P.; Gratadou, G. *Epilepsia*, **1973**, *14*, 329-334.

[28] Lambert, P.A.; Venaud, G.*L´Encehale*, **1987**, *13*, 367-373.

[29] Pisani, F.; Di Perri, R.*Ital. J.Neurol. Sci.*, **1980**, *4*, 245-249.

[30] Bialer, M. *Clin. Pharmakokinet*, **1991**, *20*, 114-22.

[31] Bialer, M.; Rubinstein, A.; Dubrousky, J-; Raz, I.; Abramsky, O. *Int. J. Pharm.*, **1985**, *23*, 25-33.

ANEXO 1

Descubrimiento de Nuevos Líderes

1. Introducción

El hombre, en su historia, ha buscado y busca nuevos compuestos químicos dado que le confiere a ellos la capacidad de paliar sus enfermedades. Estos compuestos pueden estar presentes en minerales, animales, vegetales terrestres y marinos. Distintas fueron las metodologías a las que recurrió para descubrir nuevos fármacos, dependiendo éstas del conocimiento que disponía para abordar este gran proyecto, la salud individual y colectiva de la sociedad.
Estas metodologías y sus tecnologías asociadas fueron evolucionando con el tiempo, desde el uso de infusiones y cocciones de vegetales hasta llegar a la identificación de los compuestos responsables de su actividad. Actualmente hace uso de la síntesis de compuestos asistida por computadora, diseñando moléculas capaces de interactuar con el sitio específico responsable de una acción biológica.

2. La evolución en las tecnologías

Las tecnologías han cambiado, especialmente en estos últimos 20 años y con ellas las estrategias para llegar a un nuevo fármaco. En los **años '70**, las hipótesis químicas y biológicas guiaban el desarrollo de un nuevo fármaco. Aunque la síntesis resultaba relativamente lenta, el verdadero cuello de botella eran los modelos animales de experimentación y el aislamiento de órganos para los ensayos preclínicos. Los ensayos farmacológicos usaban docenas de animales para cada compuesto y normalmente se necesitaba más tiempo para la caracterización biológica que para la síntesis química. El azar jugaba un papel importante en el descubrimiento de nuevos compuestos activos. [1]

> ***En el pasado*** *los "doctores" probaban "drogas" de las que sabían poco, para curar enfermedades de las que sabían menos, en seres humanos de los cuáles conocían menos aún.*
> **Voltaire (1694-1778), por J.A**

En los **años '80** se introdujeron el modelado molecular y los modelos de ensayos *in vitro* [inhibición enzimática, reconocimiento de receptores (*binding*)] siendo el principal problema la síntesis química de los compuestos propuestos por estos métodos, que demandaba una alta dedicación con una baja eficiencia.

En el **nuevo milenio** [2] se introducen las tecnologías basadas en la obtención de nuevos fármacos a partir del conocimiento del sitio receptor: el *screening virtual,*

la farmacogenética (producción de proteínas) o *el diseño de estructuras basadas en el ligando* donde se utilizaron técnicas como: la *combinatoria química* que permite la síntesis dirigida (chemistry driven) y la obtención de un único compuesto. Otra técnica que tubo gran auge y muy utilizada por la industria farmacéutica es el *screening de alta performance* HTS♥ (Hight Throughup Screening)[3] o ultra HST que abarca la determinación de la actividad farmacológica/biológica de compuestos combinando búsqueda rápido y técnicas de perfilado molecular de alto rendimiento que le permiten analizar miles de compuestos o mezclas por semana. El paso limitante en esta década, son las propiedades **ADME** (adsorción, distribución, metabolización y eliminación) (Figura 1). La combinatoria química permitió la accesibilidad sintética de un gran número de compuestos. Se prepararon y evaluaron utilizando técnicas de combinatoria química y HTS, compuestos de alto peso molecular, sin tener en cuenta todos los problemas asociados a la biodisponibilidad y la farmacocinética.

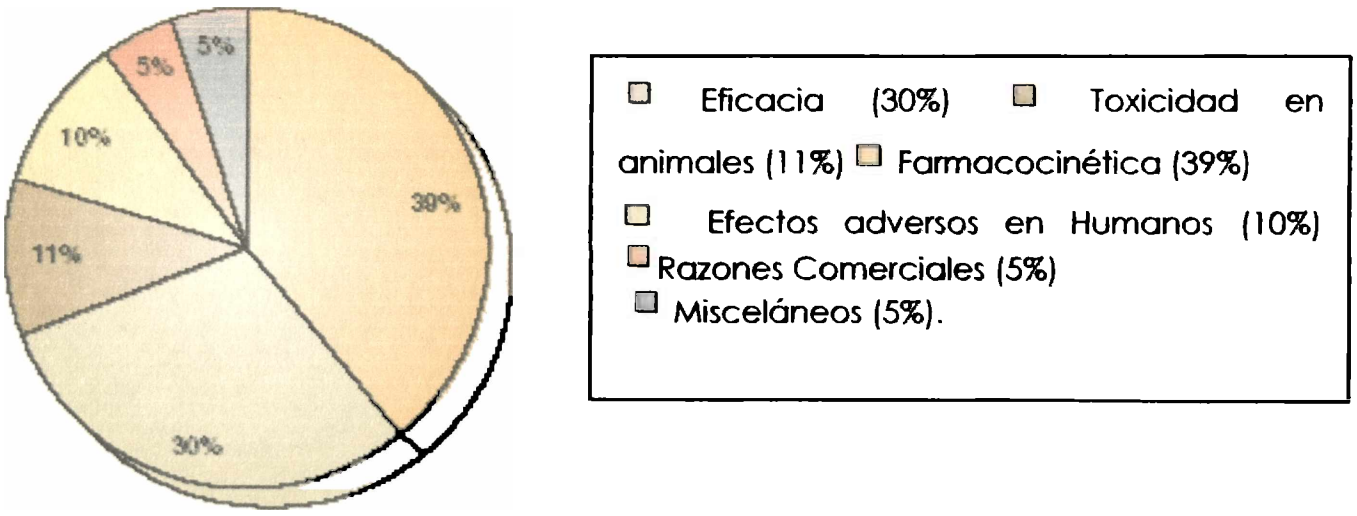


Figura 1. Causas por las que falla el desarrollo de Nuevas Entidades Químicas (NCEs) o fármacos. Datos obtenidos a partir de 198 NCEs en desarrolllo clínico en U.K entre 1964-1985. Tomado de Kubinyi, H. *Nature Reviews, Drug Dicovery*, **2003**, *Vol.2*, 665.

Aunque esta situación fue cambiando en los últimos años, al introducirse la síntesis en paralelo y librerías diseñadas, se necesitan aún mejores herramienta para predecir rápidamente los parámetros ADME.

Se investigan de miles a millones de compuestos, y a pesar del gran número de compuestos que se evalúan no hay garantía de encontrara un líder.

♥ HTS o uHTS se refiere a las técnicas para le evaluación *in vitro* automatizada de grandes cantidades de compuestos simultáneamente. Para ello se usan ensayos bioquímicos cuyos efectos son fácilmente detectables y medidos (cambio de color en una reacción enzimática o desplazamiento de radioligandos).



El Presente es la *farmacogenómica*[♣]. Las variaciones genéticas que existen entre las personas son una limitación fundamental para los tratamientos actuales que utilizan el manejo de las enfermedades, por ejemplo del Sistema Nervioso Central. Cada persona reacciona de una forma diferente a un fármaco, de ahí la necesidad de introducir "*tratamientos a la carta*". Esto significa que con el conocimiento del genoma humano se podrán diseñar fármacos dirigidos a una enfermedad concreta que tiene un marcado carácter genético y, por otra parte, diseñar medicamentos que eviten efectos tóxicos debido a un fallo metabólico. Por ejemplo, medicamentos que interactúen con una determinada proteína involucrada en la enfermedad del paciente.

La *farmacogenómica* servirá para optimizar el rendimiento de los fármacos, para dirigir el fármaco a la persona adecuada, para evitar efectos secundarios y para evitar costos, es decir, no trabajar con ensayo y error, sino dirigir el medicamento a la persona y patología adecuada.

La secuenciación del genoma humano ha revelado la presencia de un gran número de potenciales blancos o dianas terapéuticos, sin embargo, la mayoría de estos blancos no han sido completamente caracterizados ni se ha establecido su asociación con una enfermedad concreta.

Se ha estimado que el número de potenciales blancos terapéuticas se encuentra entre 600 a 1.500, no obstante, los fármacos que actualmente se encuentran en el mercado actúan sobre 500 dianas diferentes.[4] El reto actual consiste en seleccionar a partir del conjunto de genes del genoma humano (30.000 genes) aquellos genes que dan lugar a proteínas que pueden llegar a ser receptores involucrados en una patología o blanco terapéutico.[5]

Entre las preguntas que quedan abiertas acerca de las nuevas tecnologías se encuentran:

♣ El 22 de marzo de 2005, la FDA ha informado de la difusión de la '*Guía sobre Farmacogenomica*' que ha elaborado. Pretende orientar a la Industria en esta área de conocimiento durante el desarrollo de nuevos medicamentos, lo que permitirá tratamientos más adecuados a las características genéticas de los pacientes. Los polimorfismos pueden explicar diferentes respuestas a los mismos tratamientos, así como determinados efectos adversos o interacciones, según diferentes genotipos enzimáticos (p.ej., CYP2D6). Los nuevos test farmacogenéticos permitirán ajustar dosis de determinadas terapias cardiacas, psiquiátricas o antineoplasicas a las características genéticas de los pacientes. La información se encuentra en la web de FDA:

- Existe una droga específica para un genoma (*druggable genome*)?
- Un único blanco terapéutico es siempre la mejor manera de abordar el problema?
- Una pobre ADME es el único problema con el que nos podemos encontrar? [6]

3. Qué es un líder?

Se ha intentado definir las propiedades empíricas que caracterizan a una estructura líder de muchas maneras diferentes. Las características principales se pueden enumerar como sigue:

1) El compuesto debe tener alguna *actividad biológica deseable*, si bien esta puede ser moderada y no selectiva.
2) Cualquier modificación estructural realizada hasta el momento, sobre la estructura base, muestra una disminución de actividad o incremento de su toxicidad.
3) No debería reaccionar de forma irreversible con el blanco o receptor biológico, aunque se debe admitir que algunas de las drogas líderes más exitosas, como el ácido acetilsalicílico, las penicilinas, y el omeprazol, son inhibidores enzimáticos irreversibles.

Un criterio general recomendado, según algunos autores, es que un líder debe tener un peso molecular menor de 350, y un valor de lipofília expresado en log P (P= coeficiente de partición octanol /agua) menor a 3.[7]

Por otro lado la "*regla de cinco*" de Lipinski[8] requiere que las drogas tengan:

- un peso molecular menor a 500,
- un valor de log P menor de 5,
- no más de 5 enlaces de hidrógeno dadores de electrones,
- no más de 10 átomos de N y O (aproximadamente estimado a partir del número de hidrógenos aceptores de electrones) en la molécula.

Hay un alto riesgo de baja biodisponibilidad si dos o más de estas condiciones se violan. Otras propiedades que se pueden estudiar, como determinantes de la biodisponibilidad, son el área de la superficie polar, y la flexibilidad de la molécula expresada como el número de enlaces capaces de rotar.

4. La Industria Farmacéutica y el descubrimiento de nuevos Líderes

Hoy, la industria farmacéutica se encuentra frente a un déficit de drogas líderes. Mientras que en el pasado eran aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) de 50 a 60 nuevas entidades químicas (NCEs) por año, este número cayó significativamente en los últimos años. Se alcanzaron los números históricamente más bajos en los años **2000** con *27 nuevas NCEs*, **2001** con *24 NCEs*, y **2002** con sólo *18 NCEs* aprobadas.

4.1 Costos

Los costos que se invierten en investigación para el descubrimiento de un nuevo fármaco se estima que van de US-$ 500 –900 millones. Si se tienen en cuenta los fracasos que implican el descubrimiento de NCEs, comparado con los costos de desarrollo y el amplio campo de investigación (incluyendo los ensayos biológicos, clínicos y preclínicos); en el año *2001* se invirtieron unos 45 billones de dólares, para la obtención de cada una de las nuevas entidades químicas, y dependiendo del número de NCEs que se aprueben para su comercialización esta cifra puede ser aún mayor.

5. Dificultades actuales en el descubrimiento de un Nuevo Líder

La caída en el número de NCEs tiene diferentes motivos (Figura 1). Actualmente las dos razones más importantes son:

- La existencia de medicamentos de uso clínico muy efectivos para muchas de las *enfermedades tradicionales*, centrándose la investigación ahora en patologías crónicas, como enfermedades coronarias, la enfermedad de Alzheimer, artritis, cáncer y SIDA. Se debe tener en cuenta que las compañías farmacéuticas deben considerar tanto los factores económicos como medicinales.

- Los requerimientos de los entes reguladores para la incorporación de nuevos fármacos, con respecto a eficacia y seguridad de éstos son cada vez más exigentes.

De cualquier modo, la situación actual refleja una carencia de nuevas estructuras líderes que puedan ser optimizadas para obtener nuevos fármacos de

uso terapéutico. La proporción de compuestos a producir para obtener un nuevo medicamento aún sigue siendo muy alta y es aproximadamente de 10000 compuestos para obtener un nuevo fármaco.[9]

6. Metodologías empleadas en el descubrimiento de nuevos líderes.

Se presenta una de las tantas formas de ordenar este mundo tan vasto como es el descubrimiento y/o diseño de una nueva estructura líder.
Desde la perspectiva de la presente Tesis clasificaremos las metodologías en dos grandes grupos, aquellas que abordan el estudio desde el *ligando* y aquellas que lo hacen desde el *receptor*.

6.1 Descubrimiento de Nuevos Líderes a partir del ligando.

Métodos Indirectos

6.1.1 Productos Naturales
6.1.2 Descubrimiento por azar o *serendipity*
6.1.3 Ensayos Biológicos *in vivo* e *in vitro*
6.1.4 Barrido Farmacológico de Alta Performance (HTS) o uHTS
6.1.5 Combinatoria Química

6.1.6 Diseño Racional a partir de compuestos preexistentes

- Optimización de estructuras líderes
- "Semejante a" o Mee too
- Peptidomiméticos
- Reducción y/o eliminación de efectos adversos.
- Enantiómeros y compuestos quirales.
- Metabolitos activos: rescatando malos líderes
- **Diseño de nuevos ligandos asistido por computadoras**:
  - ❖ Fármacóforo
  - ❖ QSAR 3D: CoMFA
  - ❖ Barrido Virtual (*Screening virtual*)

6.2. Metodologías de diseño basadas en el conocimiento del sitio receptor.

Métodos Directos

6.2.1 Métodos computacionales:

6.2.1.1 Bases de Datos-Estructura 3D de proteínas:

- ❖ Rayos x
- ❖ RMN
- ❖ Modelado por Homología

6.2.1.2 Docking

6.2.1.3 Síntesis de novo

6.1 Metodologías usadas en el descubrimiento de Nuevos Líderes basadas en el ligando.

6.1.1 Estructuras Líderes obtenidas a partir de **Productos Naturales**.

Los productos naturales han sido y son una fuente inagotable en el descubrimiento de fármacos y estructuras líderes. No se conoce la verdadera amplitud de la diversidad biológica, o sea, cuántas especies de *plantas* y *animales* comparten el planeta con los seres humanos. Casi todas las estimaciones dan una cifra entre los 10 millones y los 30 millones, con algún consenso alrededor de la cifra de 14 millones.[10] De cualquier modo, sólo alrededor de 1,7 millón de especies, una pequeña parte del total, han sido identificadas y categorizadas, y menos aún han sido estudiadas.[10] Cualquiera sea el número verdadero de especies, la conservación misma de la diversidad biológica es vital para la humanidad. Aproximadamente el 28% de las NCEs encontradas entre los años 1981-2002 fueron productos naturales o derivados de productos naturales.[11] Otro 20% de los fármacos o NCEs desarrollados en este período mimetizan a productos naturales, esto significa que la síntesis química de éstos compuestos deriva del estudio de productos naturales.[15]

> Aproximadamente el 48% de los fármacos aprobados para su uso clínico en el período 1981-2002 provienen de productos naturales, sus derivados o análogos sintéticos.[15]

Si tenemos en cuenta la contribución de estas dos categorías aproximadamente el 48% de los fármacos aprobados para el uso clínico en el período 1981-2002 provienen de productos naturales, sus derivados o análogos sintéticos.[12] Las compuestos derivados de productos naturales pueden servir como nuevos

fármacos o bien ser estructuras líderes las cuáles pueden ser optimizadas por los químicos medicinales.[13]

Mientras que en el pasado los productos naturales derivados de plantas tenían un papel predominante[14], y los microorganismos sólo eran investigados como productores de antibióticos, hoy en día muchas clases de drogas son extraídas o derivadas de la acción de los microorganismos.

La mayoría de los compuestos activos derivados de productos naturales son metabolismo secundario y se caracterizan por presentar estructuras noveles y complejas.

Las plantas han sido utilizadas como medicamentos por miles de años.[15]Estas medicinas en un principio eran *drogas crudas* como tinturas, té, emplastos, y otras formulaciones a base de hierbas. Las formas específicas de usarlas y los métodos de aplicación pasaban a través de la historia de boca en boca. Recién en el Siglo XIX, se comenzaron a aislar los principios activos de extractos vegetales. Las primeras drogas extraídas de un vegetal fueron la *morfina*, la *quinina* y el *ácido salicílico*[16](Fig. 1). Los glicósidos cardíacos (Fig.1), fueron extraídos de la especie *Digitalis* y de otras plantas. Sus derivados sintéticos presentan mejores propiedades farmacocinéticas.

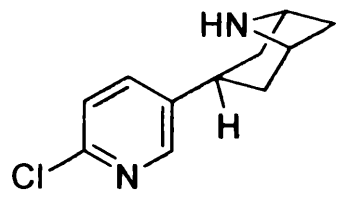
La morfina se convirtió en el líder más preciado de los analgésicos y algunos derivados de ella, estructuras químicas simplificadas, resultaron ser antitusivos, antagonistas de la morfina, neurolépticos, entre otras actividades.

El ácido salicílico es un producto natural con baja actividad antiflamatoria, su derivado el ácido acetilsalicílico actúa como inhibidor irreversible de la ciclooxigenasa, siendo el compuesto más activo y también apropiado en la profilaxis de las enfermedades trombóticas.

Otros derivados de plantas que sirvieron como líderes para el descubrimiento de nuevos fármacos son por ejemplo los alcaloides del curare, la papaverina y la atropina. [17]

Las drogas antitumorales taxol[18] y camptotecina, el producto natural anti-Alzheimer galantamina [19], la droga artemisina con actividad antimalárica[20], son ejemplos recientes de productos naturales derivados de plantas de interés terapéutico (Fig. 2).

Con excepción de *epibatidine*[21], alcaloide con importante actividad anestésica aislado de la rana *Epipedobates tricolor*, y algunos péptidos, los compuestos derivados de animales como teprotide, hirudina, y toxinas como conotoxinas, son más importantes como herramientas farmacológicas (ej: tetrodotoxina) que como estructuras líderes de uso terapéutico.



Epibatidine

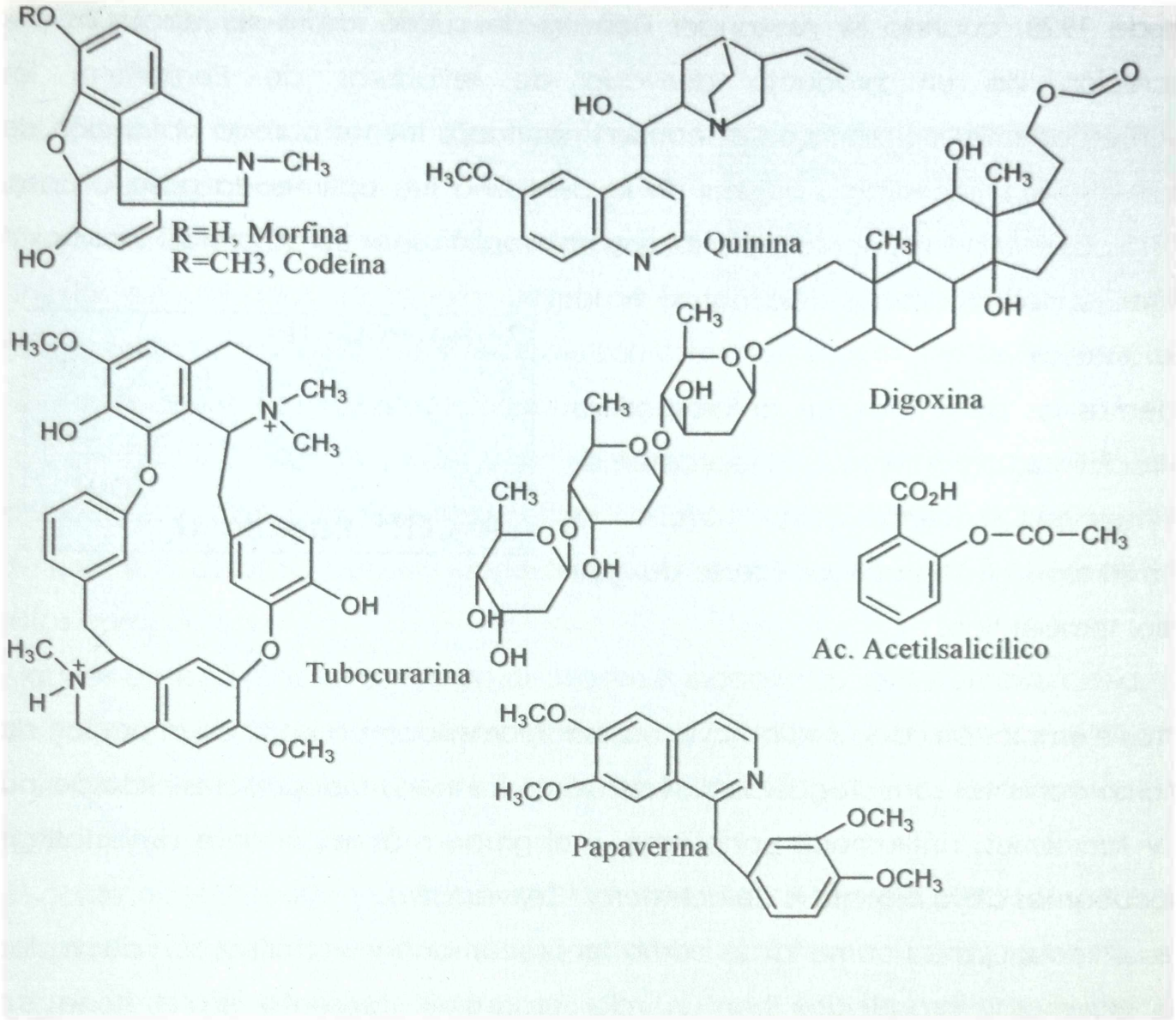


Figura 1. Diversidad estructural de fármacos derivados de productos naturales.

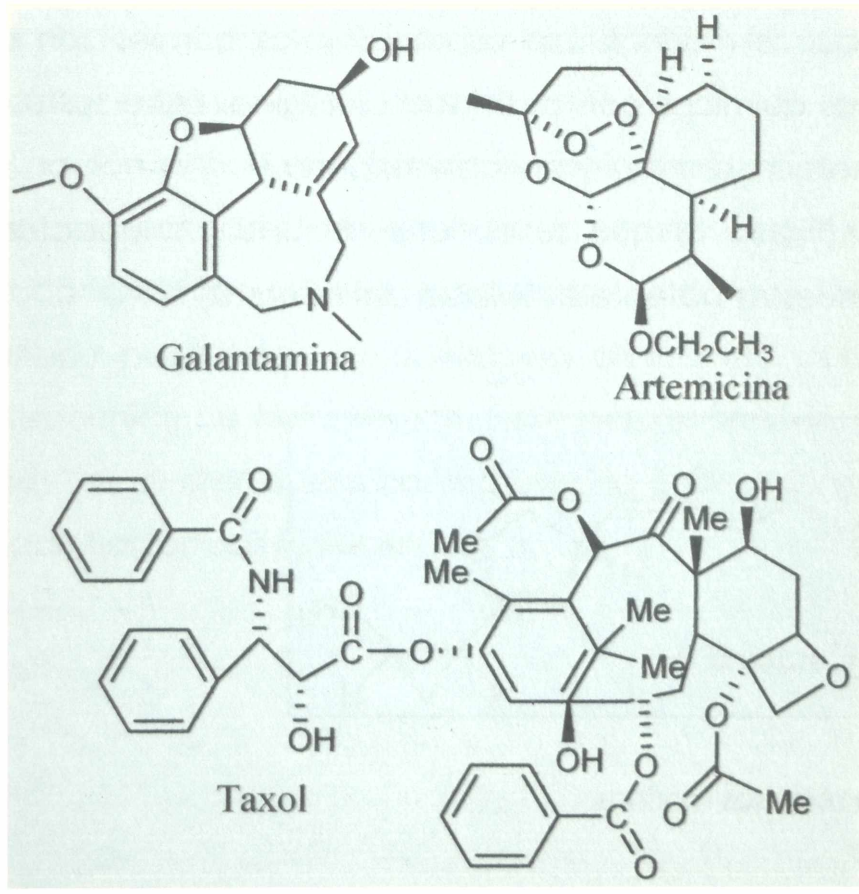
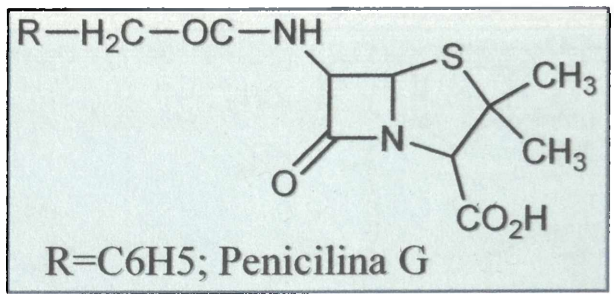


Figura 2. Ejemplo de nuevos fármacos de origen vegetal.

Desde 1928, cuando Sir Alexander Fleming descubrió la lísis de bacterias por secreción de un producto derivado de levaduras de *Penicillium*, los microorganismos comenzaron a ser una importante fuente para la obtención de antibióticos. La estructura original de la penicilina fue optimizada paso a paso, hasta obtener análogos biodisponibles, y un amplio espectro de antibióticos hasta llegar a los derivados resistentes a las lactamasas.



Además las penicilinas, las cefalosporinas, tetraciclinas, cloranfenicol, estreptomicinas, rifampicina, valinomicina, etc., se convirtieron en estructuras líderes de gran valor terapéutico.

Otros ejemplos en donde se obtuvieron estructuras líderes a partir de la acción de microorganismos son: drogas cardiovasculares, los immunodepresores ciclosporina A y tacrolimus, antitumoral ephotilone, y el grupo más importante de estatinas bloqueantes de la biosíntesis de colesterol (*Cerivastatin)*.

Los anticoagulantes cumarínicos como fenprocumona y warfarina, son derivados de dicumarol, producidos por un microorganismo presente en el heno en descomposición.[22]

En los últimos años se ha mostrado un gran interés por la posibilidad de encontrar nuevos líderes a partir de recursos marinos. Las esponjas y los corales son un recurso potencial de estructuras químicas con actividad biológica. Entre sus usos se encontró actividad antiflamatoria, antiviral y anticancerígena.[26]

Un ejemplo es la curacina A (Figura 3) que se obtiene de una cianobacteria marina, *Lyngbya majuscula*, y nuestra potente actividad antitumoral.[23]

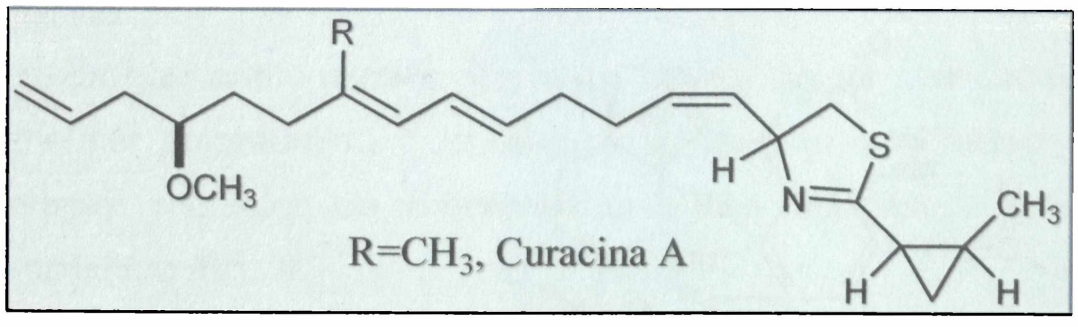


Figura 3. Curacina A obtenida de recursos marinos

6.1.2. Descubrimiento por azar o *serendipity*.

> "El azar sólo favorece a las mentes preparadas para observar."

Los primeros fármacos, en general, fueron descubiertos por azar.

El uso del óxido nitroso y el éter como gases anestésicos utilizados en cirugía, surgió de la observación de las personas que inhalaban estos químicos en fiestas, y no sentían ningún dolor si se cortaban o lastimaban.

La actividad vasodilatadora del *nitrito de amilo* y la *nitroglicerina* se descubrió por accidente; los químicos que trabajaban con éstos compuestos orgánicos sufrían de un fuerte dolor de cabeza luego de inhalar o ingerir pequeñas cantidades de estos compuestos.

Algunos otras fármacos surgieron de hipótesis incorrectas, por ejemplo, el *hidrato de cloral*, que se suponía sé metabolizaba a cloroformo con propiedades narcóticas (la forma activa es el metabolito tricloroetanol), y los uretanos, que se suponía liberaban etanol.

El *ácido acetilsalicílico* una prodroga del ácido salicílico, fue pensado para ser un compuesto mejor tolerado, y resultó tener un único mecanismo de acción.

Una secretaría estuvo despierta por más de 20 horas luego de la primer aplicación en humanos de *clonidina* (Fig. 4), el cuál se esperaba que fuera un descongestivo nasal, terminó siendo una fuerte droga antihipertensiva.

Las historias por azar de la penicilina, el LSD y el primer tranquilizante, *clordiacepan* son muy conocidas.[24, 25]

La acción anticoagulante de los compuestos tipo *dicumarol* resultó de observar que el ganado sangraba hasta morir luego de la ingesta de heno en descomposición. El anticoagulante *warfarina* fue en principio usado como veneno para ratas, su aplicación clínica fue confirmada cuando un soldado estadounidense trató de suicidarse pero sobrevivió. Hoy en día ese "veneno para ratas" es la droga más valiosa para la prevención de episodios y enfermedades relacionadas con la trombosis.

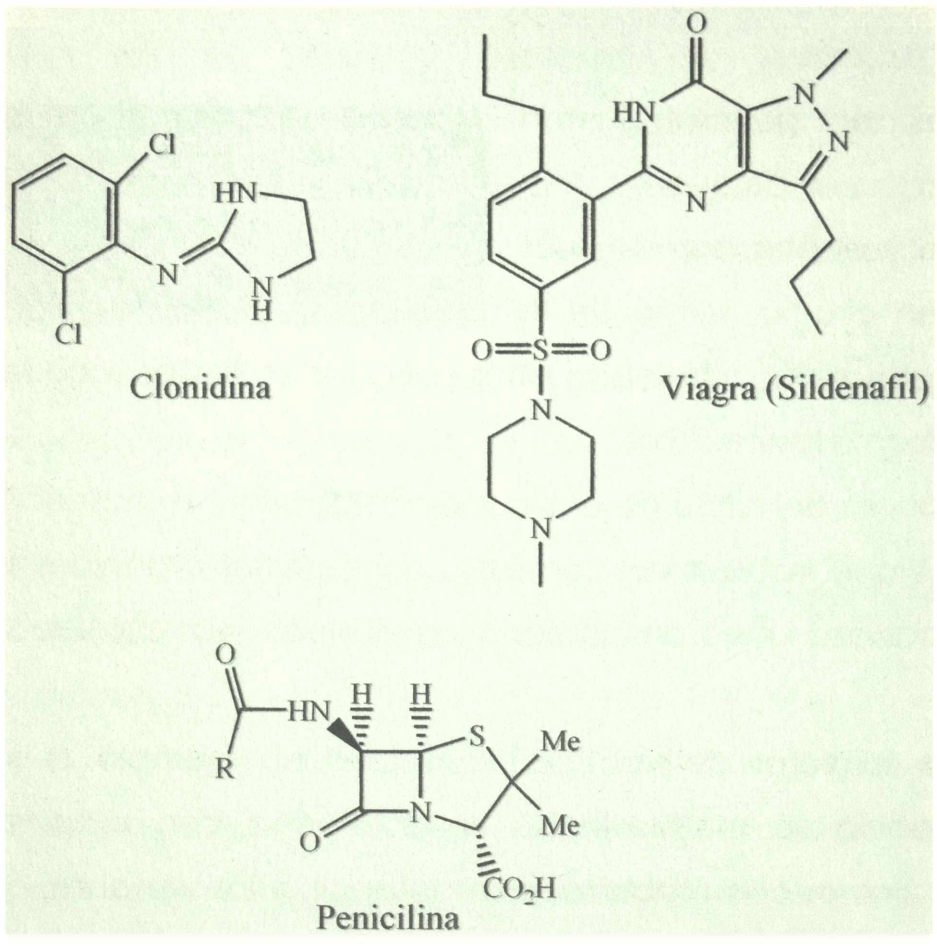


Figura 4. Ejemplos de drogas descubiertas por azar.

La mayoría de los edulcorantes artificiales como *sacarina, ciclamatos* y *aspartame*, fueron descubiertos por azar.

Otro ejemplo es el Viagra (Fig.4, ver optimización de efectos adversos).

El azar y la sagacidad juegan un rol importante en el descubrimiento de nuevas drogas. Fleming podría haber tirado su cultivo de bacterias estropeado, o Sternbach podría haber obviado el cristal de clordiacepóxido cuando limpiaba su laboratorio, pero no lo hicieron. Ellos eran investigadores con experiencia, y como dijo Louis Pasteur "la suerte sólo favorece a las mentes preparadas para observar."

"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado" por Albert Szent-Gyorgi, quién descubrió la vitamina C.

6.1.3 Ensayos Biológicos *in vivo e in vitro*

La elección correcta del ensayo biológico es crucial para el éxito de cualquier programa de desarrollo de nuevos fármacos. El ensayo debe ser simple, rápido y relevante ya que un gran número de compuestos deben ser analizados en los ensayos preclínicos.

Ensayos in vivo

En los ensayos *in vivo* llevados a cabo en animales de experimentación, se induce o provoca una condición clínica que produce un síntoma observable. Luego, el animal se trata con la droga para ver si esta es efectiva por eliminación de los síntomas observables.

El desarrollo de antiflamatorios no esteroideos se lleva a cabo provocando inflamación en animales de prueba y luego se aplica la droga y se observa si revierte el proceso inflamatorio.

A menudo se utilizan animales transgénicos para los ensayos *in vivo*. Estos animales son transformados genéticamente. Por ejemplo es posible remplazar genes en un ratón por genes humanos. El ratón produce el receptor o la enzima humana y es posible así probar el compuesto *in vivo* para un determinado blanco terapéutico.

También se pueden alterar los genes de un ratón para que este se vuelva susceptible a una enfermedad en particular (por ejemplo cáncer) . Luego se prueban las drogas para ver si previenen esa enfermedad.

En general existen algunos inconvenientes asociados a los ensayos *in vivo*. Por un lado el ensayo es lento y se deben sacrificar animales. Existen muchos problemas de farmacocinética, y a veces los resultados son difíciles de racionalizar.

Por otro lado, es posible que los síntomas observados puedan ser causados por diferentes mecanismos fisiológicos diferentes al buscado. Por ejemplo muchos fármacos que resultaron ser activos como antiulcerosos en animales no fueron efectivos en la fase clínica.

Por último, se obtienen diferentes resultados dependiendo de la especie animal. Por ejemplo prodrogas de la penicilina metil éster fueron activas en ratones y en ratas pero no se pueden hidrolizar en conejos, perros y humanos.

Ensayos *in vitro*

Estos ensayos no se realizan en animales vivos, sino sobre tejidos, enzimas o células. Se pueden evaluar inhibidores enzimáticos sobre una enzima pura en solución. Así como antagonistas y agonistas de receptores sobre tejidos aislados o células las cuales expresan al receptor en su superficie.

Muchos ensayos *in vitro* se pueden diseñar usando genética molecular donde el gen codifica para una enzima específica o un determinado receptor, se clona y se expresa en una célula de rápida división como una bacteria, levadura o célula tumoral. Por ejemplo la proteasa del HIV se clona y se expresa en la bacteria *Escherichia coli*.

6.1.4. Barrido Farmacológico de Alta Performance (HTS o uHTS).

La robótica y la miniaturización de los ensayos *in vitro* sobre células genéticamente modificadas dio origen al proceso llamado High Throughput Screening (HTS).

Este proceso se refiere al ensayo de un gran número de compuestos frente a un gran número de posibles blancos terapéuticos. En un ensayo típico varios miles de compuestos pueden ser evaluados frente a 30-50 ensayos bioquímicos a la vez. El ensayo conduce a una respuesta fácilmente medible que puede ser detectada y cuantificada automáticamente. Por ejemplo crecimiento celular, cambio en el color producido por una reacción enzimática, etc.

Esta técnica surge de la necesidad de evaluar farmacologicamente el gran número de compuestos obtenido a partir de la combinatoria química.

Si bien muchas estructuras líderes se descubrieron aplicando esta técnica[26], los investigadores se están dando cuenta de que la idea inicial de seleccionar de una colección de compuestos o de librerías de combinatoria de compuestos activos no dió los resultados esperados. Entre los inconvenientes encontrados, la solubilidad limitada de los compuestos, la descomposición de los mismos en las soluciones de almacenamiento, fluorescencia de algunos compuestos o cambio de color, impurezas coloreadas originan falsos positivos o falsos negativos haciendo poco redituable esta metodología.

6.1.5 Combinatoria Química

La combinatoria química es un avance tecnológico de prueba y error para el descubrimiento de nuevos líderes.

La combinatoria química es una forma de producir un gran número de compuestos en corto tiempo, usando una ruta sintética definida con una gran variedad de materiales de partida y reactivos. Generalmente esto se lleva a cabo en muy pequeña escala usando sintones en fase sólida donde el proceso se puede automatizar o semiautomatizar.

Si bien su primera aplicación fue la producción de un gran número de compuestos en pequeñas cantidades, el uso de la combinatoria química se extendió a otros campos de la química.

La química combinatoria se puede llevar a cabo de manera de obtener un único compuesto en cada uno de los frascos de reacción, este proceso se denomina ***síntesis en paralelo***. Es útil en el proceso de *optimización de una droga líder*.

Alternativamente el proceso puede ser diseñado de tal manera que la mezcla de compuestos sea producida en cada frasco de reacción. Esto se usa en el *descubrimiento de nuevos líderes.*

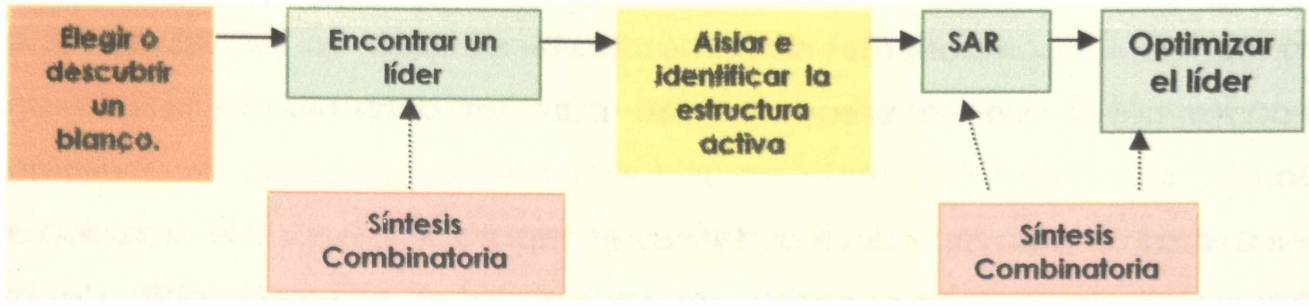


Figura 6. El rol de la síntesis combinatoria en el descubrimiento y optimización de un líder.

Combinatoria Química en la Optimización de un líder

Para llevar a cabo la optimización de un líder se necesita sintetizar un gran número de análogos para luego encontrar una relación estructura- actividad y/o mejorar la actividad del compuesto líder.

La **síntesis combinatoria en paralelo** permite la síntesis rápida de análogos que varían poco estructuralmente con respecto al compuesto líder. A diferencia de la síntesis combinatoria este proceso se caracteriza por que se obtiene un producto por reacción. En la fase de optimización las técnicas de combinatoria química pueden ser usadas al mismo tiempo con el **diseño racional**.

Síntesis combinatoria en el descubrimiento de un nuevo líder.

La síntesis combinatoria a sido mayormente dirigida a encontrar un nuevo líder dentro del descubrimiento de nuevos fármacos.

A partir del conocimiento del genoma humano, numeroso blancos terapéuticos se descubrieron para tratar viejas enfermedades. Con tantos nuevos blancos las compañías farmacéuticas se encontraron con el problema de identificar la función de cada blanco, encontrando un compuesto líder para cada blanco terapéutico y optimizarlo lo más rápido posible.

Cuando en el pasado la finalidad era encontrar un nuevo líder, ahora la finalidad es encontrar una droga para un blanco determinado. Con la ***combinatoria química*** las necesidades de la industria farmacéutica de probar más de un millón de compuestos al año para más de 100 blancos terapéuticos diferentes a fin de encontrar un compuesto líder eficaz y rápidamente estaba cubierta. Si bien la combinatoria química es capaz de producir este número de compuesto, es

importante recordar la importancia de la diversidad estructural para aumentar las posibilidades de encontrar un compuesto líder.

Por otro lado no necesariamente el *ligando perfecto* es un *buen líder* para continuar con su desarrollo.

En esta técnica, los componentes de la mezcla de reacción, no son separados e identificados hasta que un ensayo *in vitro* para un determinado blanco de positivo.

Si se encuentra un ensayo positivo el desafío es separar la mezcla de reacción e identificar cuál de los componentes de la mezcla es el responsable de la actividad.

De todos modos hay una economía de esfuerzos cuando un resultado da negativo para una mezcla de 100 compuestos ya que se evita la síntesis, purificación, e identificación de cada uno de los componentes de la mezcla.

La combinatoria química no es más que un avance tecnológico de prueba y error para el descubrimiento de nuevos líderes.

6.1.6 Aproximación Racional

Además de los productos naturales derivados de plantas; los neurotransmisores endógenos y las hormonas esteroideas han sido la fuente más rica de nuevos fármacos.

La época de oro del descubrimiento de nuevas drogas.

Para la elucidación del mecanismo bioquímico fundamentalmente en la transmisión de impulsos nerviosos, y el conocimiento del efecto de las hormonas se utilizaron un gran número de fármacos de uso clínico que interaccionaban con receptores teniendo efectos agonistas o antagonistas. Esta fase del descubrimiento de nuevas drogas ha sido considerada por muchos autores como la"*época de oro*" en el período 1950-1960. Actualmente muchos de estos fármacos se continúan usando. [27, 28, 29,30]

Difenhidramina utilizada en la cinetosis fue descubierta en 1947 por azar. La potencia de neurotransmisores agonistas y antagonistas de receptores 5-HT ha sido explotada al igual que la acción de muchas hormonas esteroideas y sus análogos.

Actualmente muchos inhibidores enzimáticos se desarrollaron a partir de compuestos que mimetizan el estado de transición de enzimas, entre ellos inhibidores de proteasas que, al haberse sustituido el grupo amida por otro grupo funcional dio origen a los peptidomiméticos. [31]

- **Optimización de una estructura líder**

La **optimización** de una estructura líder es un proceso dinámico (evolutivo), en el cuál cada modificación estructural esta asociada a una disminución o aumento en alguna de las propiedades y conduce a un nuevo análogo, que es nuevamente optimizado hasta que se obtiene el candidato final, que posee las propiedades deseadas. Los resultados en este tema muestran que casi siempre las nuevas drogas, terminan siendo más lipofílicas y de mayor peso molecular luego de este proceso.[32, 33, 34, 35, 36, 37, 38] Sin embargo, existen ejemplos en donde a partir de moléculas estructuralmente complejas, derivadas de productos naturales como morfina, quinina, alcaloides del curare, se pueden obtener análogos estructuralmente más simples, biológicamente activos.

Aquí también es válido aplicar, al igual que para las características de un líder, la "*regla de cinco*" de Lipinski (Ver Sección 3 de este Anexo).

Las propiedades de las moléculas candidatas a ser usadas clínicamente han sido muy estudiadas. Pueden existir excepciones con respecto a las definiciones empíricas de las propiedades estructurales de un líder, y en casos especiales hasta "malos" líderes pueden ser exitosamente optimizados para la obtención de drogas de gran valor.

- **Desarrollo de compuestos "semejantes a"**

Esta metodología también es conocida como "me too". Se basa en copiar compuestos ya existentes con probada acción farmacológica y realizar una mínima variación estructural.

Existen muchos ejemplos que demuestran que se puede mejorar la biodiponibilidad, y ampliar el espectro de acción desarrollando análogos de compuestos ya existentes.[39,40,41] Muchas veces una segunda droga que aparece en el mercado tiene ventajas terapéuticas que la pone en primer lugar Ejemplos de estos casos son la ranitidina vs cimetidina o enalapril vs captopril, en este último el antihipertensivo captopril fue usado por varias compañías farmacéuticas para producir su propio antihipertensivo. En la Figura 7 se pueden observar las modificaciones estructurales realizadas.

La idea es modificar la estructura lo suficiente, como para evitar restricciones con patentes, retener la actividad, e idealmente incrementar las propiedades terapéuticas.

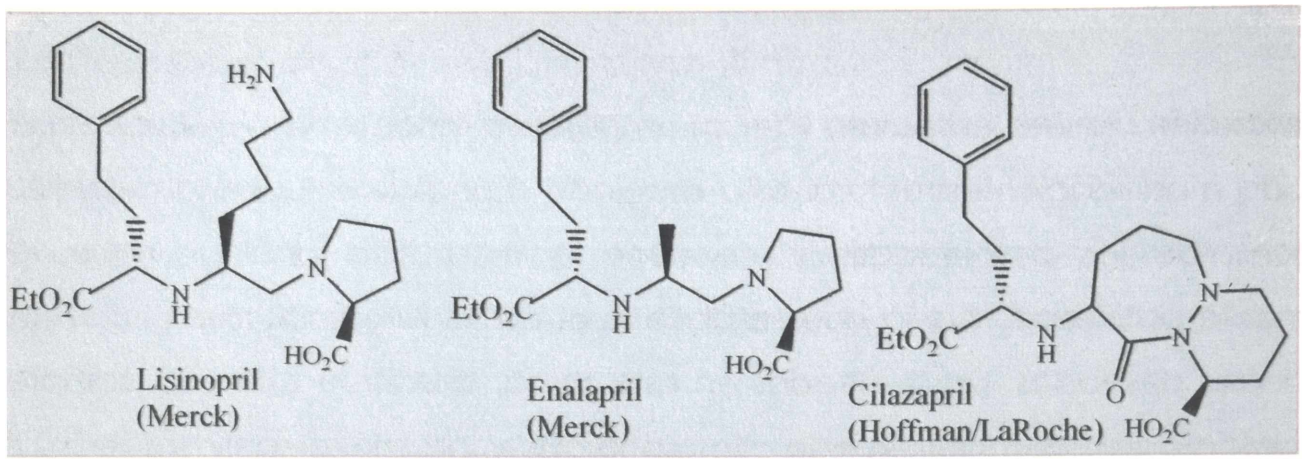


Figura 7. Ejemplo de compuestos ¨ semejantes a¨.

- **De péptidos a peptidomiméticos**

Peptidomimético: Transformación de un péptido en un ligando no peptídico con igual acción que este.

A la hora de diseñar peptodomiméticos es de gran utilidad conocer de los péptidos su biosíntesis, el transporte, inactivación e eliminación.[42]

Los péptidos son compuestos de gran interés dentro de la química medicinal. Muchos sustratos de enzimas como angiotensinógenos, angiotensina, fibrinogeno, HIV GAG y GAG-pol (precursores de la proteasa del HIV y otras proteínas del HIV) y muchas enzimas de ligando-receptores como neuroquininas, encefalinas, somastotatinas, etc., son péptidos o proteínas. Los péptidos pequeños representan un punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos, especialmente por que se facilita su farmacocinética al tener bajo peso molecular, y en general no pierden las propiedades necesarias para el reconocimiento fármaco-receptor.[43] Sin embargo, los péptidos, incluso los pequeños, tienen limitaciones al ser utilizados como fármacos, ya que sufren proteólisis por parte de las peptidadas en el tracto gastrointestinal o en el sistema circulatorio, sufren excreción rápida a través del hígado o riñón. Los peptidomiméticos son moléculas que al disminuirles el carácter peptídico mediante modificaciones estructurales, logran características fisicoquímicas y fisiológicas más deseables con respecto a los péptidos. Poseen semejanza con el péptido ya que al unirse al receptor son capaces de imitar o inhibir el efecto que ocasionaría este último.

Para el desarrollo de peptidomiméticos de naturaleza peptídica los ligandos endógenos generalmente sirven como estructuras líderes.

Algunas de las estrategias utilizadas para el desarrollo de peptidomiméticos son la modificación del enlace peptídico por grupos isosteros, o la utilización de grupos miméticos del grupo amida que han sido muy importante en el desarrollo de

inhibidores enzimáticos. Entre los grupos utilizados se encuentran: -CH_2NH- (amino metileno), -CH=CH- (E- alquenos); y HN-CO (retroinverso).

El termino retroinversopeptido se refiere a la inversión de la secuencia de aminoácidos en la cadena peptídica, se invierte también la quiralidad de los estereocentros (Figura 8), esto favorece a la estabilidad frente a proteasas.retroinversopéptidos y péptidos cíclicos. De esta manera se mejora la estabilidad metabólica del péptido, por reducción de la velocidad de degradación por peptidasas y otras enzimas hidrolíticas.

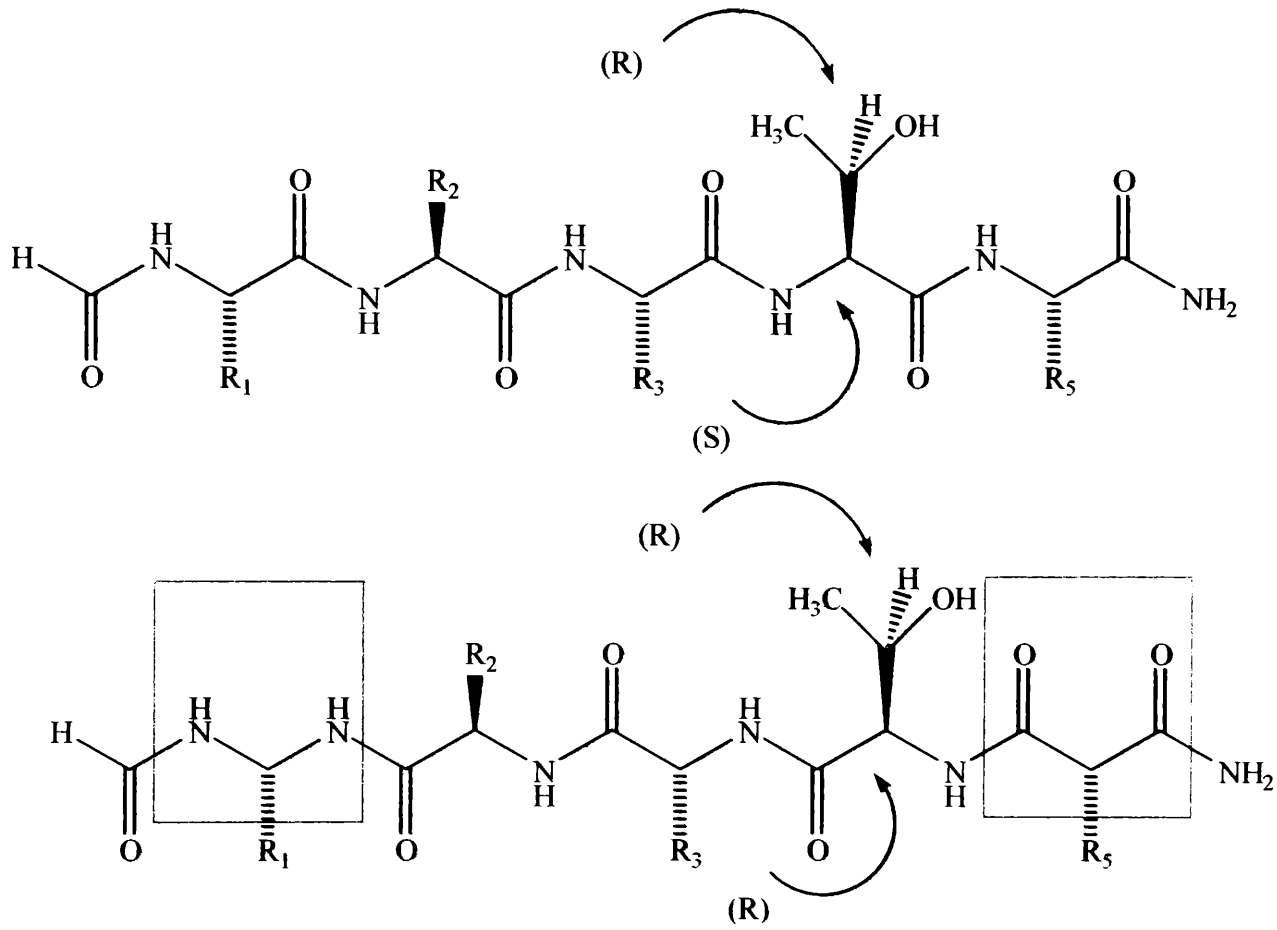


Figura 8. Ejemplo de retroinversopéptido que conduce a un compuesto estable frente a proteasas.

El cambio de un grupo amida por -CH_2NH- ha dado lugar al desarrollo de agonistas de receptores de somatostatina[44] entre otros. La función urea y sulfamida también ha sido utilizada como grupo funcional no hidrolizable para conectar aminoácidos, por ejemplo en la obtención de inhibidores de la HIV proteasa [45,46, 47], o de otras proteasas.[48]

Otros ejemplos de peptidomiméticos lo constituyen los derivados de endorfinas, encefalinas, substancia P, angiotensinas, endotelinas, gonadotrofinas, entre otros.[49]

- **Optimización de efectos secundarios**

Algunos fármacos muestran además del mecanismo principal de acción, algunos efectos secundarios. Muchos de los fármacos que hasta hoy se usan resultaron de la optimización de sus efectos secundarios.

La optimización selectiva de los efectos secundarios (SOSA) es una estrategia general, utilizada en la actualidad, para el descubrimiento de nuevos líderes. [50]

Ejemplo de optimización de efectos secundarios son las sulfonamidas diuréticas que surgieron de la optimización de los efectos secundarios de antibacterianos. Los efectos antidiabéticos e hipoglucemiantes también se desarrollaron a partir de sulfonamidas líderes antibacterianas.

Compuestos antitusivos surgieron de la estructura de la morfina optimizada para evitar efectos narcóticos.

De una variación estructural mínima se pueden obtener diferentes mecanismos de acción y aplicaciones terapéuticas totalmente diferentes.

El ácido acetilsalicílico fue usado por más de un siglo como analgésico y antipirético hasta que su mecanismo de acción fue descubierto. Hoy se sabe que es un inhibidor irreversible de ciclooxigenasas, y es usado en la profilaxis de desordenes y enfermedades trombóticas.

Otro ejemplo reciente es el sildenafil (Viagra) utilizado actualmente para el tratamiento de la disfunción eréctil. En un principio esta droga se desarrollo como un antialérgico, antihipertensivo, y anti-angina. En un estudio de tolerancia en hombres se descubrió su actual aplicación clínica, habiendo sido esta un importante efecto secundario. [51]

Algunos compuestos pertenecen al grupo de las llamadas ¨estructuras privilegiadas¨ que son estructuras bases sobre las cuáles se plantean diferentes modificaciones, precursoras de fármacos con diferentes actividades (Figura 9). Ejemplos de estas estructuras son las benzodiacepinas que pueden ser tranquilizantes (agonistas de receptores del GABA), antagonistas de receptores del GABA y agonistas inversos, agonistas de receptores opioides, antagonistas de receptores de vasopresina e integrinas, moduladores de canales de potasio, relajantes musculares, hipnóticos y neurolépticos.

Otras estructuras bases sobre las que se pueden plantaer modificaciones estructurales son las hidantoínas, β-lactamas y piridinas.

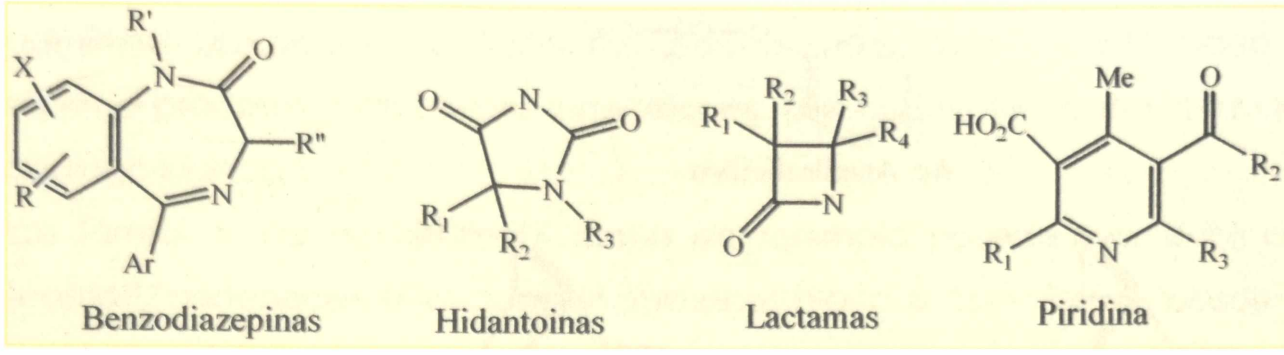


Figura 9. Ejemplos de "estructuras privilegiadas " las cuales pueden dar lugar a numerosos derivados por diferentes sustituciones.

- **Profármacos y fármacos blandos.**

El término profármaco fue introducido por primera vez en 1958 por Adrien Albert.[52]

Los profármacos son compuestos que no poseen actividad por si mismos pero se convierten en compuestos activos una vez en el organismo. Se puede definir a un profármaco como un fármaco unido a un grupo modulador lábil, que requiere ser transformado dentro del organismo por un proceso químico o enzimático para manifestar su efecto.

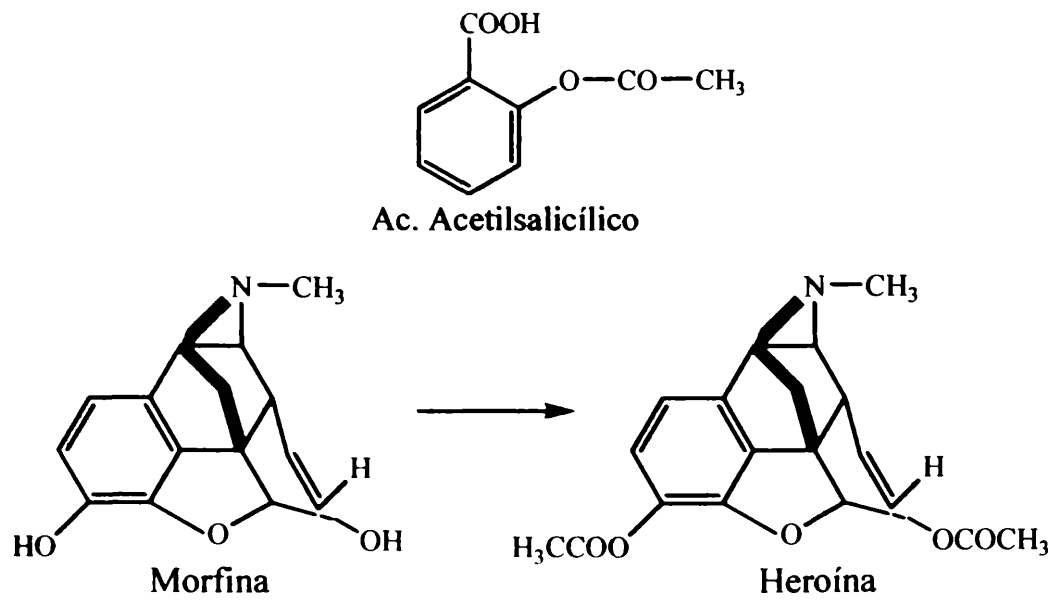
Esta estrategia es útil para optimizar compuestos que presentan problemas de toxicidad, farmacocinética, o problemas de formulación y administración.

Por ejemplo aquellos fármacos con una pobre biodisponibilidad son buenos candidatos para convertirlos en profármacos. También son útiles para resolver problemas como baja solubilidad, pobre permeabilidad de membranas, mal sabor, corta duración de acción, inestabilidad química.[53]

Un profármaco ideal debe reunir las siguientes características:

1. Ser totalmente inactivo
2. La unión del fármaco con el grupo modulador debe ser covalente
3. Su bioactivación debe ser más rápida que otras posibles reacciones metabólicas y que su eliminación.
4. Ni el profármaco, ni el grupo modulador deben ser tóxicos ni conducir a metabolitos tóxicos una vez liberados. Es preferible que su bioactivación sea hidrolítica y no hepática.

Uno de los primeros ejemplos de profármacos son el ácido acetilsalicílico y la heroína, el acetil derivado de la morfina.



La baja de solubilidad en agua de los fármacos es un factor importante que limita la biodisponibilidad oral, parenteral y percutánea. En estos casos el uso de profármacos a servido de estrategia para incrementar la farmacocinética. Para ello se han usado grupos moduladores cargados como por ejemplo ésteres de fosfatos, hemisuccimidatos grupos aminoacilconjugados, y dimetilaminoacetatos o grupos neutros como polietilenglicol (PEG) Figura 10.

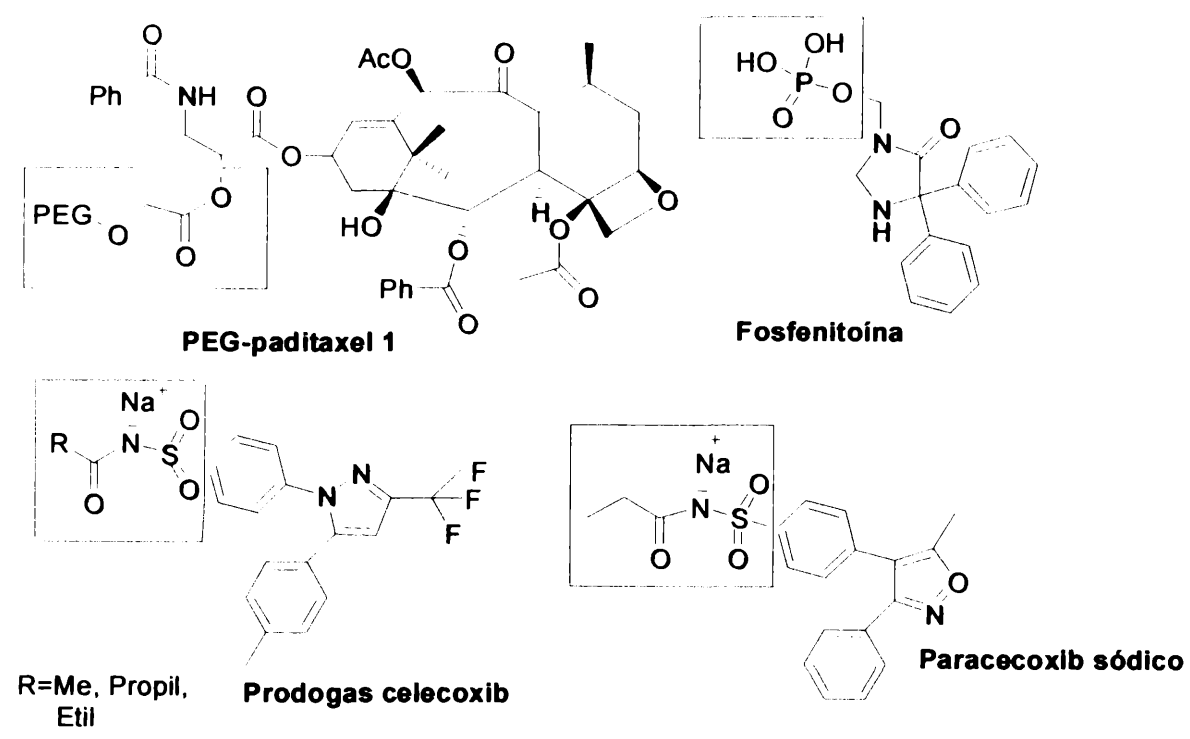


Figura 10. Ejemplo de profármacos que se prepararon para incrementar la solubilidad en agua de los respectivos fármacos.[54]

Fármacos Blandos

Los fármacos blandos son análogos activos de un compuesto líder que se desactivan de manera predecible y controlada luego de haber ejercido su efecto terapéutico.[55]

Si un fármaco genera metabolitos que retengan su actividad o la supere la administración de uno de dichos metabolitos como sustituto del fármaco original suprime procesos metabólicos innecesarios, por lo que se puede considerar un análogo blando.[56]

Los fármacos de acción local como por ejemplo para la piel (tópicos), ojos (colirios), pertenecen a la clase de fármacos blandos. Estos fármacos son activos a nivel local pero a nivel sistémico se inactivan. Un ejemplo lo es el antiflamatorio de uso tópico butil fluorocotin, éster del metabolito inactivo fluorocortolona[57] (Figura 11).

Muchos neurotransmisores tienen un comportamiento análogo al que se pretende con un fármaco blando. Su actividad es potente y muy corta debido a su extrema labilidad, y son inactivados rápidamente tras su liberación. Puede decirse que fármacos blandos es más un concepto que una metodología de aplicación. El investigador en Química Medicinal busca que los fármacos que diseña cumplan con este requisito, no siempre alcanzado.

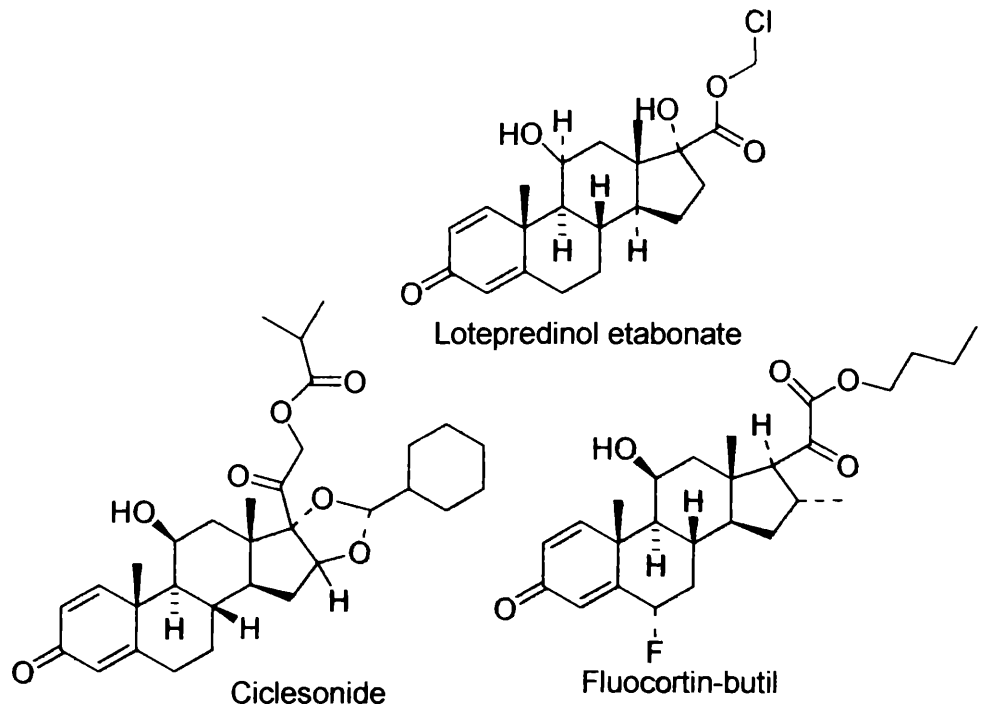


Figura 11.Ejemplo de fármacos blandos antiflamatorios.

- **Enantiómeros y compuestos quirales**

En el pasado los compuestos quirales se desarrollaban como racematos o mezclas diasteroméricas.

Aproximadamente hace 20 años el farmacólogo Ariëns cuestionó a los racematos y los definió como compuestos con un 50% de impurezas.[58]

Así fue como la industria farmacéutica comenzó a tomar conciencia de que la imagen especular de un compuesto quiral tiene diferente actividad biológica. Por ejemplo algunos barbitúricos quirales son sedativos, mientras que su enantiómero

causa convulsiones. Algunos análogos sintéticos de la morfina son fuertes analgésicos mientras que su enántiómero es un antitusivo.
En el caso de ibuprofeno, el enantiómero R-(-) es convertido metabolicamente en el enantiomero biológicamente activo S-(+) pero no en la dirección contraria.
En la última década las compañías farmacéuticas, impulsadas por las instituciones que controlan los medicamentos, lograron nuevas patentes de compuestos quirales puros, basados en que la acción farmacológica está vinculada a la quiralidad de la molécula. Estos cambios son interpretados como una prolongación de medicamentos viejos, pues lo que se hizo fue la separación de la mezcla racémica.[59]
Ejemplos de esta estrategia son: dexfenfluramina, dexibuprofeno, dextoprofeno, levofloxacina, levalbuterol, levobupivacaina, esomeprazole levocetirizine, escitalopram.

- **Metabolitos activos: rescatando malos líderes**

No deben dejarse de lado compuestos que perfilaban como poderosos fármacos, pero estos no lograron superar ni por optimización ni por transformación en profármacos, su actividad ni sus efectos adversos.
Estas limitaciones pueden ser superadas si se llega a comprender el mecanismo bioquímico en el cuál se encuentran involucrados.El estudio de sus metabolitos puede ser el método que de origen a un nuevo fármaco. Ejemplos que ilustran esta estrategia son: dopamia, fenacetin, terfenadina, y zanamivir.

•Diseño Racional asistido por computadoras.

Química computacional

La Química computacional es una disciplina relativamente nueva, su advenimiento y popularidad creció paralelamente a las mejoras en el poder computacional durante las últimas décadas. Es una herramienta esencial en la química medicinal moderna y es importante tanto para el descubrimiento de un nuevo líder como para su desarrollo.[60]
A semejanza de otras disciplinas en química, la química computacional usa herramientas para comprender reacciones químicas y procesos.
Las herramientas computacionales (programas o algorítmos) se basan en información empírica. Para usar estas herramientas, uno necesita entender como está implementada la técnica y la naturaleza de los datos usados en el método.

Se usa este conocimiento para determinar la herramienta más apropiada para una investigación específica y se definen los límites de confianza en los resultados.

•Farmacóforo.

Este método fue el aplicado para el diseño de las estructuras presentadas en la presente Tesis.
Cuando no se conoce la estructura tridimensional del sitio activo en el receptor el farmacóforo se identifica basado en la comparación de compuestos activos que manifiestan la misma respuesta biológica (método indirecto).
Idealmente se debe conocer la conformación activa y los grupos de unión receptor de los compuestos estudiados.
Pasos a seguir:

- Primero se seleccionan las estructuras que se sabe actúan por el mismo mecanismo de acción o igual respuesta a un test determinado.

- Se calcula por metodologías de análisis conformacional la conformación más estable de cada una de las estructuras.

- Se estudian las características 3D de los compuestos activos y se determinan las características comunes a todos empleando técnicas de superposición gráfica o analítica, lo que permite obtener los requerimientos estructurales, lipofílicos y electrónicos comunes a la serie estudiada, generando así *patrón farmacofórico.*

•Identificación de un farmacóforo 3 D

El farmacóforo representa los requerimientos estructurales, lipofílicos y electrónicos responsables de la unión ligando-receptor. El farmacóforo 3 D, para un determinado sitio activo, surge de los requisitos comunes de todos los ligandos que interaccionen con este sitio activo. Una vez que el farmacóforo ha sido identificado, las nuevas estructuras deben ser analizadas para ver si pueden adoptar la conformación activa requerida por el farmacóforo. Si es así (y si no existen impedimentos estéricos con el sitio receptor) las moléculas diseñadas en base a este farmacóforo, son predichas como activas, lo cuál se confirmará o rechazará, de acuerdo a la actividad biológica determinada.

- **QSAR y QSAR 3D: CoMFA**

Existen muchos ejemplos de la aplicación de métodos QSAR (Relación Cuantitativa Estructura Actividad) y 3D-QSAR para la obtención de nuevos fármacos. [61]

La metodología 3D-QSAR permite obtener un farmacóforo tridimensional a partir de descriptores moleculares en tres dimensiones.[62,63, 64]

Existen varias metodologías para el estudio 3D-QSAR pero la más utilizada es la metodología CoMFA (Comparative Molecular Fields Análisis: Análisis Comparativo de Campos Moleculares).[65] La metodología 3D-QSAR CoMFA mide la similaridad molecular en tres dimensiones. La filosofía de la metodología 3D-QSAR CoMFA se basa en que las propiedades más importantes de una molécula su tamaño y forma global (campos estéricos) y sus propiedades electrónicas (campos electrostáticos) pueden ser cuantificados. (Anexo 8) En este método QSAR se analizan los datos usando un método estadístico llamado PLS (Partial Least Square; Cuadrados Parciales Mínimos), dando como resultado final gráficos moleculares.

Otra alternativa es el uso de modelos QSAR combinados para el modelado de nuevos compuestos. Esta metodología combina varios métodos de optimización así como diferentes tipos de descriptores e incluye rigurosos y consistentes modelos de validación.[66]

- **Evaluaciones Virtuales (Screening virtual)**

En la química medicinal tradicionalmente el descubrimiento de un nuevo fármaco por lo general comienza a partir del conocimiento de un compuesto líder.

Se calcula que por cada 10000 nuevas moléculas sólo una tendrá la posibilidad de convertirse en un nuevo líder.

En la actualidad, con la aparición de la química combinatoria y barrido farmacológico de alta performance (HTS), esta proporción cambió de cientos de miles a millones de compuestos a evaluar para encontrar un nuevo fármaco. Muchas veces no es posible encontrar, usando HTS, un compuesto que interaccione con el sitio activo y entonces este receptor se llama *"non –druggable target"*.

Aún en los casos en que HTS sea positivo no siempre es posible confirmar la unión droga-receptor y validar su actividad biológica y la de análogos relacionados con el objeto de confirmar que realmente nos encontramos frente a un nuevo líder.[67, 68]

El ***screening virtual*** es una herramienta con métodos que permiten seleccionar los candidatos apropiados a fin de enriquecer colecciones de compuestos o librerías de combinatoria con candidatos promisorios.[69,70, 71]

Como los datos de entrada de estos métodos son estructuras químicas y datos de propiedades de estas estructuras, el ***screening virtual*** se puede aplicar a **librerías virtuales** de cualquier tamaño. Lo más importante es el pre-tratamiento adecuado de las bases de datos. Se deben sacar a los duplicados, definir correctamente el estado de protonación usando un conjunto de reglas, y definir de entre todos los tautómeros cuál es el más adecuado. En los casos del uso de la búsqueda por **similaridad**, lo más importante es la superposición de las moléculas, la búsqueda de un farmacóforo y uso de técnicas de docking, y la definición correcta de las propiedades de donores y aceptores de electrones.

Se aplica la "regla de los cinco" de Lipinski[72] para que los compuestos sean biodisponibles en forma oral en la identificación de compuestos "similares a". [73]

Otro método de screening virtual fue el derivado de encontrar "***hits frecuentes***", moléculas que resultan ser activas en diferentes bioensayos.[74]

Los filtros de citotoxicidad, toxicidad, mutagénesis y carcinogénesis deben ser empleados con extremo cuidado ya que si se usan muchos filtros estos pueden eliminar demasiados falsos positivos (ej: moléculas no tóxicas consideradas tóxicas), y segundo, la mayoría de estos filtros tienen predictividad en los conjuntos de prueba y pueden provocar un cambio en la predicción.

Los **árboles de caracterizaciones** [75]son aproximaciones extremadamente rápidas que se usan para la comparación de moléculas, son especialmente útiles para la evaluación de los resultados obtenidos de un screening de la búsqueda en grandes librerías virtuales. Para una comparación y superposición más precisa se usan programas como el **FlexS**.[76]

Otro programa que genera hipótesis de farmacóforo y busca en base de datos 3D es el **CATALYST**[77].

6.2 Métodos Directos: Metodologías de diseño basadas en el conocimiento del sitio receptor

Es la situación ideal pero no la más común. Los métodos directos se basan en el conocimiento de las características del receptor, es decir se conoce la estructura tridimensional del receptor y localiza el sitio activo.

- Estos datos se pueden obtener por ejemplo, por cocristalización del ligando unido a la macromolécula y posterior uso de difracción por Rayos X del cristal.[78] Se puede estudiar así la estructura del complejo ligando-receptor por métodos computacionales e identificar la conformación del ligando.

- Existen bases de datos por ejemplo: Protein Data Bank (PDB)* donde se encuentran depositadas las coordenadas 3D de 22823 proteínas (1 de Agosto de 2003)[79], complejos ligando proteínas, ácidos nucléicos, y otras macromoléculas biológicas. Estas se obtienen de los datos de Rayos X del sitio activo del receptor y el ligando.

- No todas las proteínas se pueden cristalizar fácilmente, como ocurre con las proteínas de membranas. Si no se cuenta con los datos de Rayos X del receptor ni del sitio activo, se puede construir un modelo del receptor. Para ello necesitamos conocer la secuencia aminoacídica de la proteína en 2D y la estructura terciaria de una proteína relacionada. Con estos datos podemos construir un modelo del receptor mediante la técnica de ***Modelado por Homología***[80]. Esta técnica consiste básicamente en comparar la secuencia de la proteína en cuestión con las secuencias de otras proteínas con el fin de encontrar alguna que esté estrechamente relacionada. Luego se construye el esqueleto peptídico de la proteína en estudio de manera que concuerde con el de la proteína modelo, y a continuación se agregan las cadenas laterales en conformación energéticamente favorable. Posteriormente se realiza una minimización de la energía y la estructura se refina mediante dinámica molecular. Así se relajan las tensiones generadas en los puntos de unión.

  Una vez construido el modelo se puede evaluar experimentalmente. Por ejemplo el modelo podría mostrar que ciertos aminoácidos son

*sitio web: http://www.rcbs.org/pdb/

importantes en el sitio activo. Estos podrían mutarse y observar si aparece algún cambio en la capacidad de unión de los ligandos.

- Una vez que se tiene la *estructura 3D del receptor,* utilizando programas que buscan en bases de datos, se buscan ligandos que encastren en la cavidad del sitio activo por complementariedad geométrica. Esta técnica se denomina ***Docking***.[81,82,83] El procedimiento de *Docking* consiste en enfrentar los grupos involucrados en la interacción droga-sitio activo.
  Así se definen distancias de unión óptimas y por último se optimiza el ligando en el entorno del receptor.

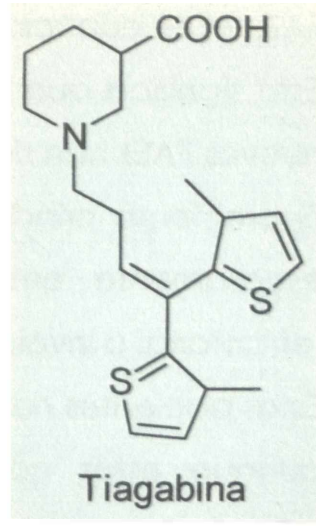
- Otros programas generan la estructura de un ligando a partir de un segmento inicial que interacciona con el sitio activo. Luego agregan distintos fragmentos a este segmento hasta obtener al ligando completo dentro del sitio activo (***GROW***). [84, 85]

- Los métodos más recientes de diseño llamados "***de novo***" (LUDI)[86,87,88] buscan ligandos totalmente novedosos que interaccionen con el sitio activo.

7. Estrategias utilizadas en el desarrollo de Nuevos Fármacos Antiepilépticos.

Dentro del campo del desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos la principal meta en el pasado era el desarrollo de fármacos con mayor eficacia anticonvulsiva y con menos efectos adversos que los FAEs existentes. [89]
La mayoría de los FAEs de uso clínico fueron descubiertos por **screening** (por ejemplo ***serendipity***), o por **variación estructural** de drogas conocidas y no por estrategias racionales haciendo uso de los procesos fisiopatologicos involucrados en las crisis convulsivas o la epilepsia.

Las únicas drogas descubiertas por **diseño racional** fueron aquellas que mimetizan al GABA, ***Vigabatrin y Tiagabina*** cuyo desarrollo se fundamentó en la "hipótesis GABAérgica de la epilepsia". Esta se basaba en la idea de que la disminución de la neurotransmisión GABAérgica es crítica en el desarrollo de la patogénesis de varios tipos de epilepsia.
Otras estrategias basadas en el *diseño racional* de nuevos FAEs, por ejemplo las basadas en la hipótesis del glutamato no fueron fructíferas. Habiendo amplias evidencias de que la

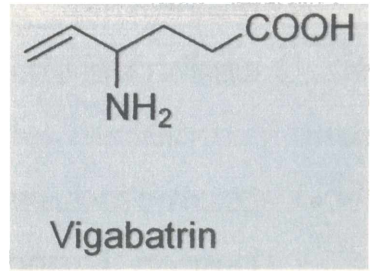


Tiagabina

actividad incrementada de la neurotransmisión glutaminégica contribuía a varios tipos de epilepsia[90], el desarrollo de drogas antagonistas del receptor N-metilaspartato (NMDA), un subtipo de receptor para glutamato, mostraron actividad imprecisa y muchos efectos adversos.

Con excepción de los bromuros y el fenobarbital todos los FAEs clásicos y de segunda generación fueron determinados en **modelos animales** de laboratorio frente a MES test y el PTZ test. [Ver Anexo 5]

Por lo tanto en el desarrollo de nuevos FAEs, es de crucial importancia el modelo animal que se seleccione para su evaluación. Sin embargo el hecho de que los modelos preclínicos usados para el desarrollo e identificación de nuevos FAEs ha sido originalmente validado por el desarrollo de FAEs antiguos explica por que ninguno de los nuevos FAEs poseen ventajas significativas en eficacia y toxicidad comparado con los viejos. [91]



Una de las lecciones que se debe aprender del uso de estrategias racionales para el desarrollo de nuevas drogas antiepilépticas, es que la búsqueda de un blanco terapéutico cada vez más selectivo y absoluto tal vez, no sea deseable en una enfermedad multifactorial como lo es la epilepsia.[92] La mayoría de los FAEs de uso clínico actúan por más de un mecanismo de acción. Por lo tanto una "combinación racional de mecanismos" en una única droga sería útil y se podría llevar a cabo utilizando por ejemplo **combinatoria química.**

El desarrollo de "blancos inversos" en los cuales los fármacos anticonvulsivos con mecanismos conocidos no sean efectivos, también puede ser una estrategia interesante para el futuro.

8. Estrategias en el desarrollo de drogas para la epilepsia farmacorresistente.

Sólo un porcentaje muy pequeño de los pacientes refractarios (5%) a los viejos FAEs logró controlar las crisis con los nuevos FAEs. [93]

Esto significa que ni las viejas ni nuevas estrategias utilizadas en el desarrollo de nuevos FAEs han sido útiles para el tratamiento de pacientes farmacorresistentes.

El problema principal se basa en que el mecanismo de la refractariedad esta escasamente entendido[94]. Existen muchas posibles causas de la epilepsia refractaria, e involucra procesos multifactoriales. [95]

Estos pacientes no controlan sus episodios con ninguno de los fármacos existentes, aunque estos actúen por diferentes mecanismos. Dentro de los pacientes refractarios el 60% sufre de convulsiones parciales.[96]

Se postula que debe haber mecanismos por los cuáles algunos pacientes son más resistentes al tratamiento que otros.

La resistencia a los fármacos no sólo se da en pacientes con epilepsia sino que también se observa en otras enfermedades como cáncer y artritis. Uno de los mecanismos en el cual se postula, que se origina la resistencia es el basado en el transporte de las drogas a través de la barrera hematoencefálica, que también se observa en pacientes con cáncer resistente al tratamiento.[97] Una de las estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos para pacientes refractarios sería diseñar FAEs que no sean blancos de los mecanismos que expresan resistencia en el cerebro.

Algunos de los mecanismos asociados a la farmacorresistencias son el transporte de membranas como el de la glicoproteína-P (PGP), o la asociada a la familia de proteínas resistentes a múltiples drogas (MRPs), que se sabe se encuentran en tejidos de células cancerosas y en tejidos normales de células capilares endoteliales de la barrera hematoencefálica.[98]

Como existe una sobre expresión (genes que codifican para proteínas transportadoras de drogas) de estos transportadores de drogas en pacientes con epilepsia farmacorresistente, es de interés conocer cuales son los FAEs que actúan sobre PGP y MRPs.

Estrategias útiles:

- Administración sistémica o localizada de inhibidores de estos transportadores de drogas (PGP y MRPs)
- Diseño de nuevos FAEs que no sean sustrato de estos transportadores.

Algunos inhibidores de PGP y MRPs se probaron en pacientes con cáncer y podrían ser útiles en pacientes con epilepsia farmacorresistente.[99]

Referencias

[1] Roberts, R.M.Serendipity. *Accidental Discoveries in Science,* **1989**. John Wiley & Sons, New York.

[2] P. W. Erhardt, Medicinal chemistry in the new millennium. A glance into the future, *Pure Appl. Chem*. **2002**, *74*, 703-785.

[3] R. Lahana, How many leads from HTS? *Drug Discov. today* .**1999**, 4, 447-448.

[4] A. L. Hopkins and C. R. Groom, *Nature Rev. Drug Discov*. **2002**, *1*, 727-730.

[5] Biotecnología aplicada a la identificación y validación de dianas terapéuticas. GENOMA ESPAÑA/CIBT-FGUAM. Sitio Web: http://www.gen-es.org/

[6] H. Kubinyi, Drug Research: Myths, Hype and Reality, *Nature Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2 (8)*, 665-668.

[7] Teage, S.J.; Davis, A.M.; Leeson, P.D.; Oprea, T. *Angew. Chem.Int.Ed.*; **1999**, *38*, 3743-3748.

[8] Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Domin, B.W.; Feeney, P.J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*; **1997**, *23*, 3-25.

[9] Kubinyi, H. Changing paradigms in drug discovery. Hoja Web: http://www.beilstein-institut.de/bozen2004/proceedings/Kubinyi/Kubinyi.pdf

[10] (a) Eldredgre, N. Life in the balance: Humanity and the biodiversity. Princeton, New Jersey, Princeton, **1998.** (b) Mann, C.C. and Plummer, M.L. Noah's choice: The future of endangered species. New York, **1996,** 302. (c) Myers, N. Securing the fabric of life. *People & the Planet*, **1998**, *7(4)*: 6-9.

[11] Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *Journal of Natural Products*, **2003**, *66 (7)*, 1022-1037.

[12] Balunas, M. J.; Knghorn,A.D.*Life Science*, **2005**, *78*, 431-441.

[13](a)Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *Journal of Natural Products*, **2003**, *66 (7)*,1022-1037. (b) Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *Natural products Report*, **2000**, *17 (3)*, 215-234.

[14] Balunas, M. J.; Kinghorn, A.D.*Life Science*, **2005**, *78*, 431-441.

[15] Samuelsson, G. *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*, 5 th. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, **2004.**

[16] Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *Natural Product Reports*, **2000**, *17(3)*, 215-234.

[17] Avendaño López, M.C. *Introducción a la Química Farmacéutica*, **1993**, McGraw-Hill- Interamericana de España, Madrid.

[18] Wall, M.E.; Wani, M.C.*Journal of Ethnopharmacology*, **1996**, *51 (1-3)*, 239-253.

[19] Heinrich,M.; Teoh, H.L.; *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, *92 (2-3)*, 147-162.

[20] Van Agmael, M.A.; Eggelte, T.A.; van Boxtel, C.J. *Trends in Pharmacological Sciencies*, **1999**, *20 (5)*, 199-205.

[21] Badio, B.; Garraffo, H.M.; Spande, T.F.; Daly, J.W. Epibatidine: Discovery and Definition as a Potent Analgesic and Nicotinic Agonist. *Med. Chem. Res.* **1994**, *4*, 440-448.

[22] Buss, A.D.; Cox, B.; Waigh, R.D. En: *Burger´s Medicinal Chemestry and Drug Discovery*, Abrahem, D.J.Ed., John Willey & Sons, Hoboken, Nj, **2003**, 847-900.

[23] Chang, Z.; Sitachitta, N.; Rossi, J.V.; Roberts, M.A.; Flatt, P.M.; Jia,J.; Sherman, D.H.; Gerwick, W.H. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1356-1367.

[24] Sneader, W. *Drug Prototypes and Their Exploitation*, John Wiley & Sons, Chichester, **1996**.

[25] Kubinyi, H. J. *Receptor Signal Transduct. Res.* **1999**, *19*, 15-39.

[26] Proudfoot, J. R., personal communication (**2003**).

[27] Sneader, W., *Drug Prototypes and Their Exploitation*, John Wiley & Sons, Chichester, **1996**.

[28] Abraham, D. J., Ed. *Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, **2003**.

[29] Burger, A. *A Guide to the Chemical Basis of Drug Design*, John Wiley & Sons, New York, **1983**.

[30] Ryan, J. F., Ed., *The Pharmaceutical Century. Ten Decades of Drug Discovery*, Supplement to ACS Publications, American Chemical Society, Washington, DC, **2000**.

[31]Bergström, C. A. S., Straff o rd, M.,Lazorova, L., Avdeef, A., Luthman, K., H e d s t rom, L., Ed. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4429-4906.

[32] Teague, S. J., Davis, A. M., Leeson, P. D.,and Oprea, T. *Angew. Chem.Int. Ed.*, **1999** *38*, 3743-3748.

[33] Oprea, T. I., Davis, A. M., Teague, S. J.,and Leeson, P. D. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 1308-1316 .

[34] Hann, M. M., Leach, A. R., and Harper G. *J. Chem. Inf. Comput.Sci.* , **2001**, *41*, 856-864.

[35] Carr, R., and Hann, M. *Modern Drug Discov.* **2002**, 45-48.

[36] Oprea, T. I. *J. Comput.-Aided Mol.Design*, **2002**, *16*, 325-334.

[37] Proudfoot, J. R. *Bioorg. Med. Chem.Lett*, **2002**, *12*, 1647-1650.

[38] Rishton, G. M.*Drug Discov. Today* , **2003**, *8*, 86-96.

[39] Schaus, J.M.; Bymaster, F.P.; *Ann. Rep.Med. Chem.*; **1998**, 33, 1-10.

[40] Tobert, J.A. *Nature Rev. Drug. Discov.*, **2003**, *2*, 517-526.

[41] Rotella, D.P. *Nature Rev. Drug. Discov.*, **2002**, *1*, 674-682.

[42] Bernard Testa; Meyer, U. A. *Advances in Drug Research*, **1997**, *Vol. 29.*, Peptidomimetics in Drug Design, 1-66.

[43] Horwell, D.C.; Howson, W.; Ratcliffe, G.S.; Rees, D.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, *3*, 799.

[44] Sasaki, Y.; Murphy, W. A.; Heiman, M.L.; Lance, V.A.; Coy, D.H. *J.Med.Chem.*; **1987**, *30*, 1162-1166.

[45] De Lucca, G.V. Kim, U.T.; Liang, J.; Cordova, B.; Klabe, R.M.; Garber, S.; Reid, C.; Seitz, S.T. *Bioorg. Med . Chem. Lett.*, **1998**, *41*, 2411.

[46] Lam, P. Y. S., Jadhav, P. K., Eyermann, C.J., Hodge, C. N., Ru, Y., Bacheler, L. T., Meek, J. L., Otto, M. J., Rayner, M. M., Wong, Y. N., Chang, C.-H., Weber, P. C., Jackson, D. A., Sharpe T. R., and Erickson-Viitanen, S. *Science*, **1994**, *263*, 380-384.

[47]Kaltenbach, R. F., Patel, M., Waltermire, R.E., Harris, G. D., Stone, B. R., Klabe, R. M., Garber, S., Bacheler, L. T., Cordova,B. C., Logue, K., Wright, M. R., Erickson-Viitanen, S., and Trainor, G. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 605-8.

[48] Dougherty, J.M.; Probs, D.A.; Robinson, R.E.; Moore, J.D.; Klein, T.A.; Snelgrove, K.A.; Hanson, P.R. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 9781.

[49] Bernard Testa; Meyer, U. A. *Advances in Drug Research*, **1997**, *Vol. 29.*, Peptidomimetics in Drug Design, 1-66.

[50] Wermuth, C. G., The "SOSA" approach:an alternative to high-thro u g h p u t screening, *Med. Chem. Res.* **2001**, *10*, 431-439.

[51] Kling, J. *Modern Drug Discov.* **1998**, 31-38.

[52] Albert, A. *Nature* **1958**, *182*, 421-422.

[53] Stella, V. J.; Charman, W. N. A.; Naringrekar, V. H. *Drugs*, **1985**, *29*, 455-473.

[54] Ettmayer, P. ; Amidon, G.L.; Clement, B.; Testa, B. *Journal of Med. Chem.*, ***2004***, *47 (10)*, 1-12.

[55] Bodor, N. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 58-101.

[56] Avendaño López, M.C. *Introducción a la Química Farmacéutica*, **1993**, McGraw-Hill- Interamericana de España, Madrid.

[57] Herz-Huebner, U.; Taeuber, U. *Arzneim.-Forsch.* **1977**, *27*, 2226-2229.

[58] Ariëns, E. *J. Eur.J. Clin. Pharmacol.*, **1984**, *26*, 663-668 .

[59] Agranat, I., Caner, H., and Caldwell, *J.Nature Rev. Drug Discov.*, **2002**, *1*, 753-768.

[60] Manly, C.J.; Louise-May; S.; Hammer, J.D. *Drug Discovery Today*, **2001**, 6 *(21)*, 1101- 1110.

[61] Kubinyi, H. Drug Disc. Today, **1997**, *2 (12)*, 538.

[62] Bradley, E. K.; Beroza, P.; Penzotti, J. E.; Grootenhuis, P. D. J.; Spellmeyer, D. C.; Miller, J. L. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2770-2774.

[63] McGregor, M. J.; Muskal, S. M. Pharmacophore Fingerprinting. 1. *J. Chem. Inf.*

Comput. Sci. **1999**, *39*, 569-574.

[64] Mason, J. S.; Morize, I.; Menard, I. R.; Cheney, D. L.; Hulme, C.; Labaudiniere, R. F. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3251-3264.

[65] Cramer, R.D.; Patterson, D.E.; Bunce, J.D. *J. Am. Chem. Soc. 110,* **1988**, 5959-5967.

[66] Cerqueira Lima, P. ; Golbraikh, A.; Oloff, S.; Xiao, Y.; Tropsha, A.*J. Chem. Inf. Model.*, **2006**, *Vol. 46, No. 3,* 1253.

[67] Bischofberger, N., Chen, M. S., Mendel,D. B., Tai, C. Y., Laver, W. G., Kubinyi, H. *Curr. Drug Discov.*, **2001**, 9-11.

[68] Edward H. Kerns and Li Di. *Drug Discovery Today*, **2003**, *8(7),* 316-323.

[69] Böhm, H.-J., and Schneider, G., Eds., Virtual Screening for Bioactive Molecules *Vol. 10.* de *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Mannhold, R., Kubinyi, H., and Ti m m e rman, H., Eds. Wi l e y - V C H , Weinheim, **2000**.

[70] Klebe, G., Ed. *Persp. Drug Discov. Design* , **2000**, 20, 1-287.

[71] Manly, C.J.; Louise-May; S.; Hammer, J.D. *Drug Discovery Today*, **2001**, *6 (21)*, 1101- 1110.

[72] Lipinski, C. A., Lombardo F., Dominy, B. W.,and Feeney, P. J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25

[73] Walters, W. P., and Murcko, M. A. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 255- 271.

[74] Roche, O., Schneider, P., Zuegge, J., Guba, W., Kansy, M., Alanine, A., Bleicher, K., Danel, F., Gutknecht, E.-M., Rogers-Evans, M., Neidhart, W., Stalder, H., Dillon, M., Sjögren, E., Fotouhi, N., Gillespie, P., Goodnow, R., Harris, W., Jones, P., Taniguchi, M., Tsujii, S., von der Saal, W., Zimmermann, G., and Schneider, G. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 137-142.

[75] C. Lemmen and T. Lengauer. *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **2000**, *14*, 215-232. www. b i o s o l v e i t . d e ; www.tripos.com.

[76] C. Lemmen and T. Lengauer. *J.Comput.-Aided Mol. Design*, **2000**, *14*, 215-232; www. biosol veit.d e ; www.tripos.com.

[77] Kubinyi, H. *Curr. Drug Discov.*, **2001**, 9-11.

[78] Balbes, L.M.; Mascarella, S.W.; Boyd, D.B. Chapter 7: *A perspective of Modern Methods in Computer Aided Drug Design* En: Lipkowitz, K.B.; Boyd, D.B.(Eds.) *Reviews in Computational Chemestry*, Vol.5, VCH Publishers, Inc., New York, **1994**, 337-379.

[79] Laskowski, R. A., Hutchinson, E. G.,Michie, A. D., Wallace, A. C., Jones, M.L., and Thornton, J. M., PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *2 2*, 488-490 ; w w w. rc s b . o rg/pdb and www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum .

[80] Chapter 13: *Computers in Medicinal Chemistry*.En Patrik G.L.; *Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, New York, **2001**, 319-374.

[81] Schoichet, B.K.; Stroud, R.M.; Santi, D.V.; Kuntz, I.D.; Perry, K.M. *Science*, **1993**, *259*, 1445.

[82] DesJarlais, R.L.; Sheridan, R.P.; Seibel, G.L.; Dixon, J.S.; Kuntz, I.D.; Venkataraghavan, R. *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 722.

[83] Kuntz, I.D. *Science* , **1992**, *257*, 1078.

[84] Moon, J.B.; Howe, W.J. *Tetrahedron Comput. Methodol.*, **1990**, *3*, 681.

[85] Moo, J.B.; Howe, W.J. *Proteins*, **1991**, *11*, 314.

[86] Bohm, H.J. En: Kubinyi, H. (Ed.) *3D QSAR in Drug Design Theory, Methods and Applications*, ESCOM Science Publishers B.V.; Leiden, **1993**, 386.

[87] Böhm, H.-J., The computer pro g r a m LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors, *J. Comput.-Aided Mol. Design.* **1992**, *6*, 61-78.

[88] Böhm, H.-J., LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads, *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **1992**, *6*, 593-606.

[89] Loscher, W., Eur. J. Pharmacol, **1998**, *342*, 1–13.

[90] Dalby, N.O., Mody, I.. *Curr. Opin. Neurol.*, **2001**, *14*, 187–192.

[91] Lo¨ scher, W. *Eur. J. Pharmacol.*, **1998**, *342*, 1–13.

[92] Löscher, W., Schmidt, D.*Epilepsy Res.*, **1994**, *17*, 95–134.

[93] Regesta, G., Tanganelli, P. *Epilepsy Res, .* **1999**, *34*, 109–122.

[94] Kwan, P., Brodie, M.J. *New Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 314–319.

[95] Loscher, W., Potschka, P. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *30*, 7–14.

[96] Regesta, G., Tanganelli, P. *Epilepsy Res.* **1999**, *34*,109–122.

[97] Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, *58*, 931–959.

[98] Tan, B., Piwnica-Worms, D., Ratner, L.*Curr. Opin. Oncol.* **2000**, *12*, 450–458.

[99] Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, *58*, 931–959.

ANEXO 2

Epilepsia: el Objetivo Terapéutico

1. Qué es la epilepsia ?

En el año 400 antes de Cristo (a.C) Hipócrates[1] fue uno de los primeros en hacer referencia sobre esta enfermedad y caracterizar a la *epilepsia* como un *transtorno* del *cerebro*. Con mayor precisión y conocimiento de este fenómeno, producto de los avances médicos y científicos, se denomina ***epilepsia*** a un trastorno en la función cerebral que se caracteriza por el surgimiento repetido e impredecible de convulsiones.[2] Según la Liga Central contra la Epilepsia[3] la define como:"*Síndrome cerebral crónico caracterizado por crisis recurrentes de manifestación clínica variable y etiologías diversas, que puede correlacionarse con hallazgos paraclínicos positivos*".

> La epilepsia, un trastorno de la actividad bioeléctrica del cerebro al que en la antigüedad llegaron a atribuírsele cualidades demoníacas, es hoy controlable, por diversos fármacos.

El término ***convulsión*** se refiere a un trastorno transitorio del comportamiento, causado por la alteración sincrónica, arítmica y desordenada de un número de neuronas. Sus manifestaciones pueden ser motoras, sensitivas, sensoriales, autonómicas, y/ o psíquicas. Se puede presentar dentro de un síndrome epiléptico o ser la manifestación de un desorden o secuela.

Durante una crisis epiléptica, las neuronas pueden emitir señales hasta 500 veces por segundo, esto es significativamente mayor a las 80 veces por segundo que ocurre en una neurona normal.[1] Se sabe que las convulsiones se originan en la corteza cerebral y no en otras regiones del SNC como tálamo, tallo encefálico o cerebelo.[2]

Es importante diferenciar *convulsiones epilépticas* de *no epilépticas*. Las *convulsiones no epilépticas* son las que se inician en un encéfalo normal mediante un estímulo eléctrico o por el uso de convulsivos químicos. Las *convulsiones epilépticas* ocurren sin provocación manifiesta.[2] Para decir que una

persona es epiléptica debe sufrir al menos dos crisis no provocadas con 24 horas de separación.

2. Un poco de Historia.

Se conocen registros antiguos de la medicina India del año 4500 a.C donde ya se nombraban los conceptos básicos que caracterizan a la epilepsia.[4] En el British Museum, Londres, se encuentran libros de medicina de las antiguas culturas babilónicas, que datan del año 2000 a.C, donde se describen muchos de los tipos de episodios epilépticos reconocidos hoy. Las antiguas culturas indias y babilónicas hacían referencia a la sintomatología, el diagnóstico y el tratamiento de la epilepsia. En la búsqueda del origen de este desorden, cada civilización hizo interpretaciones que se relacionaron con la superstición, los poderes sobrenaturales y la posesión demoníaca. De hecho la creencia extendida en muchos países, de considerar que quien sufría una crisis epiléptica era producto de una fuerza o energía sobrenatural se reflejó en el nombre otorgado a este desorden: epilepsia deriva de la palabra griega *epilambanein*, que significa "agarrar" o "atacar". El término *seleniazetai* también fue utilizado para describir a gente con epilepsia, ya que pensaban que la persona era afectada por el Dios de la luna (Selene). Los babilónicos asociaban cada tipo de crisis al nombre de un dios, generalmente malvado, y el tratamiento era, en gran parte, una cuestión espiritual. Esta visión fue la precursora del concepto de "enfermedad sagrada" dominante en la civilización griega (460-357 a.C.). En el año 400 a.C., Hipócrates, indicó que la epilepsia era un **trastorno del cerebro**.[5] Recién en el siglo XIX, 1873, el neurólogo londinense Hughlings Jackson describió por primera vez estas crisis. Propuso que **las crisis epilépticas eran el resultado de breves descargas electroquímicas repentinas en el cerebro, y que las características de las mismas dependían de la localización de estos impulsos.**

Las leyes del siglo XIX, en virtud de la creencia de que este desorden se heredaba, establecían que se debía encarcelar a los epilépticos para prevenir su matrimonio o se les realizaban esterilizaciones obligatorias. Hasta 1956, la legislación norteamericana preveía esta última medida que también fue llevada a la práctica en la Alemania nazi. La prohibición del matrimonio recién se abolió, tan solo hace veinticuatro años, en 1982. Además, y hasta la década del '70, a estos pacientes se les prohibía el acceso a edificios públicos, restaurantes, teatros y otros lugares de recreación. A partir de 1997 cuando fueron creadas las

reglamentaciones actuales conocidas como: "*Sacar la Epilepsia de las Sombras*" se han incrementado los grupos de apoyo en diversos países. Su finalidad es elevar la autoestima de quienes enfrentan la epilepsia y su entorno; así como reeducar a la sociedad en su conjunto, a fin desestigmatizar la enfermedad y concebirla como cualquier problema que afecta al 2% de la población mundial.

Muchos personajes famosos de la historia de la humanidad han sufrido esta enfermedad entre ellos Julio César, el Zar ruso Pedro "el grande", el Papa Pio IX, el escritor Fiodor Dostoievski, y el pintor holandés Vincent Van Gogh entre otros.

3. Datos Estadísticos

La epilepsia es la enfermedad neurológica más frecuente en todo el mundo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), afecta en promedio a 70 de cada 10 mil personas en el mundo, sin discriminación de edad, sexo o limites geográficos. La incidencia, puede variar entre los países desarrollados (50 personas/10 mil) y en vías de desarrollo (10 personas/10 mil) debido a que en estos últimos hay mayor riesgo de infecciones y enfermedades que ocasionen daños cerebrales que puedan traer aparejado este tipo de desordenes[6]. Esto representa que al menos 50 millones de personas en el mundo tienen epilepsia.

En Europa seis millones de personas tienen epilepsia y se estima que en los próximos años esta cifra crecerá considerablemente. El costo terapéutico de esta enfermedad, en los países europeos, es superior a los 20 billones de euros anuales[7]. Estudios recientes realizados en Italia, Alemania y Estados Unidos señalan que entre el 15 y 20 por ciento de las personas epilépticas en edad laboral están desempleados, mientras que entre el 40 y el 60 por ciento son empleados por debajo de su capacidad.[1]

Más de 2.5 millones de personas en los Estados Unidos (cerca de 1 en 100) han experimentado una convulsión no provocada o han sido diagnosticadas con epilepsia.[6]

Según datos del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires en esta provincia, se estima que 480 mil pacientes la padecen, lo que representa 130 casos por cada 10 mil habitantes.[5] Según estos números estaríamos por encima de los valores mundialmente establecidos por la OMS.

4. A quiénes afecta y cuando se manifiesta?

Aunque puede manifestarse en cualquier momento de la vida, sin discriminación de edad, sexo o límites geográficos, la niñez-adolescencia y la tercera edad, son las dos etapas donde se presenta con mayor frecuencia.

5. Clasificación de las Convulsiones

Las crisis epilépticas o convulsiones se clasifican según la localización del sitio del cerebro afectado. Así las convulsiones epilépticas se han clasificado en dos grupos: convulsiones *parciales o focales* y *convulsiones generalizadas* (Comisión, 1981).[8]

Las convulsiones *parciales o focales* (Figura 1) se inician por una descarga eléctrica en un punto focal del sitio cortical, las *generalizadas* abarcan ambos hemisferios.

5.1 Convulsiones parciales

Las *convulsiones parciales* a su vez se clasifican en:

1. Parciales Simples: no involucra perdida de la conciencia mientras que en a convulsión parcial compleja conlleva a un daño transitorio en la conciencia.
2. Parciales Complejas: la persona afectada presenta manifestaciones "extrañas" que no recuerda. Muy frecuentemente es parte de los estados postictales (posterior a la crisis) prolongados.
3. *Parcial con Generalización secundaria*: se presenta como una manifestación tónico-clónico generalizada precedida de cualquiera de los fenómenos anteriores y conserva siempre su inicio parcial o focal. Pueden ser inespecíficas como el Síndrome de West o de Espasmos infantiles Síndrome de Lennox- Gastaut o específicas por afecciones genéticas metabólicas (lesión).

Las manifestaciones clínicas incluyen fenómenos relacionados con su localización:

• *Crisis Frontales*: componente motor, desviación ocular, cuadro de "comportamiento bizarro" y presentación nocturna en caso de ser bifrontal. Se

confunden con las primarias por su rápida generalización.

• *Crisis Temporales*: se pueden dividir en dos grandes grupos: el de los fenómenos gnósicos en localizaciones hipocampales y/ o amigdalares con propagación límbica y el de las perceptivas de características auditivas, que algunas veces se confunden con ausencias.

• *Crisis Occipitales*: tienen un componente visual, se deben diferenciar de un cuadro migrañoso.

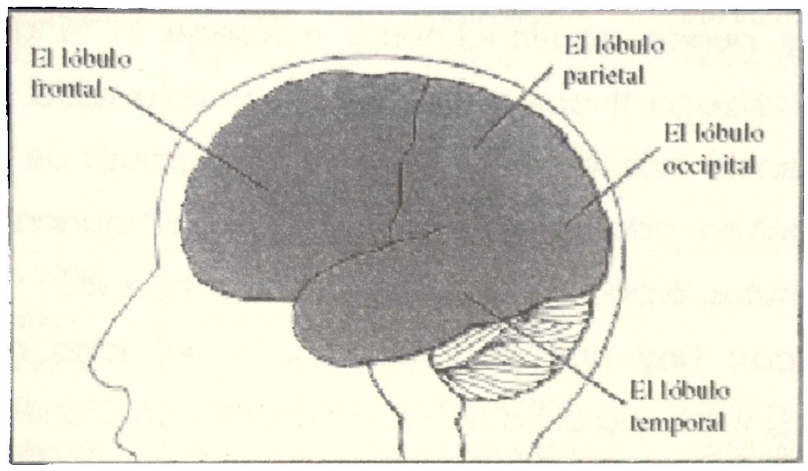


Figura 1. Las convulsiones focales, que afectan aproximadamente al 60 % de las personas con epilepsia, ocurren en una sola área del cerebro y son, a menudo, descritas según el lugar del cerebro donde se originan, por ejemplo la epilepsia del lóbulo temporal o la epilepsia del lóbulo occipital. Los síntomas varían según el área afectada del cerebro.

5.2 Convulsiones Generalizadas

Las *crisis generalizadas* pueden causar pérdida del conocimiento, caídas o espasmos musculares masivos. Se conocen seis tipos principales:

1. *Crisis de ausencia (petit mal)*: Breves lapsos de perdida del conocimiento, 3 y 30 segundos. Comienzan y terminan abruptamente, y pueden ocurrir cientos de veces al día. Hay una interrupción brusca de los movimientos o una conducta automatizada (mirada fija, leve parpadeo, se frota la nariz, mastica o traga) y rápidamente recupera la conciencia.
2. *Crisis mioclónicas*: Son contracciones musculares breves de 1 segundo.
3. *Convulsiones Clónicas*: Con sacudidas en ambos lados del cuerpo.

4. *Convulsiones Tónicas:* **Duración corta de contracción tónica severa de los** músculos: espalda, brazos, y piernas. No siempre se pierde la conciencia y se mantiene la postura.
5. *Crisis tonico-clónicas (grand Mal)*: **Perdida de la conciencia y caída.** Mientras el paciente cae se pone tieso por contracción tónica generalizada de los músculos de los miembros. Esta fase dura menos de 1 minuto, la respiración se detiene y puede observarse cianosis. Luego de la fase tónica siguen los movimientos clónicos con períodos alternados de contracción y relajación de los músculos de las extremidades, menos de 1 minuto. El paciente puede ocasionalmente morderse la lengua y se observa espuma en la boca. Puede haber incontinencia urinaria. Sigue un período de inconciencia más relajado de 1 minuto. Después de esa fase el paciente esta confuso, adormecido, e incapaz de relacionarse con el medio por varios minutos. El paciente no recuerda lo sucedido.
6. *Convulsiones atónicas:* **Hay una pedida abrupta del tono muscular.** Comienza en la niñez y termina en la adultez. Generalmente se encuentra asociada a retardo mental.

Las manifestaciones corporales que se observan dependen de la parte de la corteza que se afecta en el episodio epiléptico. Por ejemplo la crisis convulsiva que afecta la corteza motora se vincula a las sacudidas clónicas de la parte del cuerpo controlada por esta región. En el Cuadro 1 se muestra la clasificación de los tipos de epilepsia sugerida por la Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989.[9]

Tipo de Convulsión	Características	Anticonvulsivos Clásicos	Anticonvulsivos de nueva generación
CONVULSIONES PARCIALES: **Parciales Simples**	**Aspecto clave: no se pierde el conocimiento.** Duración: 20 a 60 seg.	Carbamazepina, Fenilhidantoína, Valproato.	**Topiramato Tiagabina Levetiracetam Lamotrigina Zonizamida Gabapentina.**
Parciales Complejas	**Perdida del conocimiento.** Movimientos propositos como chasquear los labios o agitar las manos. Duración:30 seg. a 2 min.	Carbamazepina, Fenilhidantoína, Valproato.	**Topiramato Tiagabina Levetiracetam Lamotrigina Zonizamida Gabapentina.**
Parciales con convulsiones tonicoclónicas generalizadas de manera consecutiva.	**Pérdida del conocimiento y contracciones sostenidas (tónicas)** seguido de **contracciones musculares alternadas con períodos de relajación (clónicas).** Duración: 1-2minutos.	Carbamazepina, Fenilhidantoína, Fenobarbital, Primidona, Valproato.	**Topiramato Tiagabina Levetiracetam Lamotrigina Zonizamida Gabapentina.**
CONVULSIONES GENERALIZADAS: **Crisis de ausencia**	**Pérdida del conocimiento repentina.** Mirada fija e interrupción de la actividad que se estaba realizando. Duración: menos de 30 seg.	Etosuximida, Valproato.	**Lamotrigina**
Convulsión mioclónica	**Contracción muscular breve** Tipo choque eléctrico. Puede ser en parte de una extremidad o generalizada. Duración: 1 seg.	Valproato	**Lamotrigina, Topiramato**
Convulsión tonicoclónica	**Igual que en el caso de las** convulsiones tonicoclónicas generalizadas **de manera consecutiva, salvo que no van seguidas por una convulsión parcial.**	Carbamazepina, Fenilhidantoína, Fenobarbital, Primidona, Valproato	**Lamotrigina, Topiramato**

Cuadro 1. Clasificación de las convulsiones epilépticas.[9]

6. Tipos de epilepsia.

A parte de la clasificación de las *convulsiones epilépticas*, hay otra clasificación que especifica los diferentes tipos de epilepsias. Estos son grupos de síntomas con diferentes tipos de *convulsión*, que se clasifican por *edad de inicio*, *causa*, sexo y otros factores que contribuyen a describir el episodio.

Se han identificado más de 100[10] tipos de convulsiones y síndromes epilépticos en humanos.

Las epilepsias también se clasifican en *epilepsias parciales* y *generalizadas*.

Las *epilépsias parciales* abarcan cualquiera de los tipos de convulsiones que se muestran en la Cuadro 1, y constituyen el 60 % de todas las formas de epilepsia. El origen puede ser alguna lesión en la corteza, como tumor, traumatismo, etc.

La *epilepsia generalizada* suele tener un origen *genético* y puede presentarse en una o dos de las formas que se muestran en el Cuadro 1. Uno de los tipos más común de *epilepsia generalizada* es la *mioclónica juvenil* (abarca un 10% de todos los síndromes epilépticos). Otros ejemplos de crisis epilépticas son:

- epilepsia del lobulo temporal, es el más común entre los pacientes que tienen epilepcias parciales o focales y estan asociadas al aura;
- *epilepsia neocortical* ;el *síndrome de Lennox-Gastaut* o crisis de caída, se inicia en la infancia;
- *encefalitis de Rasmussen.*
- Parcial somato-sensorial o progresión Jackoviana: Variedad de síntomas sensomotores en el hemisferio izquierdo, aunque se presenta en el hemisferio derecho. En la sensorial especial (lóbulo occipital) se tienen sensasiones o alucinaciones visuales. Los ataques aparecen repentinamente de ½ minuto aproximadamente.

Entre los síndromes epilépticos benignos se incluyen:

- *encefalopatía infantil benigna* ;
- *epilepsia neonatal benigna,* entre otros muchos.

La clasificación por tipos de epilepsia ha sido de utilidad para valorar el cuadro clínico del tratamiento, lo que orienta a la elección de los medicamentos a utilizar en el tratamiento.

7. Causas de los episodios epilépticos.

La epilepsia es un trastorno que puede tener múltiples causas (Figura 2), o incluso ser el síntoma clínico de otro problema. Todo aquello que modifique la actividad neuronal normal, puede ocasionar epilepsia. Entre las causas responsables de los episodios podemos nombrar:

- enfermedades como : meningitis, alcoholismo;
- desarrollo anormal del cerebro;
- una anomalía en las conexiones ínterneuronales del cerebro,
- un desbalance en las señales nerviosas de los neurotransmisores,
- combinación de estos factores.
- lesiones cerebrales,
- traumatismos,
- malformaciones congénitas,
- anomalías metabólicas,
- tumores,
- componentes genéticos

Algunas personas con epilepsia tienen niveles anormalmente altos de *neurotransmisores excitadores* que aumentan la actividad neuronal, mientras que otras tienen niveles anormalmente bajos de *neurotransmisores inhibidores* que disminuyen la actividad neuronal en el cerebro.

En muchos casos, las descargas eléctricas excesivas y repentinas (crisis) de las células cerebrales, no tienen una causa identificable (más del 50% de los casos). A este tipo de epilepsia se la conoce como epilepsia criptogénica.
La epilepsia *idiopática* tendría un componente genético en su origen.[2]

7.1 Otras causas de convulsiones no epilépticas.

Factores como la falta de sueño, crisis febriles, el consumo de alcohol, el estrés y los cambios hormonales asociados con el ciclo menstrual pueden provocar convulsiones. Estos *desencadenantes de las crisis* **no causan epilepsia**, pero pueden provocar una crisis por primera vez o causar crisis significativas en personas que, de otra forma, controlan bien las crisis con sus medicamentos. El fumar tabaco también puede desencadenar una crisis epiléptica. La nicotina presente

en los cigarrillos actúa sobre los receptores del neurotransmisor excitador, acetilcolina, en el cerebro, lo cual aumenta la frecuencia de los impulsos neuronales.[6] También pueden ser causadas por intoxicaciones por plomo, monóxido de carbono, u otros tóxicos como estupefacientes, sobredosis de antidepresivos y otros medicamentos.

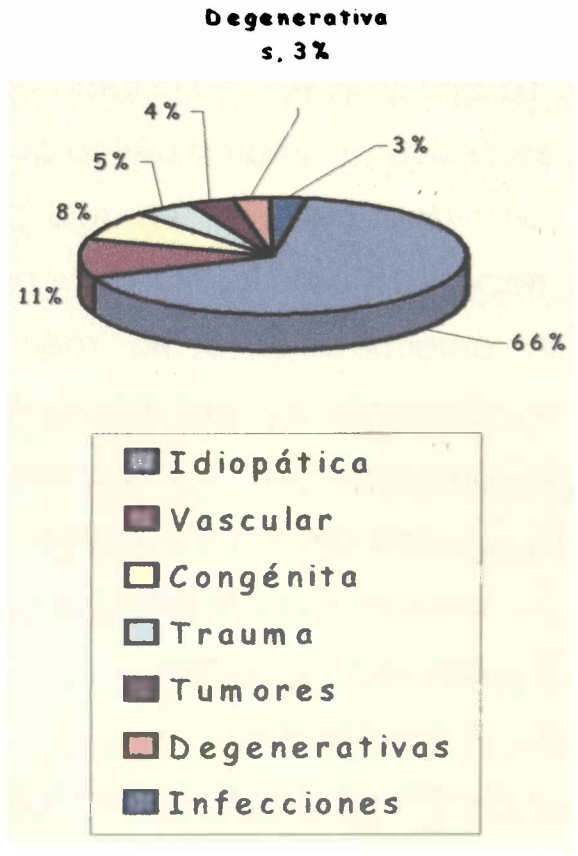


Figura 2. Causas de la epilepsia. Proporción de incidencia de casos (1935-1984) por etiología de la epilepsia (todas las edades). Tomada de: Hawser W.A., Amnegers, J.F. and Kusland L.T., *Epilepsia*, **1993**, 34: 453-468.

8. El Sistema Nervioso Central

Para conocer los sitios y mecanismos de acción de fármacos que afectan al SNC es necesario conocer la biología celular y molecular del encéfalo. Aunque lo que se sabe de la anatomía, fisiología y química del SNC no es del todo completo, investigaciones interdisciplinarias han permitido avances notables.

Se sabe que las convulsiones se originan en la corteza cerebral y no en otras regiones del SNC como tálamo, tallo encefálico o cerebelo.[2]

La **corteza cerebral** abarca los dos hemisferios cerebrales y constituyen la división de mayor tamaño del encéfalo. Las regiones de la corteza se clasifican de diversas maneras:

1. por la modalidad de información que procesan (por ej: sensitiva, motora de asociación)
2. según la posición anatómica (frontal, occipital, temporal, parietal)
3. según las relaciones geométricas entre los tipos de células distribuidas conforme a las clasificaciones citoestructurales de las capas corticales principales.

Grupos de columnas de 100 neuronas, conectadas en sentido vertical, constituyen un módulo elemental de procesamiento. Estos interconectan sistemas anidados,

donde las relaciones sensitivas se modifican con rapidez conforme se procesa la información. Esto puede regular funciones corticales superiores como pensamiento abstracto, memoria, y conciencia. La corteza cerebral también integra funciones somáticas y autónomas.

Otra cuestión importante para la llegada de un fármaco al SNC desde el punto de vista anatómico es la Barrera Hematoencefálica. Esta es una frontera importante entre la periferia y el SNC que impide la difusión pasiva de sustancias de la sangre a distintas regiones de este sistema.[2]

8.1 Estructuras celulares involucradas en la epilepsia.

Se postula que una función sináptica defectuosa podría originar convulsiones. Es decir la reducción de la actividad sináptica inhibitoria y el fomento de la actividad sináptica excitatoria desencadenan una crisis convulsiva.

La membrana celular que rodea cada neurona juega un papel importante en la epilepsia. Las membranas celulares son vitales para que una neurona pueda generar los impulsos eléctricos. Por esta razón se están estudiando los detalles de la estructura de las membranas, la forma en que las moléculas entran y salen de las membranas y cómo la célula nutre y repara las membranas. La perturbación de cualquiera de estos procesos puede causar epilepsia. Estudios realizados en animales han mostrado que debido a que el cerebro se adapta continuamente a cambios en los estímulos, un pequeño cambio en la actividad neuronal, si es repetitivo, puede finalmente causar epilepsia, tal vez también podría ocurrir en humanos. Este fenómeno se llama *activación propagada (kindling* en inglés). También puede ocasionarse por cambios en las células no neuronales del cerebro, llamadas glías. Estas células regulan las concentraciones de sustancias químicas en el cerebro que pueden afectar las actividades de señalización entre las neuronas.

9.Diagnóstico de la epilepsia

Existen varias pruebas diferentes para determinar si una persona tiene epilepsia y si la tiene saber que tipo de epilepsia es. En ciertos casos, las personas pueden tener síntomas que son muy parecidos a una crisis pero que, en realidad, son eventos no epilépticos causados por otros trastornos.

9.1-Monitoreo con encefalograma (EEG)

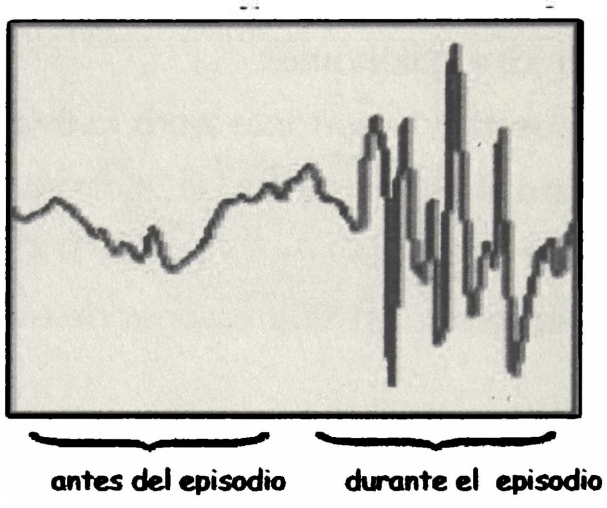


Figura 3. Electroencefalograma

El desarrollo del electroencefalógrafo humano, en la década de 1920, y su aplicación en el decenio siguiente, contribuyeron a ampliar el conocimiento sobre la epilepsia.[2] Un EEG, registra las ondas cerebrales que son detectadas por los electrodos colocados en el cuero cabelludo. Esta es la prueba diagnóstica más común utilizada para la epilepsia y puede detectar anormalidades en la actividad neuronal del cerebro. Las personas con epilepsia tienen frecuentemente cambios en los patrones normales de sus ondas cerebrales, aunque no estén experimentando una convulsión (Figura 3). A pesar de que este tipo de prueba puede ser muy útil para diagnosticar la epilepsia, muchas veces se necesitan pruebas diagnósticas adicionales. Algunas personas todavía siguen mostrando ondas cerebrales normales aún después de haber tenido una crisis epiléptica. En otros casos, las ondas cerebrales anormales se generan a un nivel profundo en el cerebro donde el encefalograma no las puede detectar. Muchas personas que no tienen epilepsia también muestran cierta actividad cerebral inusual en el EEG. Idealmente, se debe hacer el encefalograma tanto cuando el paciente está durmiendo como cuando está despierto, debido a que la actividad cerebral durante el sueño es muy diferente a la actividad registrada en otras ocasiones. A menudo, el *monitoreo por video* se utiliza en conjunto con el encefalograma para determinar la naturaleza de las crisis del paciente.

9.2 Estudios adicionales

Otros estudios adicionales que se pueden realizar en ciertos casos, para descartar otros trastornos que pueden parecerse a la epilepsia, como la arritmia cardiaca o la narcolepsia son:

- *TC* (tomografía computadorizada),
- *TEP* (tomografía por emisión de positrones)
- *RM* (resonancia magnética),

Entre las técnicas adicionales más modernas se destacan:

- *SPECT* (tomografía computadorizada por emisión de fotón único),
- *MEG* (magneto encefalograma),
- *ERM* (espectroscopia por resonancia magnética).

La TC y la RM revelan la estructura del cerebro, lo cual puede ser útil para identificar tumores cerebrales, quistes y otras anormalidades estructurales. La TEP y una adaptación de la RM, llamada *RM funcional* (resonancia magnética funcional), pueden ser utilizadas para vigilar la actividad cerebral y detectar anormalidades en su funcionamiento. La *SPECT* (tomografía computadorizada por emisión de fotón único) es un tipo relativamente nuevo de estudio de imagen cerebral que se utiliza a veces para ubicar el lugar de origen de la convulsión en el cerebro. En ciertos casos, los médicos pueden utilizar un tipo experimental de estudio de imagen cerebral llamado *magneto encefalograma*, o *MEG*. El MEG detecta las señales magnéticas emitidas por las neuronas, lo cual le permite a los médicos vigilar la actividad cerebral en diferentes puntos del cerebro a lo largo del tiempo, revelando, de esta forma, las diferentes funciones cerebrales. A pesar de que el MEG es similar en concepto al EEG, no necesita electrodos y puede detectar señales que se originan más profundamente en el cerebro, a donde el EEG no puede llegar. Los médicos también están experimentando con un estudio de imagen cerebral llamado *espectroscopia por resonancia magnética (ERM)* que puede detectar anormalidades en los procesos bioquímicos del cerebro y con la *espectroscopia casi infrarroja*, se puede detectar niveles de oxígeno en el tejido cerebral.

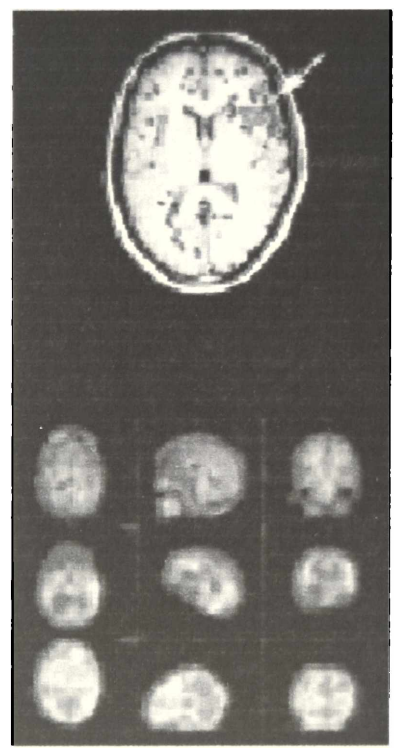


figura 4.Imagen de la corteza cerebral realizada por RMN. Se observa la zona de la corteza cortical lesionada en donde se inician los episodios epilépticos.

9.3-Pruebas de sangre

Las muestras de sangre son comunes a menudo, cuando se están tratando niños. Estas sirven para detectar:

- trastornos metabólicos
- trastornos genéticos

Estos trastornos pueden estar asociados a las convulsiones. Adicionalmente las pruebas de sangre pueden ser utilizadas para buscar problemas subyacentes, como infecciones, intoxicación por plomo, anemia y diabetes que pueden estar causando o desencadenando las convulsiones.

9.4-Pruebas de comportamiento, neurológicas y del desarrollo.

Los médicos utilizan, con frecuencia, pruebas diseñadas para medir las habilidades motoras, el comportamiento y la capacidad intelectual, como una forma de determinar la manera en qué la epilepsia está afectando a la persona. Estas pruebas también dan indicaciones sobre el tipo de epilepsia que tiene la persona.

10. Tratamientos.

El tratamiento va a depender del tipo de crisis epiléptica. Existen muchas formas diferentes de tratar la epilepsia.

Los medicamentos son el tratamiento que da mejor resultado. Los medicamentos actuales pueden controlar las crisis en aproximadamente el 70% de las personas con epilepsia. Sin embargo, otro 30%, tiene crisis resistentes a los medicamentos y sienten que los tratamientos disponibles no les ofrecen un alivio adecuado. Estas estadísticas dejan en claro que se necesita urgentemente contar con mejores tratamientos. Los tratamientos disponibles se enumeran a continuación:

1. **Medicamentos**
2. **Cirugía**
3. **Dispositivos especiales**
4. **Dieta cetogénica**

10.1- Medicamentos

Es el tratamiento más usado, si bien es sintomático, ya que no existen medicamentos para curar la enfermedad, éstos sólo evitan las convulsiones. No se ha encontrado aún un antiepileptógeno eficaz.

En los pacientes con epilepsia que inician un tratamiento farmacológico, del 65% al 75% logran controlar sus crisis epilépticas con escasos efectos secundarios. En el restante 25% a 35%, la medicación suele producir una mejoría de las crisis pero éstas persisten (farmacorresistencia) o aparecen efectos secundarios que obligan a disminuir la dosis del medicamento. En alguno de estos pacientes está indicada la cirugía u otras técnicas de tratamiento.

Si bien la enfermedad no tiene cura en algunas personas la enfermedad finalmente desaparece. Las probabilidades de quedar libre de crisis epilépticas no son tan buenas para los adultos o para los niños con síndromes epilépticos graves, pero, no obstante, es posible que las crisis epilépticas puedan disminuir o hasta detenerse con el tiempo. El tratamiento puede presentar dificultades relacionadas con el cumplimiento de la toma de la medicación, ya que la misma debe respetar continuidad por tiempos prolongados.

Los agentes anticonvulsivos abarcan una gran variedad de compuestos, todos capaces de evitar o disminuir las descargas neuronales anormales en el SNC que producen los episodios convulsivos, siguiendo uno o varios de los mecanismos posibles:

- previenen la propagación de la convulsión;
- son depresores de la corteza motora cerebral;
- aumentan el umbral de la convulsión;
- o modifican los niveles de neurotransmisores.

10.1.1 Efectos adversos de los fármacos anticonvulsivos.

El tratamiento crónico con los agentes anticonvulsivos, conlleva a efectos adversos que van desde naúseas a teratogenicidad. Entre ellos podemos destacar:

- manifestaciones gastrointestinales (náusea, vómito y anorexia);
- efectos sobre el sistema nervioso central (SNC): somnolencia, letargo, euforia, mareos, cefalalgia, hipo, pérdida del conocimiento, de las palabras, problemas cognitivos.

- predisposición a sufrir depresión o psicosis;
- cansancio extremo, tambalearse al caminar u otros problemas del movimiento y hablar arrastrando las palabras
- urticarias o lesiones cutáneas, fotofobia, leucopenia;
- alteraciones y malformaciones en el feto (si el embarazo se produce mientras la paciente está bajo tratamiento).

Muchos de los efectos tóxicos están relacionados con el tratamiento prolongado.

- trastornos hepáticos[11] y renales. [12, 13]

10.1.2 Monoterapias.

Las *monoterápias* se refieren a la manipulación de un único mecanismo farmacológico, no a una sola droga. [14] En la mayoría de los casos las crisis epilépticas se pueden controlar con un solo medicamento administrado a una dosis óptima. La combinación de medicamentos generalmente amplifica efectos secundarios como la fatiga y la disminución del apetito, razón por la cual los médicos recetan una *monoterapia*, siempre que esto sea posible. Si esta falla, a veces se receta combinaciones de medicamentos para controlar eficazmente las crisis del paciente.

10.1.3 Politerapías

Las *politerapias* enfocan el tratamiento de las crisis epilépticas abordando más de un mecanismo de acción, con el uso de varias drogas con mecanismos de acción únicos, *politerapia racional* o el uso de una único fármaco que involucra varios mecanismos de acción como el ácido valproico.

10.1.4 Suspensión de la medicación

En el caso en donde los pacientes han pasado más de dos años sin convulsión pueden suspender la medicación. Las crisis que se originan con la suspensión de los medicamentos pueden ser muy graves y pueden causar estado de mal epiléptico. Además, existe cierta evidencia de que las crisis incontrolables desencadenan cambios en las neuronas, lo que hace más difícil tratar las crisis en el futuro. Las probabilidades de suspender la medicación exitosamente no son tan

buenas para las personas con antecedentes familiares de epilepsia, aquellas que necesitan tomar múltiples medicamentos, aquellas con crisis focales y aquellas que siguen teniendo resultados de EEG anormales mientras están tomando los medicamentos.

10.2-Cirugía

1. El tratamiento quirúrgico es una opción para las epilepsias de difícil control.

2. Sólo un pequeño grupo de pacientes epilépticos pueden beneficiarse de este tipo de tratamiento.

3. La elección de estos pacientes debe hacerse en unidades especializadas en epilepsia, bajo el control de profesionales altamente capacitados.

Para realizar una cirugía se debe tener en cuanta la región del cerebro que está involucrada y qué tan importante es esa región para el comportamiento diario. Durante una conferencia de consenso sobre la cirugía de epilepsia, organizada por los Institutos Nacionales de la Salud en 1990, se concluyó que hay tres grandes categorías de epilepsia que pueden ser tratadas exitosamente con la cirugía. Estas incluyen:

- las crisis focales
- las crisis que se inician como focales pero que luego se propagan al resto del cerebro;
- la epilepsia multifocal unilateral con hemiplejia infantil (como es el caso de la encefalitis de Rasmussen).

Generalmente, la cirugía se recomienda solamente después de que los pacientes han probado dos o tres medicamentos diferentes sin que estos hayan tenido efecto, o si hay una *lesión* cerebral identificable (un área dañada o disfuncional) que se cree es la causante de las crisis. En los casos en donde las convulsiones son causadas por tumores cerebrales, hidrocefalia, pueden ser tratadas con cirugía. En muchos casos, una vez que la condición subyacente ha sido tratada con éxito, las crisis de la persona también desaparecerán. A pesar de que la cirugía puede reducir significativamente o hasta detener las crisis en ciertas personas, es importante recordar que cualquier clase de cirugía conlleva cierto riesgo. La

cirugía de epilepsia no siempre es eficaz para reducir las crisis y puede causar cambios cognitivos o en la personalidad, aún en personas que son excelentes candidatas para la cirugía. La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en Abril de 2006 aprobó el uso de un sofware iPlan Flow. Este sofware se usa en neurocirugía y permite al cirujano saber donde y cuanta medicación necesita ser administrada para alcanzar células específicas en el cerebro. Es crucial para el éxito del cirujano que la droga que se administre llegue al sitio de acción, y el sofware ayuda a verificar esto.[15] La computadora usa imágenes de resonancia magnética para entregar un mapa tridimensional del cerebro del paciente.

10.3-Dispositivos especiales

Dentro de los dispositivos se pueden nombrar:

- estimulador del nervio vago;
- *estimulación magnética transcraneal (EMT).*

A futuro:

- crear dispositivos que se puedan implantar para administrar medicamentos

El estimulador del nervio vago fue aprobado en 1997 por la FDA para su uso en personas con crisis que no son bien controladas por los medicamentos. El estimulador del nervio vago es un dispositivo que funciona con pilas y que se implanta quirúrgicamente bajo la piel del pecho, muy parecido a un marcapasos, y se conecta con el nervio vago en la parte baja del cuello. Este dispositivo envía descargas de energía eléctrica al cerebro por la vía del nervio vago. Esta estimulación reduce las convulsiones entre cerca del 20 al 40 por ciento en promedio. Generalmente, los pacientes no pueden dejar de tomar los medicamentos antiepilépticos por el hecho de tener el estimulador, pero experimentan a menudo menos crisis y pueden estar en capacidad de reducir las dosis de sus medicamentos. Los efectos secundarios del estimulador del nervio vago son generalmente leves, pero pueden incluir ronquera, dolor de oído, dolor de garganta o náuseas. Las pilas del estimulador del nervio vago deben ser reemplazadas aproximadamente una vez cada 5 años; esto

requiere una cirugía menor que generalmente puede ser realizada en forma ambulatoria.

Varios dispositivos nuevos para el tratamiento contra la epilepsia pueden estar disponibles en el futuro. Se está estudiando si la *estimulación magnética transcraneal (EMT)*, un procedimiento que utiliza un poderoso campo magnético (imán) en la parte externa de la cabeza para influenciar la actividad cerebral, puede reducir las crisis.

También existe la posibilidad de crear dispositivos que se puedan implantar para administrar medicamentos en partes específicas del cerebro.

10.4-Dieta cetogénica

Los estudios han mostrado que, en algunos casos, los niños pueden experimentar menos convulsiones si siguen una estricta dieta:

- rica en grasas
- baja en carbohidratos.

Esta inusual dieta, llamada *dieta cetogénica*, hace que el cuerpo metabolize grasas en vez de carbohidratos para sobrevivir. Esta condición es llamada cetosis. Un estudio realizado en 150 niños, cuyas convulsiones no eran bien controladas por los medicamentos, encontró que cerca de un cuarto de los niños tuvo una disminución de las crisis de un 90 por ciento o más siguiendo una dieta cetogénica, y la otra mitad del grupo tuvo una disminución de las crisis de un 50 por ciento o más. Además, algunos niños pueden suspender la dieta cetogénica después de varios años y seguir libres de crisis. La dieta cetogénica no es fácil de mantener porque requiere el seguimiento estricto de una dieta que incluye una gama inusual y limitada de alimentos.

Los posibles efectos secundarios incluyen:

- retardo del crecimiento debido a la carencia nutritiva
- acumulación de ácido úrico en la sangre, lo que puede causar cálculos renales.

Las personas que utilizan la dieta cetogénica deben buscar la orientación de un nutricionista para asegurar que ésta no conduzca a una carencia nutritiva grave. No se sabe con seguridad la manera en que la dieta cetogénica inhibe las convulsiones. Un estudio mostró que un residuo de la cetosis llamado beta-hidroxibutirato (BHB) inhibe las convulsiones en animales. Si el BHB también funciona en los seres humanos, se podría finalmente elaborar medicamentos que imiten los efectos inhibidores de las convulsiones provocados por la dieta cetogénica.

11. Nuevas perspectivas sobre la epilepsia

A pesar de los avances científicos y tecnológicos aún no se tienen respuesta sobre:

- cómo y porqué surgen las crisis epilépticas,
- cuál es la mejor forma de tratarlas o prevenirlas
- cómo influencian otras actividades cerebrales y el desarrollo del cerebro.

Se continúa investigando para:

- Obtener nuevos medicamentos
- Encontrar otros tratamientos para la epilepsia.

El Programa de Análisis Exploratorio de Anticonvulsivantes del NINDS (*Anticonvulsant Screening Program* o ASP) estudia nuevas terapias o tratamientos alternativos.[1]

Además de la realización de pruebas para encontrar terapias más eficaces y seguras, el Programa se encuentra diseñando y validando nuevos modelos que algún día pueden descubrir terapias que intervienen en la enfermedad misma, así como modelos para la epilepsia resistente o refractaria.

11.1. Enfoques de nuevas investigaciones.

- La forma en que los neurotransmisores excitadores e inhibidores interactúan con las células cerebrales para controlar las emisiones nerviosas.
- Mecanismos de la epilepsia para facilitar el desarrollo de nuevos medicamentos contra la epilepsia.[16]

- Cómo la glía y otras células no neuronales del cerebro intervienen en las crisis epilépticas
- Identificación de los genes involucrados en este desorden neuronal.
- Dispositivo que puede predecir la aparición de las convulsiones y administre automáticamente un medicamento
- Nuevas tecnologías para identificar problemas sutiles en el cerebro.

En un estudio clínico preliminar, se han empezado a trasplantar neuronas fetales de cerdo, que producen GABA (ácido gamma-aminobutírico), a los cerebros de pacientes, para establecer si los trasplantes celulares pueden servir para controlar las crisis. Las investigaciones preliminares indican que los trasplantes de células madre pueden ser beneficiosos para tratar la epilepsia. La investigación que muestra que el cerebro sufre cambios sutiles antes del inicio de una convulsión ha llevado a la creación de un prototipo de dispositivo con capacidad de predecir la aparición de las convulsiones hasta 3 minutos antes de que ocurran. Si este dispositivo funciona, podría reducir enormemente el riesgo de lesiones pues les permitiría a las personas ir a un área segura antes de que se inicien las convulsiones. Este tipo de dispositivo también puede conectarse a una bomba de tratamiento u otro dispositivo que administre automáticamente un medicamento antiepiléptico o envíe un impulso eléctrico para prevenir las crisis.[1]

Referencias

[1] Seizures and Epilepsy: Hope Through Research. NIH Publication No. 04-156. May **2004**.

[2] Goodman & Gilman,A. (Eds), Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10 ma Ed. , Vol.I, McGraw-Hill InterAmericana, México, **2003**, 529-556.

[3] Liga Central contra la Epilepsia. Sitio Web: http://www.epilepsia.org/epilepsia.htm.

[4] **Tomado de la página de WHO (World Health Organization)**: http://www.who.int.

[5] Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires. Actualizado Diciembre **2005**. **Sitio Web:** www.ms.gba.gov.ar/Informes/Epilepsia.htm

[6] World Health Organization 2006. Epilepsy: aetiogy, epidemiology and prognosis; Fact sheet N°165, Revised February **2001**. Sitio Web: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/en/.

[7] Declaración Europea sobre la Epilepsia. Sitio Web: http://www.epilepsiasen.org/apublica/declaracion

[8] Comission on Classification and Terminology of the Internacional League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. Epilepsia, **1981**, 22, 489-501.

[9] Comission on Classification and Terminology of the Internacional League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. Epilepsia, **1989**, *30*, 389-99.

[10] Matthew R. Sarkisian, Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders, *Epilepsy & Behavior*, **2001**, 2, 201-216.

[11]Taylor, Ch.P. *Cap.69: Mechanisms of New Antiepileptic Drugs.* En: Delgado-, escueta, A.V.; Wilson, W.A.; Olsen, R.W.; Porter, R.J. (Eds), *Jasper`s Basic Mechanisms of the Epilepsis, 3 rd Ed.: Advances in Neurology*, Vol 79, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **1999**, 1011-1026.

[12] White, H.S. *Epilepsia,40* (5), **1999**, S2-S10.

[13] Schmidt,D., Anticonvulsants. En: Dukes , M.N.G.(Ed.), *Meyler's Side Effects of Drugs* , 12 th edn., Elsevier, Amsterdan, **1992**, 122-143.

[14] Gram, L. *Epilepsia*, 36(6), **1995**, S22-S24.

[15] BrainLab AG, *Drug Discovery & Development Insider*. Focus Information, Abril **2006**.

[16] Ditchter, M.A. Emerging Insight into Mechanism of Epilepsy: Implications for New antiepileptic Drug Development En: Epilepsia Vol.35, raven Press Ltd., New York **1994**, 51-7.

ANEXO 3

Mecanismo de las Convulsiones

1. Introducción

Durante los episodios epilépticos que se producen, tanto en humanos, como los producidos en animales de laboratorio, se observa en los electroencefalogramas (EEGs) rápidos cambios de voltaje (Anexo 2). Por otra parte los registros extracelulares muestran una constante despolarización causada por un potencial excitatorio postsináptico. Los mecanismos bioquímicos exactos por los que se producen dichas descargas y el origen de los ataques epilépticos aún no se conocen con exactitud.[1] Existen muchos tipos de ataques y numerosos mecanismos por los cuales el cerebro genera dichos ataques. Las dos manifestaciones principalmente son:

- ❖ Hiperexcitabilidad de las neuronas
- ❖ Hipersincronía del circuito neuronal

Numerosos mecanismos alteran el balance entre excitación e inhibición y predisponen a una región del cerebro, local o difusa a una hiperexcitabilidad e hipersicronía.

- Los cambios eléctricos se asocian a la apertura de canales iónicos presentes en la membrana neuronal. En los ataques de descargas hipersincrónicas, las concentraciones de Ca^{++} extracelulares caen y las concentraciones de K^{+} extracelulares se incrementan. [2]

- Por otra parte las descargas neuronales excesivas pueden liberar grandes cantidades de neurotransmisores excitatorios en la sinapsis, lo que produce una estimulación excesiva.

La compresión de los mecanismos de la epileptogénesis en términos celulares y moleculares proporcionaría un marco para la creación de nuevos métodos terapéuticos. Disponer de modelos para ensayar las drogas en animales brinda una oportunidad para estudiar los mecanismos de base.

2. Fisiopatología.

Hasta el momento se conocen dos tipos principales de epilepsia GENERALIZADAS y PARCIALES o FOCALES:

- Las epilepsias generalizadas o genéticas en donde no hay daño cerebral y los cambios corresponden a procesos moleculares a nivel de los canales de Ca^{++}, Cl^{-}, aminoácidos y/o GABA.
- Las epilepsias parciales o focales corresponden a las secuelas de un daño cerebral que se convierte en un "marcapaso" donde se originan las crisis y el canal comprometido es el de Na^{+}.

3. Mecanismos involucrados en el control de la epilepsia

Entre los mecanismos de acción[3] involucrados en el control de los episodios epilépticos los más conocidos son:

1- Modulación de Canales iónicos; Na^{+}, Ca^{++}, K^{+}.
2- Inhibición Gabaérgica
3- Disminución de la excitación neuronal mediada por Glutamato
4- Unión a la proteína de la Vesícula sináptica SV2A.

Muchos de los fármacos anticonvulsivos en uso clínico no están directamente relacionados con un sitio de unión específico en el cerebro, la identificación de estos compuestos se condujo mediante el uso de ensayos in vivo usando animales enteros.

3.1 Modulación de los Canales Iónicos.

Los canales iónicos *voltaje dependientes* se distinguen de los *canales de iones ,de compuerta de ligando* en que posibilitan los cambios rápidos en la permeabilidad de los iones. Estos cambios rápidos son la base de la propagación rápida de las señales a lo largo de axones y dendritas, y el acoplamiento de excitación y secreción que descarga neurotransmisores de los sitios presinápticos. [4]

Los *receptores que controlan los canales iónicos de compuerta de ligando* están formados por cinco glicoproteínas las cuáles atraviesan las membranas celulares. El hecho de que el receptor sea parte de la estructura del canal iónico significa que el anclaje o *binding* de un mensajero químico a éste conlleve a una

respuesta rápida la cuál es crucial en la velocidad y eficiencia de la transmisión nerviosa.

Cuando un ligando se une al receptor, el receptor cambia su forma y produce un efecto en el complejo de la proteína que causa la apertura del canal iónico, este efecto se llama *gating*.

Los canales iónicos pueden seleccionar diferentes iones. Existen canales iónicos catiónicos para los iones Na^+, Ca^{++}, K^+. Cuando estos canales se abren, son generalmente *excitatorios* produciendo una despolarización de la célula.

Algunos de los receptores involucrados en el control de los canales iónicos catiónicos son los receptores nicotínicos, receptores para el glutamato, 5HT3 y ATP.

También existen canales iónicos aniónicos, para el ión cloruro (Cl^-). Estos canales iónicos son controlados por los receptores $GABA_A$ y glicina. Estos canales cuando se abren generalmente tienen un efecto *inhibitorio*.

La selectividad del canal a diferentes iones depende del aminoácido que recubre al canal. Una mutación de un aminoácido en esta área es suficiente para cambiar la selectividad de un canal iónico catiónico a uno aniónico.

Hay al menos tres familias de receptores involucradas en el control de los canales iónicos. Ellas se clasifican de acuerdo al número de los dominios transmembrana que contienen (4-TM, 3-TM, 2-TM).

La similitud estructural entre los canales de Na^+, Ca^{++}, y K^+ hace que la selectividad para esos canales sea un serio problema. Muchos fármacos bloqueantes de canales de Na^+ también bloquean canales de Ca^{++} y viceversa.

3.1.1. *Canales de Sodio*

Los canales de sodio son el blanco de los compuestos diseñados, sintetizados y evaluados farmacologicamente del presente trabajo. Es por eso que se describe en detalle lo que se conoce hasta el momento sobre este canal.

La cascada de acciones celulares responsables de la prevención de convulsiones por bloqueo de canales de sodio es probablemente compleja, muchas hipótesis fueron elaboradas. Los factores involucrados deben incluir la interrupción de rápidos trenes de potenciales de acción, reducción a la conductancia de sodio, o reducción de la carga de Na^+ citosólico durante la despolarización.[5]

3.1.2 Descripción del canal de Sodio: Su estructura

Se sabe que el canal de sodio es un complejo heteromérico constituido de una subunidad-α, y dos subunidades-β1 y β2 auxiliares, cuyo papel parece ser

I.A.Barrios

modulador.[6] Al menos 11 formas distintas de la subunidad-α para el canal de sodio y sus isoformas asociadas[7, 8] se encontraron en cerebro y tejido periférico de mamíferos. En el cerebro se han encontrado cuatro subunidad- α (I, II, IIA, NaCh6). La subunidad-α es operativa fisiológica y farmacologicamente por sí sola.[9] No se conocen hasta el momento fármacos que interaccionen directamente con la subunidad-β.

La subunidad- α contiene cuatro dominios (DI a DIV) que forman el poro de sodio. Cada dominio esta formado por seis segmentos (S1-S6) transmembrana, siendo S4 sensible al voltaje. Los segmentos 5 y 6 de cada dominio forman el poro del canal (Figura 1).

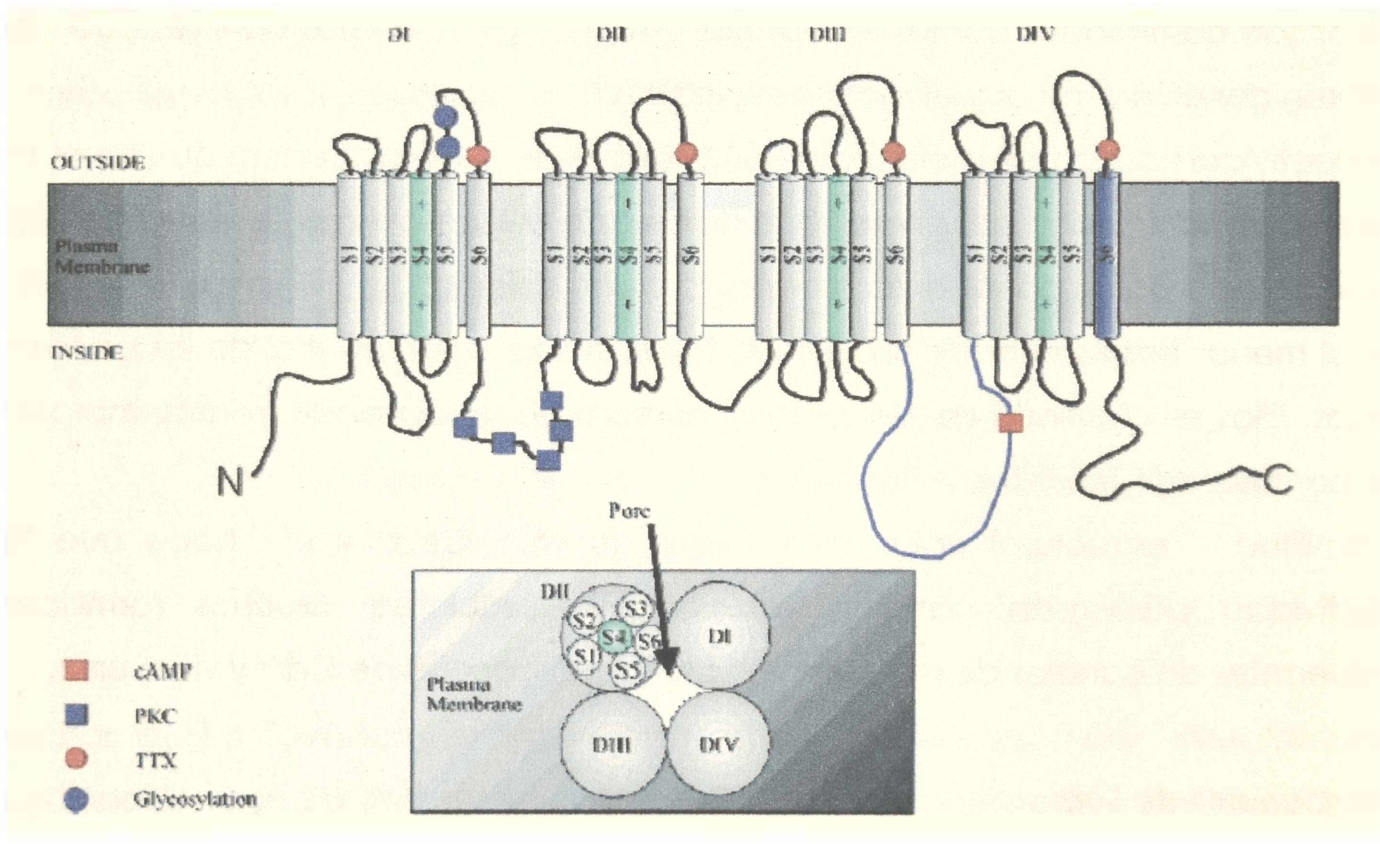


Figura 1. Esquema de la subunidad-α del canal de sodio y del poro que forma la subunidad. El segmento S4, (verde claro) es el sensible al voltaje, el sitio de unión de los anticonvulsivantes y anestésicos locales es el segmento S6 del Dominio DIV (en azul), el loop de inactivación esta entre el dominio DIII y DIV (en azul). Los círculos rojos en la conexión de los segmentos S5 y S6 representan el sitio d unión de (TTX) tetrodotoxina. Figura tomada de *Journal of Medicinal Chemistry*, **2001**, *Vol. 44, No. 2,* 117.

La selectividad del canal se debe al asa hidrofóbica SS1-SS2 o región P, que es la que contiene el filtro selectivo para iones. Forma parte de la entrada extra celular del canal. Está presente en los cuatro dominios [10] (Figura 2).

La selectividad a los iones catiónicos se debe a las cargas negativas de los carboxilos del glutámico, y los residuos de lisina y alanina hacen que sean permeables a los iones sodio (más pequeño) y no al ión calcio (más grande).[11]

La inactivación rápida (milisegundos) del canal esta relacionada con el asa o loop que une los dominios III y IV.[12] Muy poco se sabe de los requerimientos estructurales y mecanîsticos de la inactivación lenta (segundos)[13] aunque estudios

de mutación sobre DII S4[14] y DIVS4[15] sugieren que estos segmentos juegan un papel importante en la inactivación lenta.

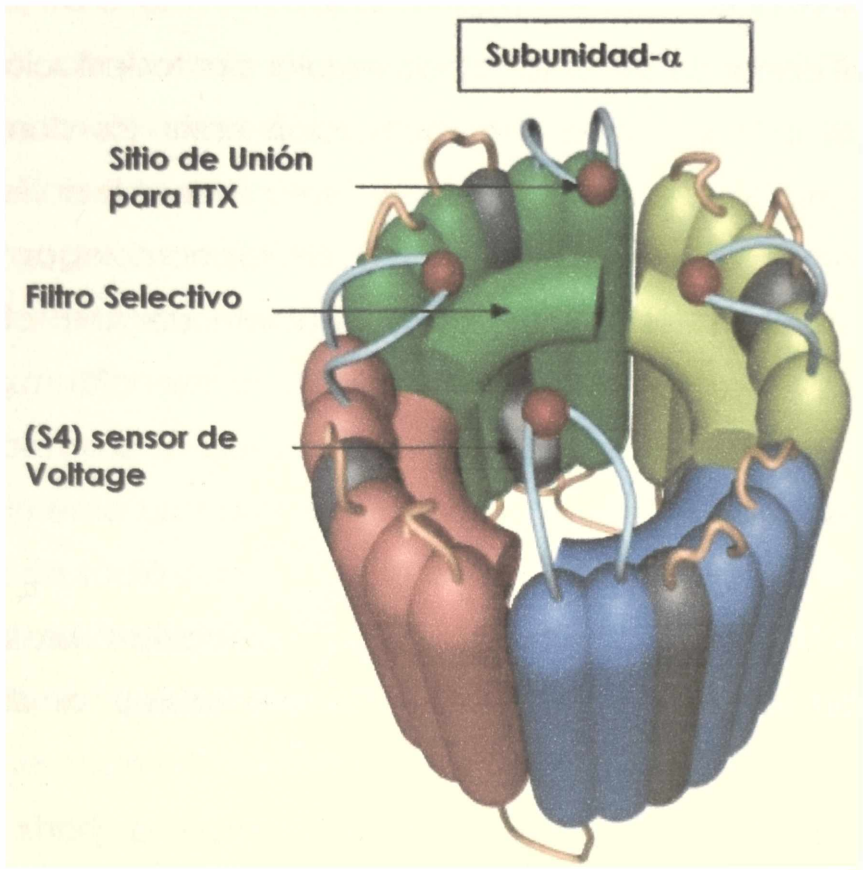


Figura 2. Esquema de la subunidad-α del canal de sodio, vista desde arriba (extacelular). Se observa el sitio de unión o binding de TTX (tetrodotoxina), el filtro selectivo para iones sodio y el segmento IV, censor del voltaie.

Los anestésicos locales así como los anticonvulsivantes se unen en un sitio del segmento S6 del Dominio D IV, del lado intracelular de la membrana según lo indicado en experimentos de mutagénesis. [16, 17]

Sin embargo, a pesar de que se sabe bastante acerca del canal de sodio voltaje dependiente, aún no es posible construir un modelo tridimensional del sitio activo donde actúan los fármacos anticonvulsivos.

Hasta el momento no se logró obtener la estructura cristalina del canal. Se esta intentando aislar el canal de sodio a partir de la bacteria *B. Halodurans* para cristalizar las proteínas que lo integran.[18, 19]

MacKinnon y colaboradores construyeron la imagen por resolución atómica del canal de potasio llamado KcsA obtenido de la bacteria *Streptomyces lividams*. Usando técnicas de cristalografía por Rayos X consiguieron obtener la región del poro de dicho canal.[20] Esta información se utilizó para construir un modelo de la región del poro del canal de sodio[21] y así poder predecir el sitio de unión de anticonvulsivantes y anestésicos locales en el Dominio DIV del segmento S6.

A. Burns

3.1.3 Modulación del canal

La función de compuerta del canal de sodio se puede regular por fosforilación de proteínas. La fosforilación de la compuerta de inactivación entre los dominios homólogos III y IV por la cinasa de proteína C vuelve lenta la inactivación. La fosforilación de los sitios en el asa intracelular entre los dominios homologos I y II por cinasa de proteína C o cinasa de proteína P dependiente de AMP cíclico reduce la activación del canal de sodio.[22]

3.1.4 Biología Molecular de los canales de sodio

Los canales de sodio son una clase heterogénea de complejos proteicos constituida por una subunidad-α funcional y dos subunidades-β auxiliares, moduladoras del canal.

Se identificó en más de un 90% la secuencia aminoacídica a partir del conocimiento de los genes de canales de sodio de cerebro siendo estos: SCN1A, SCN2A, y SCN3A. Se observó que estos tres genes pueden variar o mutar.[23] Mutaciones en el gen SCN1A son responsables de convulsiones febriles simples[24], epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GES+)[25], y epilepsia refractarias con convulsiones tónico-clónicas en niños[26].

3.1.5. Mecanismo de acción fisiológico

Los *canales de Na^+* juegan un papel importante en la red neuronal, transmitiendo impulsos eléctricos rápidos a través de células vecinas, y de este modo coordinan procesos mucho más complejos como la locomoción y los procesos cognitivos.[27] Estos canales son grandes proteínas que atraviesan las membranas celulares, capaces de cambiar a diferentes estados, permitiendo una permeabilidad selectiva a los iones sodio. Para este proceso, se necesita un potencial de acción que despolariza la membrana, de ahí el nombre de canales voltaje-dependientes.

En las **células neuronales**, el potencial de acción comienza con un flujo de iones Na^+ hacia el interior de la célula a través de los ***canales de sodio***, resultando en una ***despolarización***, mientras que la recuperación implica la salida de un flujo de iones K^+ a través de los *canales de K^+*. Ambos flujos ocurren por *difusión pasiva*.

En los años 1950s Hodgkin y Huxley[28] revelaron el mecanismo de acción y función de los canales de sodio. Desde entonces y con el desarrollo de las técnicas patch-clamb, las cuáles son capaces de reconocer canales individuales, y el clonado del primer canal voltaje dependiente logrado por Noda[29], se amplió el conocimiento de los canales de sodio su estructura y funcionamiento.

Los canales de sodio Na^+ son capaces de adoptar tres estados conformacionales: *abierto*, de *reposo o refractario*, e *inactivado*.[30] (Figura 3). Cada estado permite una determinada permeabilidad al Na^+.[31] El canal de sodio experimenta cambios conformacionales durante la activación y desactivación.

Al sobrevenir la despolarización, cada uno de los cuatros dominios homólogos experimenta un cambio de conformación secuencial con un estado activado. El canal de sodio puede abrirse una vez que se han activado los cuatro dominios. La permeabilidad al Na^+ aumenta y este entra en la célula. Luego sigue un retorno al estado normal, se cierra la compuerta de inactivaciónentre los dominios III y IV sobre la boca intracelular del canal y la ocluye. [32]

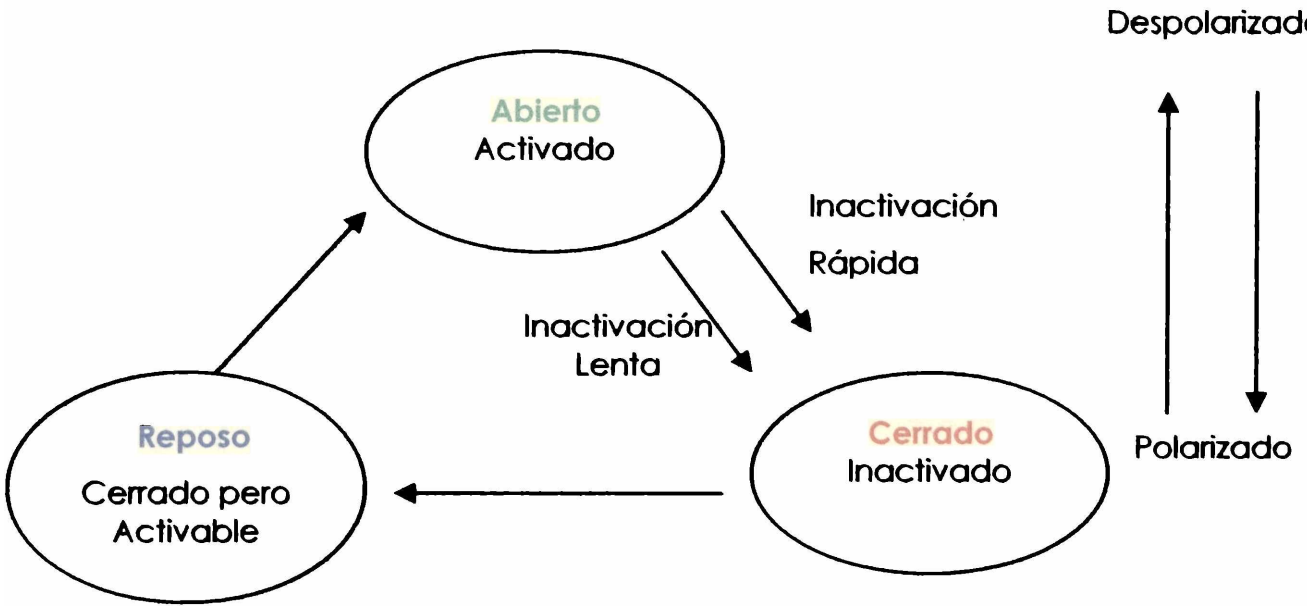


Figura 3. Relación entre los estados Activado, Cerrado y de Reposo del canal de sodio.

3.1.6. Mecanismo de los fármacos antiepilépticos bloqueantes de canales de sodio.

Si se observa un análisis electrofisiológico de neuronas individuales durante una crisis convulsiva parcial, las neuronas presentan una despolarización y potenciales de acción a frecuencias altas [33]

I.A.Barros

Este modelo es típico de las convulsiones y no es normal en la actividad neuronal fisiológica. Por lo tanto, la inhibición selectiva de este modelo de activación podría reducir las convulsiones.

La inhibición a alta frecuencia se considera mediada por la disminución de la capacidad de los canales de Na^+ para recuperarse de dicha activación originada por la despolarización de los canales de sodio en la membrana.

Los fármacos que actúan por bloquec del canal de sodio provocan que el canal permanezca en la forma *inactivada* durante más tiempo y con una despolarización menor a la normal.

Esto es, se requiere la **abertura** iniciada por la despolarización de los canales de sodio en la membrana axoniana de la neurona para que se genere un potencial de acción.

Luego de la abertura los canales se cierran de manera espontánea, proceso que se llama **inactivación.** Esta claro que este canal se puede desactivar a través de dos caminos, uno rápido (milisegundos) y uno lento (segundos o minutos). El pasaje de activado a desactivado se debe a un delicado balance.

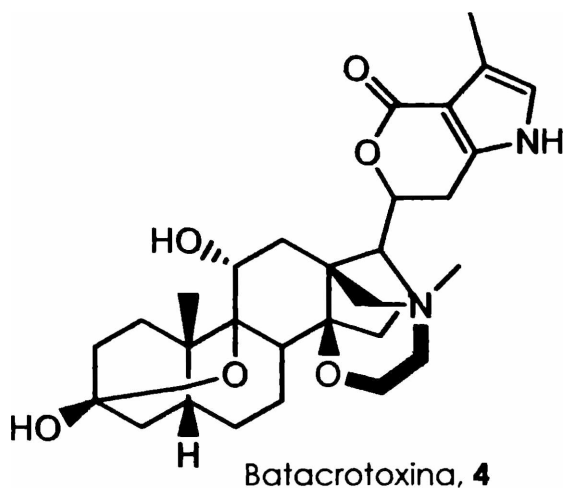
Se piensa que esta *inactivación* daría origen al **período refractario**, lapso breve que sigue a un potencial de acción, durante el cuál es imposible desencadenar otro potencial. Al recuperarse de la *inactivación* los canales quedan preparados para participar en otro potencial de acción. Como la activación a una velocidad baja da un tiempo suficiente para que los canales se recuperen de la *inactivación,* ésta tiene poco o ningún efecto en la estimulación de baja frecuencia de las células normales. Sin embargo, la disminución en la velocidad de recuperación de los canales de Na^+, limitaría la capacidad de una neurona para activar a frecuencias altas, efecto que tal vez fuera la base de la actividad contra las convulsiones parciales de los *fármacos* **carbamazepina, lamotrigina, fenilhidantoína, topiramato, oxacarbamacepina, ácido valproico y zonisamida.** [34] (Figura 4).

Otros fármacos que están en etapa de desarrollo, y que actúan por este mecanismo son: losigamone, 534U87, SL90.0571, y rufinamida.[35] Existe evidencia de que muchos medicamentos anticonvulsivos interactúan con canales de sodio voltaje dependiente.[36,37,38] La droga antiepiléptica fenitoína (PHEN) (**1**), la neurotoxina tetrodotoxina (**2**), y sanitoxina (**3**) fueron las primeras drogas que se estudiaron como bloqueantes de canales de sodio neuronales en desordenes relacionados con el SNC.

Desde entonces, los canales de sodio voltaje dependiente comenzaron a ser un blanco selectivo y/o en combinación con otros procesos celulares, para el tratamiento de la epilepsia y varios tipos de neuropatías. [39,40,41]

Se postula que el sitio de acción de fármacos antiepilépticos se encuentra en el lado intracelular del canal[42], (Figura 1) y al inactivarse se produce una inhibición alostérica del sitio 2 de neurotoxinas.[43] El sitio 2 neurotoxinas se encuentra en los segmentos 6 de los dominios I y IV y las neurotoxinas que se unen en él provocan una prolongada activación del canal.

3.1.7 Estudio funcional: *Binding* a canales de sodio.



Batacrotoxina, **4**

En el estudio funcional de los canales de sodio voltaje dependiente se ha usado como herramienta una gran variedad de toxinas para modularlo. Así se han identificado al menos ocho sitios de unión distintos par neurotoxinas. Generalmente estos canales se dividen de acuerdo a su sensibilidad a tetrodotoxina (TTX). Un solo residuo aminoacídico es crítico para la resistencia a TTX.

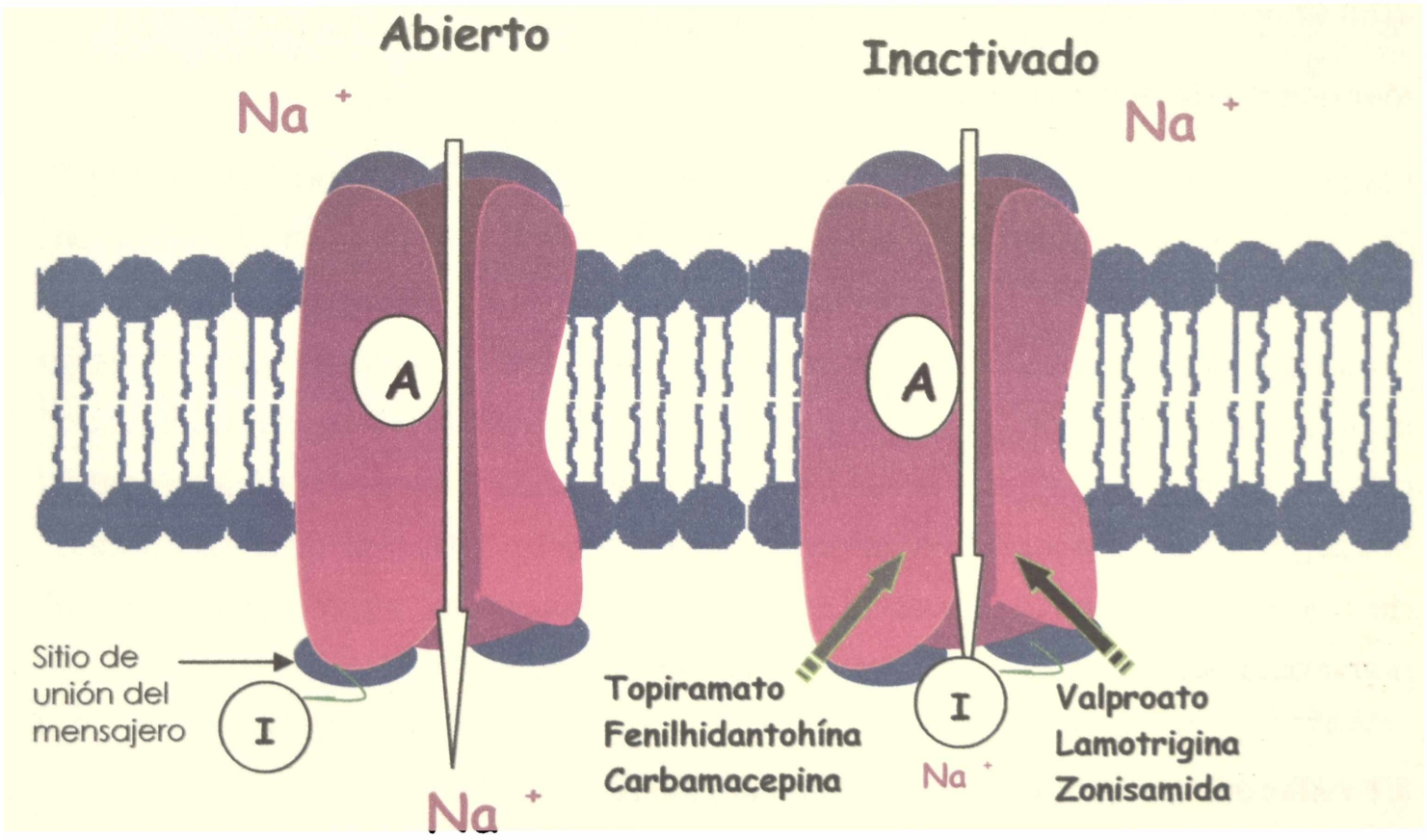
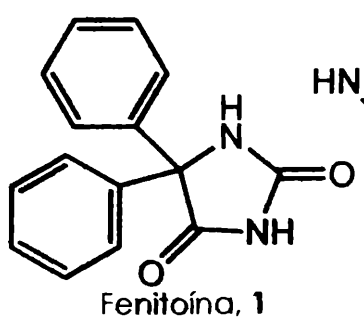
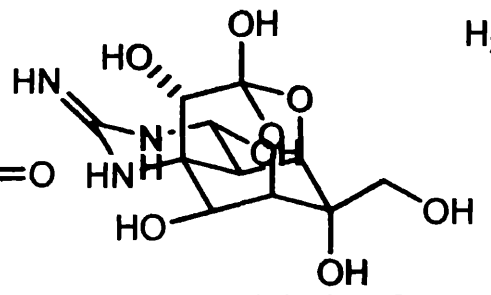


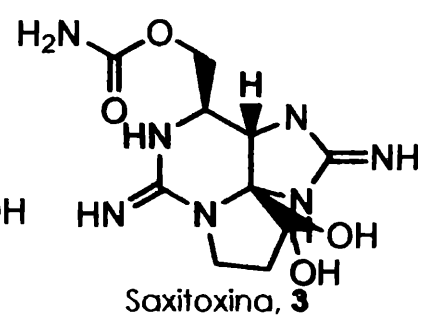
Figura 4. Bloqueo el canal de sodio provocado por drogas anticonvulsivas.
Algunos anticonvulsivos (los nombres se indican en negritas) prolongan la ***Inactivación*** de los canales de Na^+ reduciendo la capacidad de las neuronas para efectuar activación a frecuencias altas. El mismo canal parece conservarse abierto pero queda bloqueado por la compuerta de inactivación (**I**), **A**, compuerta de activación.



Fenitoína, **1**



Tetrodotoxina, **2**



Saxitoxina, **3**

El sitio de unión de Batracotoxina (BTX) **4**, alcaloide aislado del veneno de una especie de rana, se superpone con el sitio de unión de drogas anticonvulsivas, anestésicos locales, y antiarrítmicos generando interacciones alostéricas.[44, 45] BTX estabiliza el canal de sodio manteniéndolo en su forma abierta. En esto último se basa el ensayo *in vitro* de *binding* al sito 2 de BTX, al que se someten las potenciales drogas anticonvulsivas. El sitio 2 de BTX (prototipo de este grupo), se encuentra en los segmentos S6 de los dominios DI y DIV donde se unen además de BTX, aconitina y veratridina, provocando una prolongada activación.[46]

3.1.8 Canales de Ca^{++}.

Mecanismo de acción fisiológico

Los *canales de* Ca^{++} cumplen un papel muy importante en la función neuronal.[47] Se clasifican en cuatro tipos principales: T, N, L y P; encontrándose todos en neuronas. Las descargas de potenciales de acción de las neuronas talámicas son mediadas por la activación de canales de Ca^{++} tipo T regulados por voltaje[48]. Estos canales están controlados por receptores tipo 3-TM. El canal esta constituido por cinco subunidades proteicas, y en este caso cada subunidad proteica tiene tres segmentos transmenbrana los cuales se denominan TM1, TM2, TM3. Los canales de calcio están controlados en el SNC por el L-Glutamato, y son importantes en numerosos procesos incluyendo el aprendizaje y la memoria.

3.1.9 Mecanismo de los fármacos antiepilépticos.

La mayoría de los fármacos útiles en las crisis de ausencia (etosuximida, trimetadiona, ácido valproico), se piensa que actúan inhibiendo la corriente T [49] (Figura 5). Reducen el flujo de Ca^{++} a través de los canales de Ca^{++} tipo T, con lo que se reduce la corriente de marcapasos subyacente al ritmo talámico en espigas y ondas que se registra en las crisis de ausencia generalizada.

A diferencia de las crisis parciales, originadas en regiones circunscriptas en la corteza cerebral, las de inicio generalizado como las crisis de ausencia se inician por activación recíproca del tálamo y de dicha corteza[50].

Por lo tanto, el bloqueo de los canales iónicos voltaje dependientes es un mecanismo de acción frecuente de anticonvulsivos usados en las convulsiones parciales que bloquean los canales de Na^+, y los usados en las crisis de ausencia que bloquean los canales de Ca^{++} dependientes.

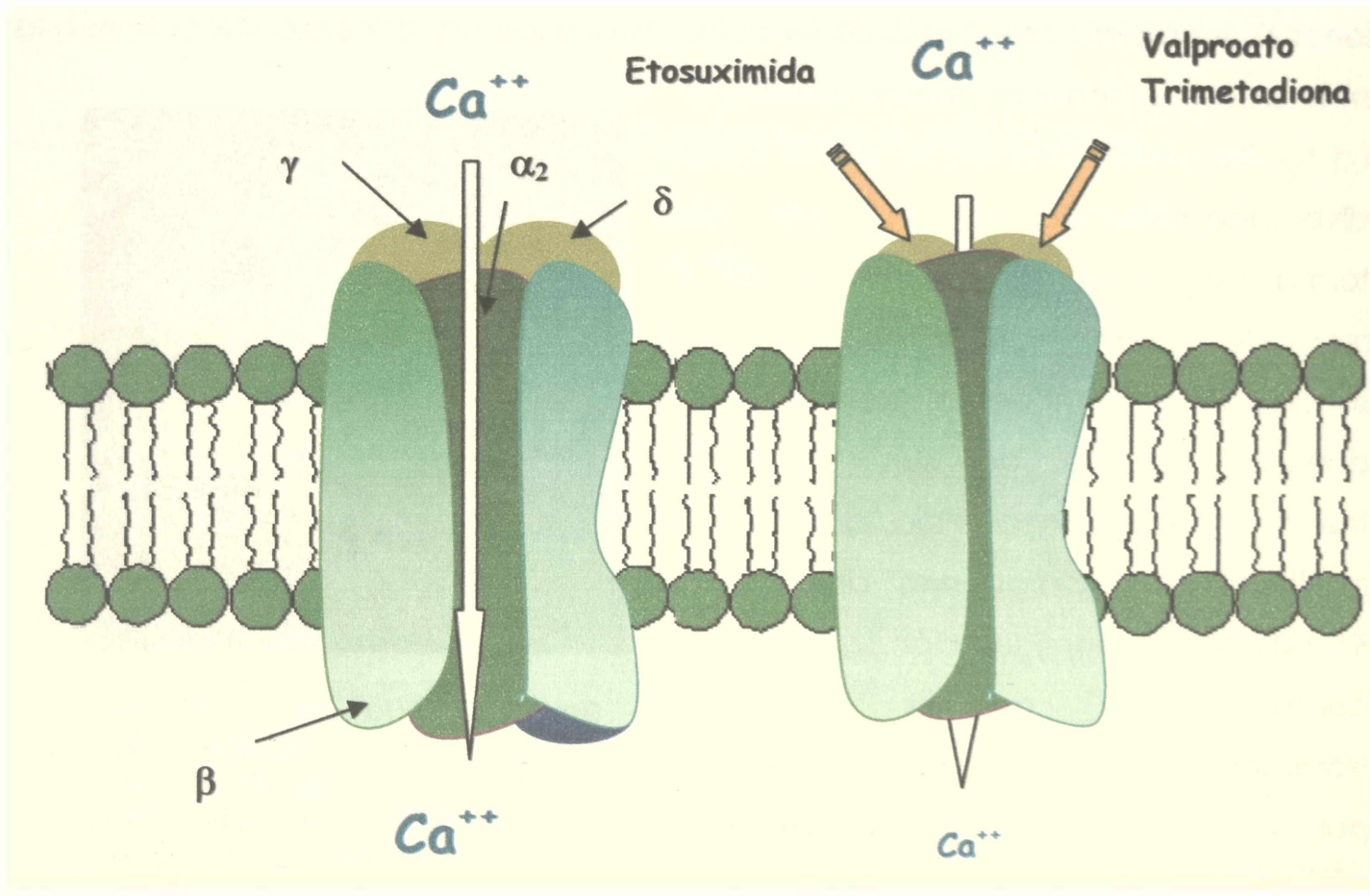


Figura 5. Reducción de la corriente por los canales de Ca^{++} del tipo T inducida por anticonvulsivos. En el canal de la izquierda se observa el ensamble de multisubunidades para los canales de Ca^{++}. Los canales de Ca^{++} requieren diversas proteínas auxiliares pequeñas (α_2, β, γ, δ). Las subunidades α_2 y δ están unidas por un enlace disulfúrico.

3.1.10. Canales de K^+.

El K^+ está asociado al control de la excitabilidad neuronal[51]. La activación de los canales K^+ se cree hiperpolariza las neuronas y por lo tanto las inhibe. Se han desarrollado drogas antiepilépticas para estos canales pero aún ninguna ha logrado atravesar la barrera hemato-encefálica BHE.[52]

Retigabina (D-23129) es el único FAE que muestra una potente y selectiva acción en la corriente M de apertura de canales de Potasio con efecto en KCNQ2/3 y KCNQ3/5 produciendo estabilización de la membrana. La estabilización de la

hiperexitabilidad neuronal también estaría mediada por una corriente GABAérgica.[53]

3.1.11. Estructura del canal de K^+

En 1998, MacKinnon y colaboradores obtuvieron en detalle la primera estructura del canal de Potasio llamado KcsA, por cristalización y posterior cristalografía de Rayos X del canal asilado de una bacteria. El canal de K^+ esta constituido por cuatro subunidades proteícas idénticas[54] (Figura 6).Este canal es muy selectivo a iones K^+ y no permite el paso de iones Na^+ a pesar de que los iones Na^+ tienen la misma carga y son ligeramente menores.[55]

La familia de canales de K^+ posee mayor diversidad molecular que el de Na^+ . Una forma estructural de los canales de K^+ regulados por voltaje consiste en subunidades compuestas por un solo dominio putativo de seis amplitudes transmembrana. En cambio la estructura rectificadora "hacia adentro" del canal de K^+ retiene la configuración general del correspondiente a los segmentos transmembrana 5 y 6, con la región del poro interpuesta. Estas dos categorías estructurales de los canales de K^+ pueden formar hetero-oligómeros. [56]

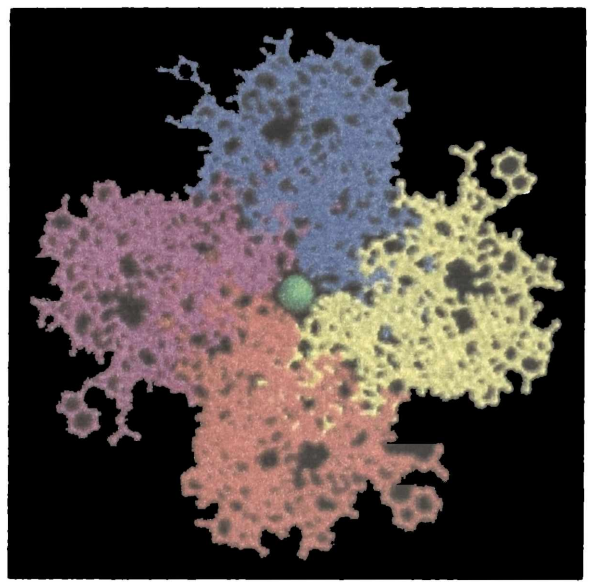


Figura 6. Vista del canal de potasio *KcsA* aislado de *Streptomyces lividans*. Se ven las cuatro idénticas en diferentes colores. En el centro del canal se muestra en verde un ión de potasio. *MacKinnon et. al.*

3.2- Inhibición sináptica mediada por GABA.

Uno de los neurotransmisores más estudiados que juega un papel importante en la epilepsia es el *GABA*, o ácido gamma aminobutírico, el cual es un neurotransmisor inhibidor. [57] Las investigaciones sobre el GABA han conducido a la producción de medicamentos que alteran las cantidades presentes de este neurotransmisor en el cerebro o que cambian la forma en que el cerebro responde a éste.

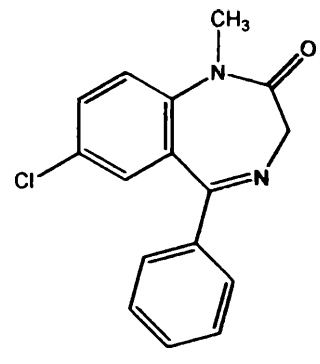
La información obtenida acerca de los mecanismos de las convulsiones sugiere que el incremento de la inhibición sináptica mediada por GABA reduciría la excitabilidad neuronal y aumentaría el umbral convulsivo. [58]

Se supone que diversos fármacos bloquean las convulsiones al regular la inhibición sináptica mediada por GABA a través de su actividad en lugares distintos de la sinopsis.[59]

El $GABA_A$ es el principal receptor postsináptico del GABA liberado en la sinapsis (Figura 9). El receptor $GABA_A$ posee afinidad a ligandos dependiente del ión cloruro, tiene una estructura pentamérica formada por una familia de al menos 16 subunidades (α1-6, β1-3, γ1-3, δ, ε, π, φ) pero que generalmente abarca las subunidades α, β y γ en una relación estequiométrica 2:2:1. La activación de este receptor, inhibe a las células postsinápticas al incrementar el flujo de iones Cl^- al interior de la célula, lo que produce una hiperpolarización de la neurona.

3.2.1.Mecanismo de acción de fármacos antepilépticos GABAérgicos.

❖El sitio de unión de las benzodiazepinas (BZ) es un sitio alostérico localizado entre las subunidades α y γ-2. [60,61,62]



Diacepam, **4**.

Las benzodiazepinas, ejemplificadas con el diazepan (**4**) interaccionan con el receptor $GABA_A$, ocupando las subunidades β y γ2 en conjunto con las subunidades α1, α2, α3, o α5 (pero no las subunidades α4 o α6), siendo estos los cuatro subtipos que reconocen la actividad agonistas de BZ, modulando positivamente la acción del GABA.[63]

Ese mecanismo tal vez sea la base del mecanismo de acción de compuestos como BZ y barbitúricos, que a dosis clínicamente importantes pueden intensificar la inhibición mediada por el receptor $GABA_A$, y así ser eficaces en convulsiones parciales y tónico-clónicas en humanos (Figura 7). A concentraciones más bajas estos fármacos pueden inhibir el estado epiléptico sostenido, y la activación de alta frecuencia de los potenciales de acción.

- El GABA es degradado por una enzima transaminasa de GABA. Algunos fármacos como γ-vinil GABA (Vigabatrina), inhiben irreversiblemente a esta enzima, esto incrementa las concentraciones de GABA disponible para las descarga sináptica, y de ésta manera parece ejercer su acción anticonvulsiva.

I.A.Sanz

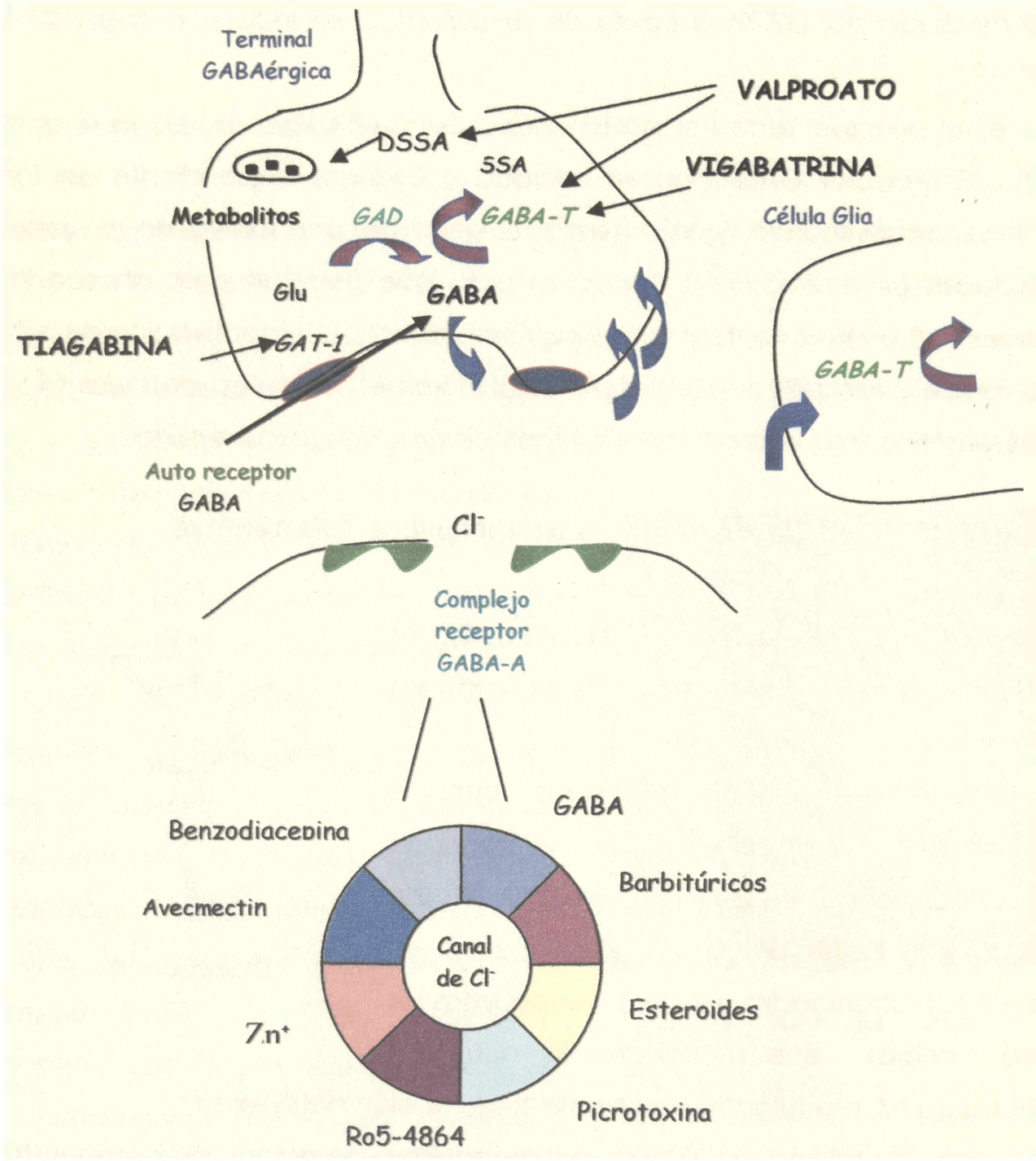


Figura 7. Transmisión sináptica incrementada de GABA mediada por reducción del metabolismo del GABA (**Vigabatrina**), o inhibición del transportador de GABA, GAT-1 por ejemplo por **Tiagabina.** Ssa: Semialdheído Succínico; DSSA: Deshidrogenasa Succínica de Semialdheído.

- El tercer mecanismo posible para la intensificación de la inhibición sináptica mediada por GABA es el que ocurre por inhibición del transportador de GABA, GAT-1 lo que reduce la captación neuronal y glial de GABA. Este parece ser el mecanismo de acción antiepiléptico propuesto para Tiagabina [64](Figura 8).

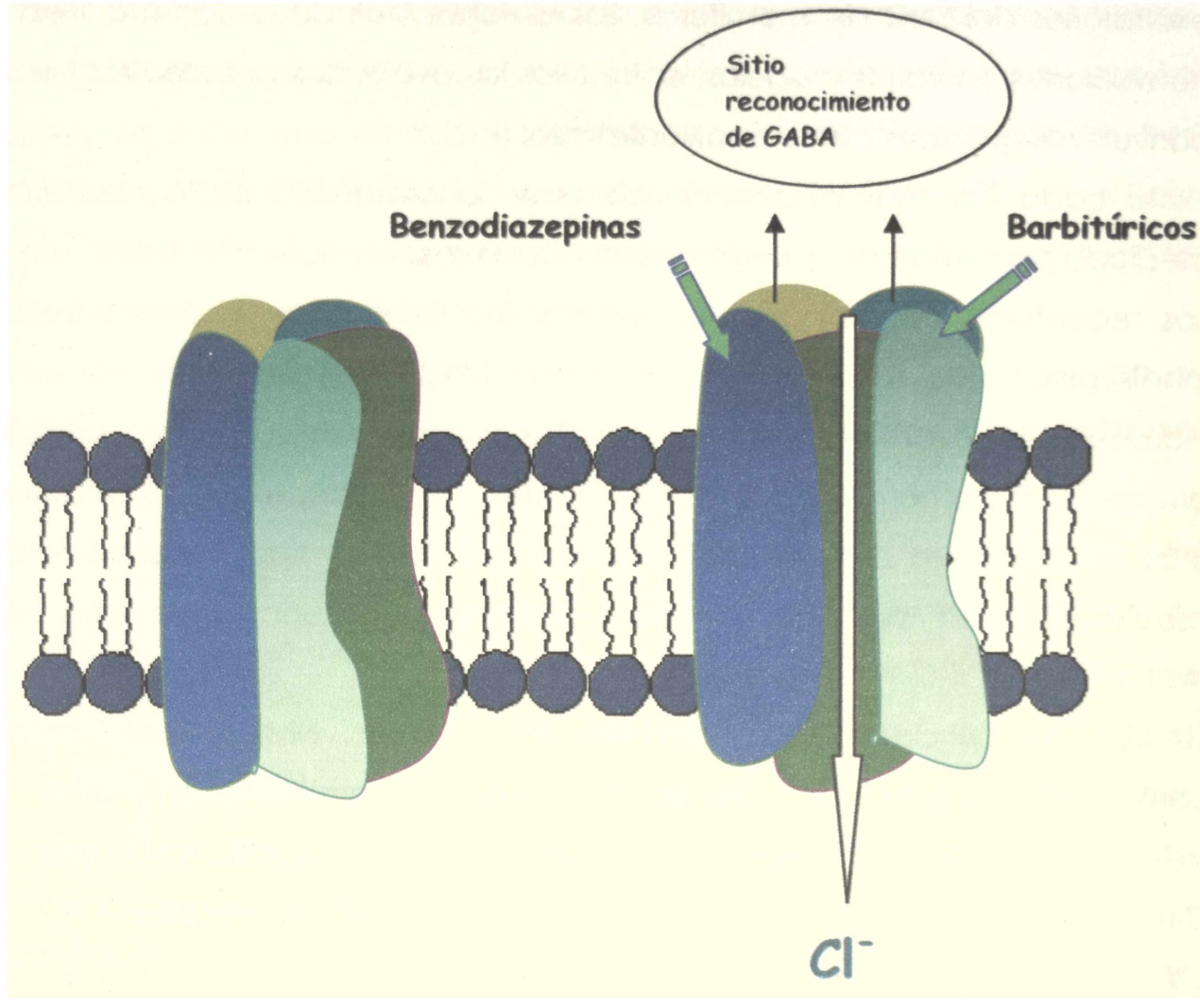


Figura 8. En presencia de GABA, el receptor $GABA_A$, (izquierda), se abre (derecha) permitiendo la entrada de Cl^-, que a su vez incrementa la polarización de la membrana. Algunos antiepilépticos (Barbitúricos y Benzodiacepinas), actúan a nivel de este receptor e incrementan la entrada de Cl^- lo que produce hiperpolarización de la membrana.

- La Gabapentina, estructuralmente relacionada al GABA, a nivel presináptico, promueve la descarga de GABA; en la actualidad se investiga su objetivo molecular, se sabe que no interactúa con los receptores $GABA_A$, no se convierte en GABA, o en un agonista de GABA, y no es un inhibidor de GABA o su degradación. Estudios in vitro con Gapentina marcada, mostraron que en ratas se une a áreas del cerebro de la neocorteza, el hipocampo y espina dorsal. Se ha identificado su unión como auxiliar en una subunidad del canal de Ca^{++} voltaje dependiente pero aún no se conoce el mecanismo de acción como anticonvulsivante. [65]

3.3- Disminución de la excitación mediada por glutamato.

Los estudios farmacológicos pusieron en claro que la microinyección de agonista en diferentes subtipos de receptores de glutamato (NMDA, AMPA, o ácido caínico), desencadenan convulsiones en animales de laboratorio.

Los aminoácidos glutamato y aspartato son los principales neurotransmisores excitatorios del SNC de mamíferos. Los antogonistas de glutamato bloquean las convulsiones en varios modelos, entre ellas las evocadas por electrochoque y por convulsivos químicos como pentilentetrazol (PTZ).[66]

Existe cada vez más evidencia que una anormalidad en la neurotransmisión mediada por glutamato puede causar cuadros epilépticos. [67,68,69, 70,71]

Los receptores de aminoácidos excitatorios contienen al menos tres subtipos ionotrópicos que son N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato, ácido α-amino-3 hidroxi-5-metilisoxazolepropiónoco (AMPA) y uno metabotrópico, éste último se puede clasificar en ocho subtipos diferentes[72]. Los receptores ionotrópicos son los más ampliamente estudiados[73], mientras que los de tipo metabotrópico están asociados a la proteína G y su activación desencadena una respuesta metabólica.

La observación de que antagonistas del receptor NMDA, tanto competitivos como no competitivos, tenían actividad anticonvulsiva en varios modelos animales de epilepsia, impulsó a que se avanzara la investigación en esta línea.[74]

El receptor NMDA consta de un sitio de unión para el glutamato y un sitio para el co-agonista glicina, ambos sitios deben estar ocupados para que se produzca la apertura del canal. Esta apertura permite el pasaje de Ca^{++}, y Na^{+} al interior de la célula y la salida de K^{+}. [75] Drogas clásicas como ácido *valproico, fenitoína, y carbamacepina* bloquean en cierta mediada el receptor NMDA.[76, 77]

Sin embargo todos los fármacos desarrollados como antagonistas selectivos de NMDA, no han dado tan buenos resultados como los esperados debido a su toxicidad, resultaron ser psicotomiméticos, o producen confusión, desorientación y agitación en los pacientes.[78]

Otras estrategias alternativas consisten en usar drogas que actúan en el sitio de unión de la glicina del receptor NMDA, antagonista de los receptores ionotrópicos AMPA y kainato, ligandos del receptor matabotrópico, y fármacos que inhiban la liberación de glutamato. [79, 80, 81, 82, 83, 84.]

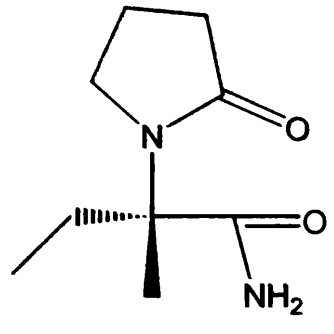
3.4-Proteína de la vesícula sináptica SV2A

Keppra, (Levetiracetam, **6**), un derivado de pirrolidina, es un anticonvulsivo de segunda generación aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en 1999, y ha sido registrado en 46 países para el tratamiento de convulsiones parciales en adultos.[85]

Este muestra un perfil farmacológico nuevo, inhibe crisis convulsivas parciales y tonico-clónicas con generalización consecutiva en el modelo de activación

inducida en ensayos de encendido de amígdalas. Es inactivo frente al ensayo biológico de electrochoque (MES) y el inducido químicamente por pentilentetrazol (PTZ). Se desconoce el mecanismo por el cuál el levetiracetam ejerce su acción anticonvulsiva. Se sabe que no tienen efectos directos en ninguno de los tres mecanismos involucrados en la acción anticonvulsivante (canales de Na^+ voltaje dependiente, transmisión sináptica mediada por GABA o glutamato, o activación de las corrientes de Ca^{+2} voltaje dependientes).

Estudios recientes revelaron que el sitio de unión de 90 kDa, de Levetiracetam y otras lactamas relacionadas, podría representar un nuevo blanco terapéutico para la epilepsia.[86]



Levetiracetam (LEV), 6
(s)- α-etil-2-oxo-pirrolidinacetamida.

Este nuevo sitio de unión es la *proteína de la vesícula sináptica, SV2A*.Las proteínas SV2 son una serie de glicoproteínas de membrana presentes en las vesículas sinápticas e implicadas en la exocitosis de estas.[87,88] Tres isoformas de la proteína SV2 se han identificado con una única distribución en el cerebro, ellas son: SV2A, SV2B y SV2C.[89, 90,91,92] La proteína SV2A es la más ampliamente distribuida, esta presente en el SNC y en las células endócrinas. [93, 94]

Sin embargo, como no se conoce la forma en que funciona la proteína SV2A, se desconoce con exactitud el o los mecanismo/s de acción de LEV. Recientemente el grupo de UCB S.A (Braine l´Alleud, Belgium)[95] intentó solubilizar e inmunopurificar a la proteína SV2A, a partir de membrana de cerebro de rata, con el objeto de estudiar su estructura, interacciones proteína-proteína, etc.[95] La solubilización e inmunoprecipitación de SV2A del cerebro de rata, con LEV unido a su sitio de unión en forma intacta, es el primer paso, para introducirse en el conocimiento de la estructura y función de SV2A y su interacción con las proteínas de la vesícula sináptica.

Por otro lado, en un trabajo actual, LEV mostró inhibir la descarga de calcio, sensibles a IP3 (inositol trifosfato), almacenado en las células PC12. [96]

4. Drogas con Múltiples Mecanismos

Algunos fármacos antiepilépticos como Topiramato, Felbamato y el ácido valproico ente otros, actúan por varios mecanismos anticonvulsivos. Estas drogas son bloqueantes de canales de sodio voltaje dependiente pero también tienen

I.A.Barra

acción en la respuesta de glutamato y GABA. Los múltiples mecanismos que estos compuestos presentan pueden favorecer en parte, a la gran eficacia que muestran en modelos animales y en estudios clínicos. Sin embargo los múltiples mecanismos de acción pueden contribuir a ocasionar diferentes tipos de efectos adversos importantes como problemas cognitivos, como topiramato, o insomnio o desorientación como ocurre con felbamato.[97]

Referencias

[1] Edafiogho, I; Scott,K. Cap.39. Anticonvulsants. En: Manfred E. Wolff (Eds.), *Burger's Medicinal Chemestry and Drug Discovery, 5 th Ed., Vol 3,*: Terapeuthic Agents, John Wiley & Sons Inc., **1996**, 175-254.

[2] C. Wasterlain. in G.Siegel. G. Agranoff. R. W.Albers, and P.Molinoff.Eds. Basic Neurochemestry: Molecular, *Cellular and Medical Aspects., 4 th ed.*, Raven Press. New York. **1989**, 797-810.

[3] Malawska, B.; Kulig, K.; Spiewak, A.; Stables, J.P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 625–632.

[4] Caterrall, W.A. Structure and function of voltaje-gated ion channel . *Trends Neurosci.* **1993**, *16*: 500.506.

[5] Taylor, C.*Mechanisms of New Antiepileptic Drugs*.. En: Delgado-Escueta, A.V.: Wilson, W.A.; Olsen, R.W.; Porter, R.J.; (Eds.) *Jasper's Basic Mechanism of the Epilepsies, 3 rd Ed.: Advences in Neurology , Vol. 79.*, Lippincott, Williams & Wilkins . Philadelphia, **1999**, 1011-1026.

[6] Armijo, J.A.; de las Cuevas, I.; Adín, J. *Rev. Neurol.*, **2000**, 30 (S1), 25-41.

[7] Auld, V. J.; Goldin, A. L.; Krafte, D. S.; Marshall, J.; Dunn, J.M.; Catterall, W. A. Lester, H. A.; Davidson, N.; Dunn, R. J. A.*Neuron* **1988**, *1*, 449-461.

[8] Lu, C. M.; Brown, G. B. *J. Mol. Neurosci.* **1998**, *10*, 67-70.

[9] West, J. W.; Scheuer, T.; Ma¨ chler, L.; Catterall, W. *Neuron* **1992**, *8*, 59-70.

[10] Clarc, J.J.; Tatc, S.N.; Nobbs, M.; Romanos, M.A. *Drug Discov. Today*, **2000**, *5*, 11, 506-520

[11] Armijo, J.A.; de las Cuevas, I.; Adín, J. *Rev. Neurol.*, **2000**, 30 (S1), 25-41.

[12] Armijo, J.A.; de las Cuevas, I.; Adín, J. *Rev. Neurol.*, **2000**, 30 (S1), 25-41.

[13] Ulbricht, W. Science News, **2002**, *161 (10)*, 152.

[14] Fleig, A.; Fitch, J. M.; Goldin, A. L.; Rayner, M. D.; Starkus, J.G.; Ruben, P. C. *Pflugers Arch.* **1994**, *427*, 406-413.

[15] Mitrovic, N.; George, A. L.; Horn, R. *J. Gen. Physiol.* **2000**, *115*, 707-717.

[16] Armijo, J.A.; de las Cuevas, I.; Adín, J. *Rev. Neurol.*, **2000**, 30 (S1), 25-41.

[17] Clarc, J.J.; Tatc, S.N.; Nobbs, M.; Romanos, M.A. *Drug Discov. Today*, **2000**, *5*, 11, 506-520.

[18] Catterall, W.A., *Science*, **2001**, *294*, 2306-2308.

[19] Sansom, M.S.P., Shrivastava, H.I.; *Current Biology*, **2002**, *12*, R65-R67.

[20] Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J.M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; Mackinnon, R. *Science* **1988**, *280*, 69-77.

[21] Lipkind, G. M.; Fozzard, H. A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8161-8170.

L.A.Barrios

[22] Catterall, W.A. *Molecular Properties of Brain Sodium Channels: An Important Targets for Anticonvulsants Drugs* . En: Delgado-Escueta, A.V.: Wilson, W.A.; Olsen, R.W.; Porter, R.J.; (Eds.) *Jasper's Basic Mechanism of the Epilepsies, 3 rd Ed.: Advences in Neurology , Vol. 79.*, Lippincott, Williams & Wilkins . Philadelphia, **1999**, 441-456.

[23] Taylor, C. P.; Narasimhan, L. S. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *39*, 447-98.

[24] M. Mantegazza, A. Gambardella, R. Rusconi, et al. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **2005**, *102*, 1877–1882.

[25] A. Escayg, B.T. MacDonald, M.H. Meisler, et al.*Nat. Genet.*, **2000**, *24* 343–345.

[26] T. Fujiwara, T. Sugawara, E. Mazaki-Miyazaki, et al. *Brain*, **2003**, *126*, 531–546.

[27] Anger, T.; Madge, D.J.; Mulla, M.; Riddall, D. *J. Med.Chem.*, **2001**, *44 (2)*, 115-137.

[28] Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve. *J. Physiol.* **1952**, *117*, 500-544.

[29] Noda, M.; Shimizy, S.; Tanabe, T.; Takai, T.; Kayano, T.; Ikeda, T.; Takahashi, H.; Hakayama, H.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H.; Raftery, M.; Hirose, T.; Inayama, S.; Hayashida, H.; Miyata, T.; Numa, S. Primary Structure of Electrophorus-Electricus Sodium Channel Deduced from Complimentary DNA. Sequence. *Nature*, **1984**, *312*, 121-127.

[30] Edafiogho, I.; Scott, K. *Cap. 39: Anticonvulsants*. En: Wolff, M. (Eds), *Burger's Medicinal Chemestry and Drug Discovery 5 th Ed. Vol3: Therapeutic Agents* , John Wiley & Sons Inc. , **1996**, 175-254.

[31] Catterall W.A. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1987**, *8*, 57-65.

[32]Edafiogho, , I.; Scott, K. *Cap. 39: Anticonvulsants*. En: Wolff, M. (Eds), *Burger's Medicinal Chemestry and Drug Discovery 5 th Ed. Vol3: Therapeutic Agents* , John Wiley & Sons Inc. , **1996**, 175-254.

[33] Goodman & Gilman,A. (Eds), Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10 ma Ed. , Vol.I, McGraw-Hill InterAmericana, México, **2003**, 529-556.

[34] Goodman & Gilman,A. (Eds), Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10 ma Ed. , Vol.I, McGraw-Hill InterAmericana, México, **2003**, 529-556.

[35] Taylor, C.*Mechanisms of New Antiepileptic Drugs.*. En: Delgado-Escueta, A.V.: Wilson, W.A.; Olsen, R.W.; Porter, R.J.; (Eds.) *Jasper's Basic Mechanism of the Epilepsies, 3 rd Ed.: Advences in Neurology , Vol. 79.*, Lippincott, Williams & Wilkins . Philadelphia, **1999**, 1011-1026.

[36] M.Willow and W.A. Catterall. *Mol. Pharmacol.*; **1982**, *22*, 627-635.

[37] M.Willow. R. Gonoi and W. Catterall. *Mol. Pharmacol.*; **1985**, *27*, 549-559.

[38] W.A. Catterall; *Trends Pharmacol. Sci.*, **1987**, *8*, 57-65.

[39] Madge, D. J. Sodium Channels: Recent Developments and Therapeutic Potential. *Annu. Rep. Med. Chem.*; **1998**, 51-60.

[40]Taylor, C. P. Voltage-Gated Na+ Channels as Targets for Anticonvulsant, Analgesic and Neuroprotective Drugs. *Curr.Pharm. Des.*; **1996**, *2*, 375-388.

[41] Taylor, C. P.; Narasimhan, L. S. Sodium Channels and Therapy of Central Nervous System Diseases. *Adv. Pharmacol.*, **1997**, *39*, 447-98.

[42] Edafiogho, , I.; Scott, K. *Cap. 39: Anticonvulsants*. En: Wolff, M. (Eds), *Burger´s Medicinal Chemestry and Drug Discovery 5 th Ed. Vol3: Therapeutic Agents* , John Wiley & Sons Inc. , **1996**, 175-254.

[43] Foster, A.C.; Fagg, G.E.; *Brain Res. Rev.* **1984**, *7*, 103-164.

[44]Clarc, J.J.; Tatc, S.N.; Nobbs, M.; Romanos, M.A. *Drug Discov. Today*, **2000**, *5*, 11, 506-520.

[45] Wang, S.Y.; Mitchell, D.B.; Tikhonov, B.S.; Zhorov, B.S.; Wang, G.K. *Mol. Pharmacol..*, **2006**, *69 (3)*, 788-795.

[46] Clarc, J.J.; Tatc, S.N.; Nobbs, M.; Romanos, M.A. *Drug Discov. Today*, **2000**, *5*, 11, 506-520.

[47] Loscher, W.; Schmidt, D. *Epilepsy Research*, **1994**, *17*, 95-134.

[48] Goodman & Gilman,A. (Eds), Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10 ma Ed. , Vol.I, McGraw-Hill InterAmericana, México, **2003**, 529-556.

[49] MacDonald, R.L.; Kelly, K.M. *Epilepsia*, **1993**, *34, (Suppl. 5)*: S1-S8.

[50] Coulter, D.A. Thalamocortical anatomy and physiology. En: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook. Vol 1.* (Engel, J.Jr., and Pedley, T.A.,eds) Lippincott-Raven, Philadelphia, **1998**, 237, 157-164.

[51] Faingold, C.L. Overview of ion channels, antiepileptic drugs, and seizures. En: Faingold, C.L.; Fromm, G.H. (Eds) *Drugs for Control of Epilepsy: Actions of Neuronal Networks Involved in Seizure Disorders.* CRC Pess, Boca Ratón, Florida, **1992**, 57-68.

[52] Porter, R.J.; Rogawski, M.A. *Epilesia*, **1992**, *33*, S1-S6.

[53] Bialer, M. Johannenssen, S.I.; Kupferberg, H.J., Levy, R. H.; Perucca, E.; Tomson, T. *Epilepsy Research*, **2004**, *61*, 1-48.

[54] MacKinnon's, *Nature*, **2001**.

[55] Morals-Cabral, J.H., Y.Zhou, MacKinnon, R.; *Nature*, **2001**, *414*, 37-42.

[56]Goodman & Gilman,A. (Eds), Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10 ma Ed. , Vol.I, McGraw-Hill InterAmericana, México, **2003**, 529-556.

[57] Ditchter, M.A. Emerging Insight into Mechanism of Epilepsy: Implications for New antiepileptic Drug Development En: Epilepsia Vol.35, raven Press Ltd., New York **1994**, 51-7.

[58] Goodman & Gilman,A. (Eds), Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10ma Ed. , Vol.I, McGraw-Hill InterAmericana, México, **2003**, 529-556.

[59] Mcdonald, R.L., and Greenfield, L.J.Jr. Mechanism of action of new antiepileptic drugs. *Curr.Opin.Neurol.*, **1997**, *10*, 121-128.

[60] Sieghart, W. *Pharmacol. ReV.* **1995**, *47*, 181-234.

[61] Mehta, A. K.; Ticku, M. K. *Brain Res. Rev.* **1999**, *29*, 196-217.

[62] McKernan, R. M.; Whiting, P. J. *Trends Neurosci.* **1996**, *19*, 139-143.

[63] Sigel, E. Mapping of the Benzodiazepine Recognition Site on $GABA_A$ Receptors. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2002**, *2*, 833-839.

[64] Suzdak, P.D., and Jansen , J.A. A review of the preclinical pharmacology of tiagabine: a potent and selective anticonvulsant GABA uptake inhibitor. *Epilepsia*, **1995**, 36, 612-626.

[65] Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg,H.J; Levy, R.H.; Perucca,E.; Tomson,T.; Progress report in New Antiepileptic drugs: a summary of the Seven Eilat Conference (EILAT VII), *Epilepsy Research*, **2004**, *61*, 1-48.

[66] Goodman & Gilman,A. (Eds), Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 10 ma Ed. , Vol.I, McGraw-Hill InterAmericana, México, **2003**, 529-556.

[67] Dingledine, R.; McBain, C.J.; Mc Namara, *J.O. Trends Pharmacol.Sci.*, **1990**, *11*, 334-8.

[68] Loscher, W. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg.*, **1993**, 6, 223-32.

[69] Meldrum,B.S. *Epilepsy Res.*, **1992**, *12*, 189-96.

[70] Rogawaski, M.A.; Porter, R.J.; *Pharmacol. Rev.*, **1990**, *42*, 223-85.

[71] Mutani, R.; Cantello, R.; Gianelli, M.; Bettucci, D. *Rational Basis for the Development of New Antiepileptic Drugs.* En: Pisane, F.; Perucca, E.; Avanzini, G.; Richens, A. (Eds) *New Antiepileptics Drugs. Epilepsy Res. Suppl. 3* , Elsevier, Amsterdan, **1991**, 23-8.

[72] Watkins, J.C., Krogsgaard-Larsen, P. and Honoré T. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1990**,*1*, 25-33.

[73] Ditchter, M.A. Emerging Insight into Mechanism of Epilepsy: Implications for New antiepileptic Drug Development En: Epilepsia Vol.35, raven Press Ltd., New York **1994**, 51-7.

[74] Meldrum, B.S. En: Hitcks, T.P.; Lodge, D.; McLennan, H. (Eds*) Exitatory Amino Acid Transmission, Neurology and Neurobiology,* Vol 24. Alan R. Liss, Inc. , New York, **1987**, *44*, 46-7.

[75] Taylor, C. P.; Narasimhan, L. S. Sodium Channels and Therapy of Central Nervous System Diseases. *Adv. Pharmacol.*, **1997**, *39*,447-98.

[76] Mclean, M.J. Pol.*J. Pharmacol.. Pharm.*, **1992**, *44*, 46-7.

[77] Wamil, A.W.; McLean, M.J.; *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, **1993**, *267(1)*, 218-27.

[78] Taylor, C.*Mechanisms of New Antiepileptic Drugs.*. En: Delgado-Escueta, A.V.: Wilson, W.A.; Olsen, R.W.; Porter, R.J.; (Eds.) *Jasper's Basic Mechanism of the Epilepsies, 3 rd Ed.: Advences in Neurology , Vol. 79.*, Lippincott, Williams & Wilkins . Philadelphia, **1999**, 1011-1026.

[79] Meldrum,B.S. *Epilepsy Res.*, **1992**, *12*, 189-96.

[80] Mutani, R.; Cantello, R.; Gianelli, M.; Bettucci, D. *Rational Basis for the Development of New Antiepileptic Drugs.* En: Pisane, F.; Perucca, E.; Avanzini, G.; Richens, A. (Eds) *New Antiepileptics Drugs. Epilepsy Res. Suppl. 3* , Elsevier, Amsterdan, **1991**, 23-8.

[81] Watkins, J.C., Krogsgaard-Larsen, P. andHonoré T., Structure-activity relationship in the development of excitatory amino acid receptor agonist and competitive antagonist. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1990**,*1*, 25-33.

[82] Carter, A.J., *Drug Future*, **1992**, *17*, 595-613.

[83] Carter, A.J., *Drug Future*, **1992**, *17*, 595-613.

[85] Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg,H.J; Levy, R.H.; Perucca,E.; Tomson,T.; Progress report in New Antiepileptic drugs: a summary of the Seven Eilat Conference (EILAT VII), *Epilepsy Research*, **2004**, *61*, 1-48.

[86] Janz, R. Goda, Y., Geppert, M., Missler, M., Sudhof,T., **1999**, *SV2A and SV2B function as redundant Ca^{++} regulators in neurotransmitter release*. Neuron. *24*, 1003-1016.

[87] K.M. Crowder, J.M. Gunther, T.A. Jones, B.D. Hale, H.Z. Zhang, M.R. Peterson, R.H. Scheller, C. Chavkin, S.M. Bajjalieh, Adnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 15268-15273.

[88] S.M. Bajjalieh, K. Peterson, M. Linial, R.H. Scheller, Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, *90*, 2150–2154.

[89] S.M. Bajjalieh, K. Peterson, M. Linial, R.H. Scheller, Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, *90*, 2150–2154.

[90] S.M. Bajjalieh, K. Peterson, R. Shinghal, R.H. Scheller. *Science, ,* **1992**, *257*, 1271–1273.

[91] S.M. Bajjalieh, K. Peterson, R. Shinghal, R.H. Scheller. *Science, ,* **1992**, *257*, 1271–1273.

[92] R. Janz, T.C. Sudhof. *Neuroscience*, **1999**, *94*, 1279–1290.

[93] S.M. Bajjalieh, G.D. Rantz, J.M. Weimann, S.K. McConnell, R.H.Scheller. *J. Neurosci.*, **1994**, *14* 5223–5235.

[94] K. Buckley, R.B. Kelly. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 1284–1294.

[95] N. Lambeng, M. Grossmann, P. Chatelain, B. Fuks; *Neuroscience Letters*, on-line, **2006**.

[96] M. Cataldi, V. Lariccia, A. Secondo, G. di Renzo, L. Annunziato. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2005**, *313, 720–730.*

[97] Taylor, C.*Mechanisms of New Antiepileptic Drugs.*. En: Delgado-Escueta, A.V.: Wilson, W.A.; Olsen, R.W.; Porter, R.J.; (Eds.) *Jasper's Basic Mechanism of the Epilepsies, 3 rd Ed.: Advences in Neurology, Vol. 79.*, Lippincott, Williams & Wilkins . Philadelphia, **1999**, 1011-1026.

ANEXO 4

Fármacos útiles en el Tratamiento de la Epilepsia

1. Introducción

El anticonvulsivo ideal debería suprimir todas las convulsiones, sin generar efectos adversos de ningún tipo (Tabla 1). Los medicamentos actuales logran el control de la actividad anticonvulsiva en algunos pacientes. Por otro lado causan efectos adversos que van desde trastornos mínimos en el sistema nervioso central hasta muerte producida por anemia aplásica o insuficiencia hepática.

	Propiedades deseables
Eficacia	❖ Selectividad para el tipo de crisis ❖ Efecto aditivo o sinérgico con otros FAE ❖ Eficacia mantenida. ❖ Nuevos mecanismos de acción
Efectos adversos	❖ Mayor índice terapéutico ❖ Ausencia de efectos adversos importantes o crónicos ❖ Los efectos agudos, si los poseen, deben ser leves o transitorios ❖ Ausencia de potencial teratógeno
Farmacéuticas	❖ Múltiples dosificaciones ❖ Múltiples vías de administración
Farmacocinéticas	❖ Perfil simple ❖ No unión a proteínas ❖ Que no se metabolice ❖ Que no induzca enzimas hepáticas ❖ Que no inhiba el metabolismo de otros fármacos ❖ Que no tengan interacciones con otros FAEs u otros fármacos

Tabla 1. Propiedades deseables en un fármaco antiepiléptico.

2. FAEs en uso clínico

2.1 Antecedentes

Hasta hace un poco más de una década se contaba con un número limitado de fármacos antiepilépticos (FAEs) en el mercado, Tabla 2. Las primeras drogas usadas para el tratamiento de la epilepsia, FAEs de *primera generación*, fueron los bromuros en 1857[1], estos fueron la única terapia útil durante 60 años. En 1912 se comercializó el fenobarbital[2] en Estados Unidos. El verdadero descubrimiento de importancia capital fue realizado en 1938, cuando Merrit y Putnam crearon la prueba para ensayar agentes químicos con eficacia anticonvulsiva. Fue así como surgió el uso del electrochoque (MES test) en animales de experimentación. Apareció así la fenilhidantoína (Fenitoína)[3]. Otra prueba importante en animales de laboratorio fue con el agente químico pentilentetrazol. Lo importante es que estas pruebas de investigación aún se siguen usando. Las estructuras químicas de la mayor parte de los anticonvulsivos que surgieron antes de 1965 estaban estrechamente relacionadas con el fenobarbital; entre ellas están las fenilhidantoínas (fenitoína), oxazolidindionas, y succimidas (etosuximida) (Figura 1).

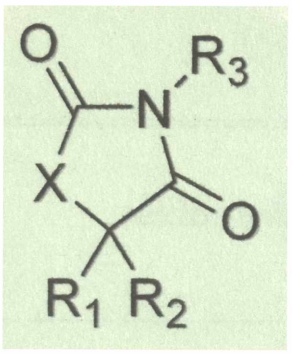


Figura 1. Estructura general de FAEs entre 1912-1960. R_1,R_2, y R_3 representan distintas cadenas laterales.
X= NH (hidantoínas);
X= -CONH- (barbitúricos),
X= O (oxazolidinodionas);
X= CH_2- (succinimidas),
X= NH_2 en acetilureas.

Los compuestos que aparecieron después de 1965 (Figura 2) tienen diversas estructuras químicas. Se evaluaron simultáneamente carbamazepina[4] y en Francia el ácido valproico[5], así como la primidona y trimetadiona (parametadiona).Entre los años 1961 y 1973 sólo surgió el Diacepam comercializado en 1968 como droga auxiliar para el tratamiento de la epilepsia. No fue hasta 1974 que se introdujo la Carbamazepina en el mercado, el clonacepan en 1974 y el ácido valproico (Depakote) recién en 1978, 18 años después de su síntesis.

A partir de 1993 nueve nuevos fármacos antiepilépticos (anticonvulsivos) se introdujeron en el mercado en Estados Unidos parar el tratamiento sintomatológico de las epilepsias parciales (Tabla 2).Estos compuestos poseen diversas estructuras químicas (Figura 3). En la mayoría de los casos la actividad antiepiléptica fue definida utilizando modelos agudos de convulsiones (Anexo 5) m como el ensayo de electroshock (MES test), la inducción química con pentilentetrazol (PTZ test) y el encendido o *kindling*.

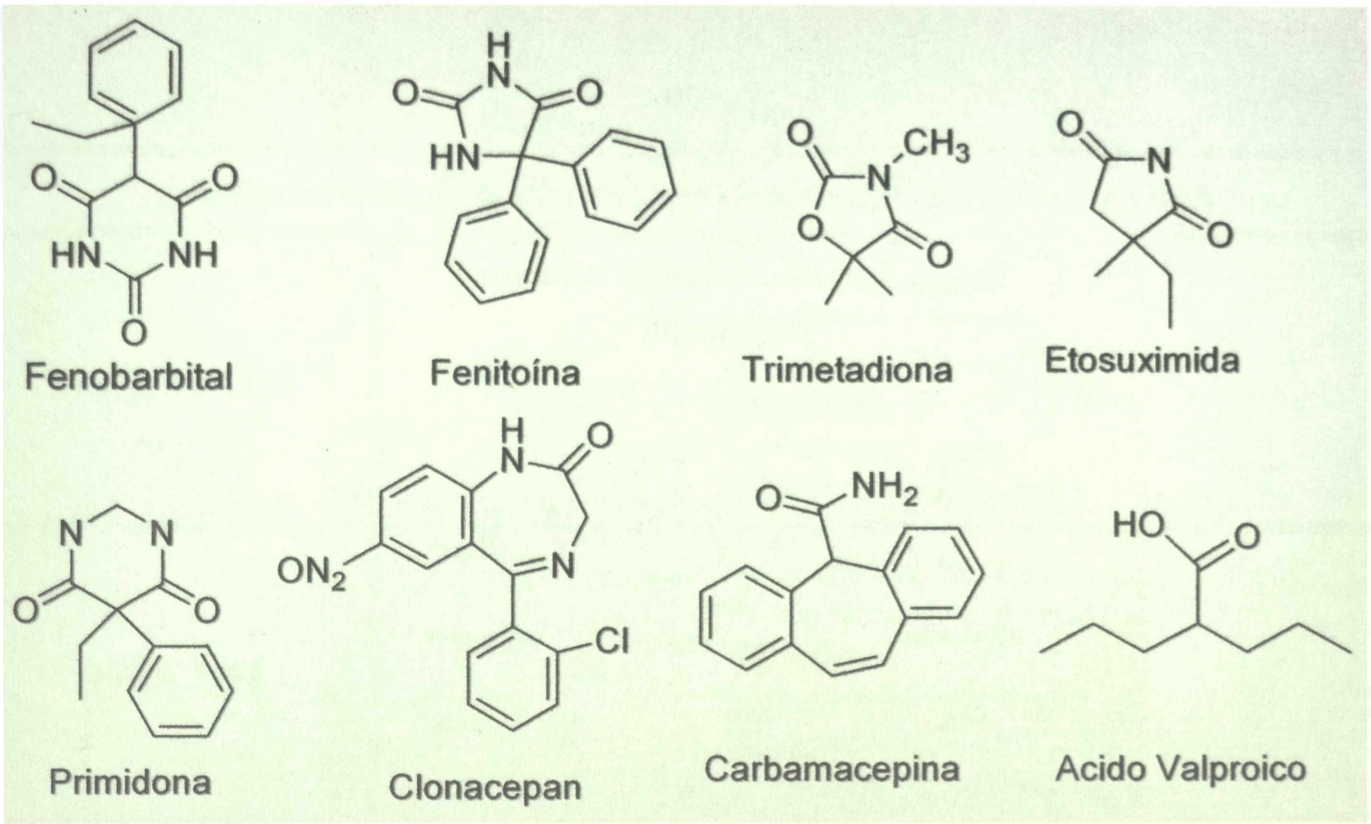


Figura 2. Estructuras de FAEs que surgieron antes de los años '90.

Desafortunadamente, la experiencia clínica hasta el momento, sugiere que ninguno de estos modelos, aunque muy utilizados, han sido capaces de identificar terapias validas para pacientes refractarios.

3. Actualización en el tratamiento Farmacológico de la Epilepsia

3.1 Fármacos de segunda Generación

A partir de los años 90 surgieron una serie de nuevos FAEs. Estos nuevos agentes anticonvulsivos son llamados de *segunda generación*.

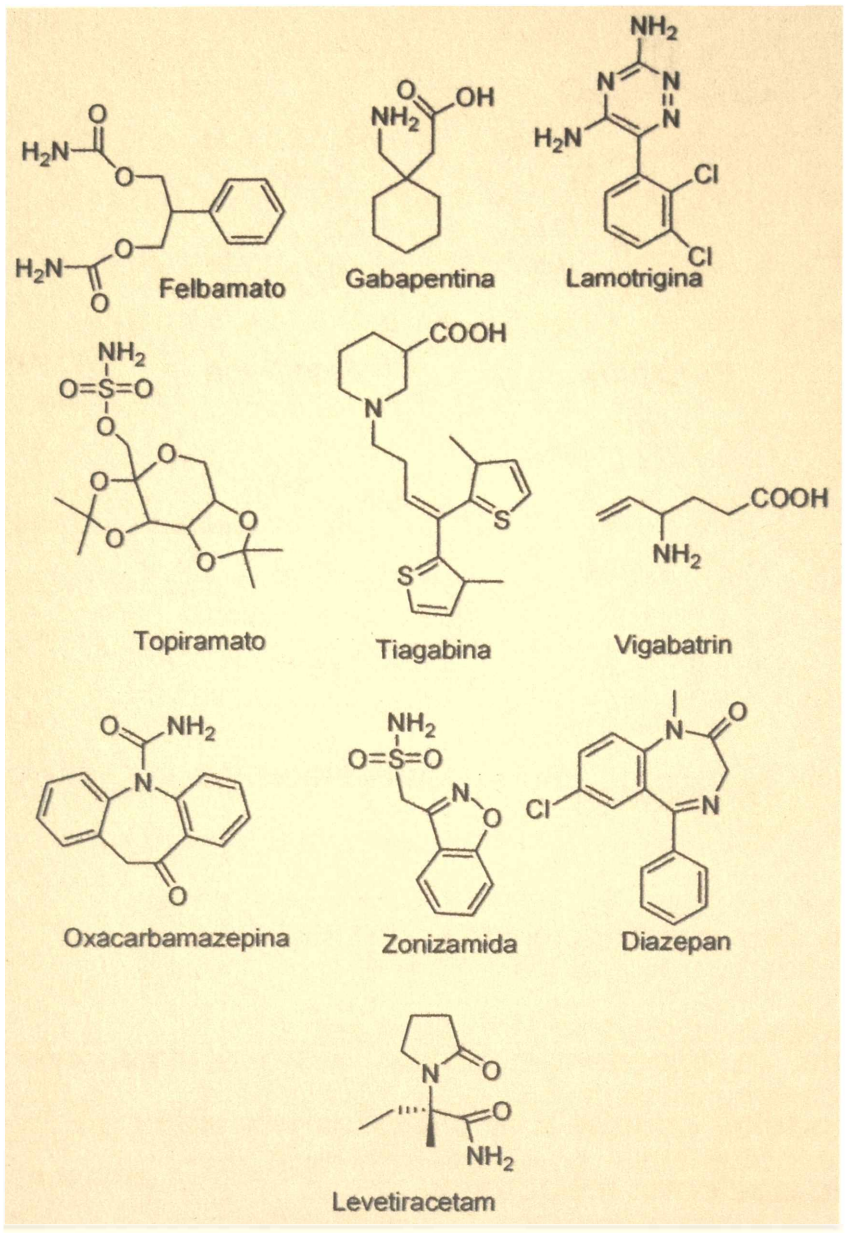


Figura 3. Fármacos antiepilépticos de segunda generación de uso clínico en Estados Unidos (USA).

En la Tabla 2 se enumeran en orden de aparición en el mercado en Estados Unidos[6].

Vigabatrin esta en uso en el Reino Unido desde 1990[7] pero no ha sido aprobado su uso en Estados Unidos. En la Figura 3 se muestran las estructuras de los FAEs de segunda generación en uso clínico en USA.

Comparando la ***eficacia*** de estos nuevos fármacos con los más antiguos o clásicos los primeros resultan ser iguales que estos últimos. Un número significativamente grande de los pacientes con epilepsia, 25-40%, continúa siendo refractario al tratamiento farmacológico. Sólo un porcentaje muy pequeño de los pacientes refractarios (5%) a los viejos FAEs logró controlar las crisis con los nuevos FAEs. [8]

En relación a los efectos adversos, los nuevos FAEs parecen ser mejores, ya que presentan menos efectos adversos.

Anticonvulsivos ordenados por año de disponibilidad en USA	
Antes de 1993	**Fenobarbital** **Fenitoína (Dilantin)** **Primidona (Mysoline)** **Carbamazepina (Tegretol)** **Clonacepan** **Valproato (Depakote)**
1993- 1998	**Felbamato (Felbatol)** **Gabapentina (Neurontin)** **Lamotrigina (Lamictal)** **Topiramato (Topamax)** **Tiagabina (Gabitril)** **Diacepam rectal (Diastat)**
Después de 1999	**Vigabatrin*** **Oxcarbazepina (Trileptal)** **Zonisamida (Zonegran)** **Levetiracetam (Keppra)**

Tabla 2. Anticonvulsivos por año de disponibilidad en USA. Entre paréntesis nombre comercial; tomado de: http://neuroland.com/sz/anticon/. *No se comercializa en USA.

Por ejemplo estos no poseen efectos de osteoporosis por lo que resultan ser mejores para el tratamiento de la epilepsia en ancianos. Por otro lado su **farmacocinética** también es mejor.[9]Una reducción de toxicidad o interacción con otros fármacos y una farmacocinética simplificada favorece el uso de los nuevos FAEs.

Año de Aprobación por FDA	Fármaco
1993	Felbamato
1993	Gabapentin
1994	Lamotrigina
1996	Fosfenitoína
1996	Topiramato
1997	Tiagabina
1999	Levetiracetan
2000	Oxacarbamazepina
2000	Zonizamida

Tabla 3. Fármacos anticonvulsivos de segunda generación por orden de aprobación para su comercialización en Estados Unidos.

A. Barrios

4. Datos preclínicos de nuevos FAEs en uso clínico y en desarrollo.

En la Tabla 4 y 5 se muestran los datos preclínicos de FAEs de segunda generación en uso clínico y los FAEs en desarrollo. Resulta interesante comparar estos datos con los obtenidos en el presente trabajo de Tesis. En la Figura 4 se muestran las estructuras químicas de fármacos en desarrollo.

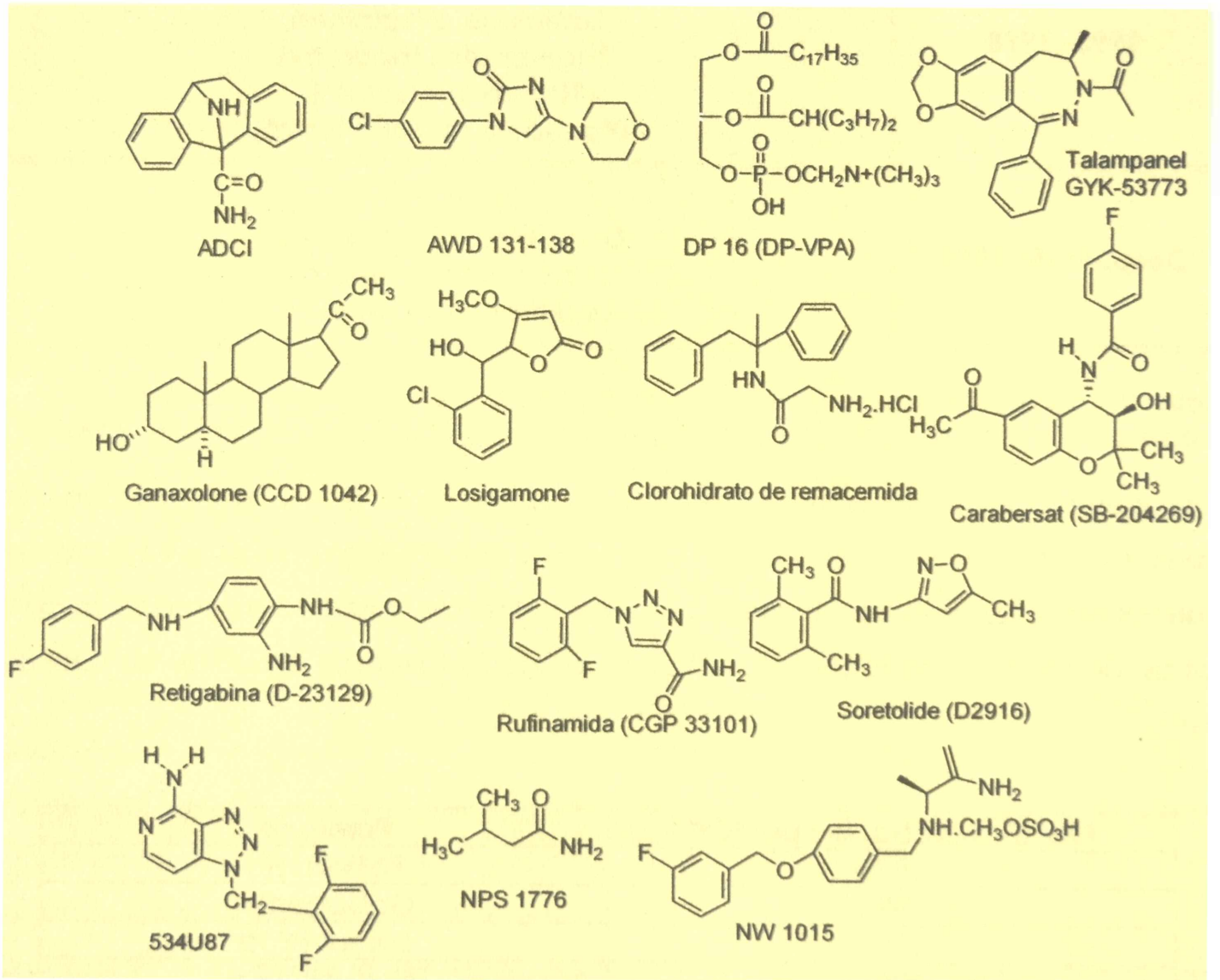


Figura 4. Estructuras químicas de FAEs en desarrollo (Etapa clínica).

Fármacos de segunda generación en uso clínico	Mecanismo Principal Asociado	Actividad en Animales de Experimentación			Dosis diaria• en humanos mg
		MES test ED_{50} (mg/kg)	PTZ test ED_{50} (mg/Kg)	Encendido Amígdala ED_{50} (mg/Kg)	
		Convulsión Tónica	Convulsión Clónica	Convulsión Focal	
Carbamazepina	↓ Na^+	+	NE	+	400-1200
Fenitoína	↓ Na^+,	9.5	NE	+/-	200-500
Acido Valproico	↓ Na^+ ↑ GABA	+	+	+	1000-2500
Felbamato	↓ Glutamato (?)	81.1	548	?	1200-3600
Gabapentin	↑ GABA (?)	9.4 (oral)	157	NE	600-2400
Oxacarbamaze-pina	↓ Na^+	10-20 (oral)	23-30 (oral)	?	600-1200
Tiagabina	↑ GABA	30	1	+	16-56
Topiramato	↑ GABA	64♦	NE	?	100-400
Zonizamida	↓ Na^+	+	NE	+	200-600
Lamotrigina	↓ Glutamato (?) ↓ Na^+ (?)	2.6	8	+	100-200
Levetiracetan	(?)	NE	NE	+	1000-3000
Fosfenitoína	↓ Na^+	9.5	NE	?	Similar fenitoína
Vigabatrin ♠	↑ GABA	+	NE	+	-

Tabla 4. FAEs en uso clínico. En negro Fenitoína, Carbamazepina y Valproato anticonvulsivos clásicos. En violeta fármacos de segunda generación en uso clínico en Estados Unidos. En los casos en que se dispone de datos de ED_{50} se coloca el valor , caso contrario los signos +: activo; NE: no efectivo; +/- : actividad moderada. ¿?: datos dudosos. Los datos de ED_{50} siempre son en ratones, vía de administración *i.p.* ♠No se usa en Estados Unidos. • Datos tomados de: *Epilepsy & Behavior* , **2004**, *5*, 866–872. ♦ *Journal of Medicinal Chemistry*, **1987**, Vol. 30, No. 5, *880*.El mecanismo principal de acción y ED_{50} fueron tomadas de *Epilepsy Research*, **2004**, *61*, 1–48.

L.A.Barrios

Fármacos en desarrollo	Mecanismo Principal Asociado	Actividad en Animales de Experimentación		
		MES test ED_{50} (mg/kg)	PTZ test ED_{50} (mg/Kg)	Encendido Amígdala ED_{50} (mg/Kg)
Rufinamida	↓ Na^+		+	+
ADCI	↓ Na^+	8.9		
Pregabalin (CI 1008)	?	20	100	+
Retigabina	↓ Na^+, y Ca^{++}	+	+	0.01♣
AWD 131-138	?	+/-	46	30-100
Ganaxolone	Modula el receptor $GABA_A$	+/-	5	?
Soretolide	↓ Na^+	19	250	?
TV 1901 o N-Valproilglicinamida	↑ GABA	152	127	?
534U87	?	3.7 (oral)	NE	?
Harkoseride ♥	?	3.9	¿?	13.5
LY300164	Antagonista AMPA	4.6	116.8	12.5 (químico) 20 (eléctrico)
NPS 1776	?	913 (oral)	748	?
NW-1015 ♣	↓ Na^+	8.2 (oral)	NE	?
Carabersat	?	+ (similar Fen)	+	?
Conantokin-G	Modula receptor NMDA	+	+	+
Talampanel	Antagonista AMPA	4.6	16.8	12.5-20

Tabla 5. Fármacos en etapa de desarrollo. ♣Es la única droga hasta el momento más activa frente al ensayo de Encendido de amígdala que al MES test. ♥ **Datos tomados de: Eliat V**: *Epilepsy Research*, **2001**, 43, 11–58. ♣ **Eliat VI**: *Epilepsy Research*, **2002**, *51*, 31-71. En los casos en que se dispone de datos de ED_{50} se coloca el valor, caso contrario los signos +: activo; NE: no efectivo; +/- : actividad moderada. ¿?: no se encuentra el valor. Los datos de ED_{50} siempre son en ratones, vía de administración *i.p.* Los datos fueron tomados de: *Epilepsy Research*, **2004**, *61*, 1–48.

5. Eficacia de los FAEs de segunda generación

En Estados Unidos existe una GUIDELINE para el uso de fármacos de nueva generación. La Organización Mundial de la Salud en su formulario modelo del Sección 5: Anticonvulsivos/ Anpiepilépticos del año 2004 establece los medicamentos de primera elección a usar en el tratamiento farmacológico de la epilepsia.

En la Tabla 5 se presentan los fármacos de nueva generación que se usan principalmente como medicamento de segunda elección en *epilepsias refractarias*, y los aprobados como monoterapias.

Los FAEs de nueva generación se usan en pacientes con *epilepsia refractaria*, principalmente por su alto costo. No justifica su uso como medicina de inicio de tratamiento. En general los tratamientos se inician con los fármacos antiguos o clásicos (Tabla 1), ya que respecto a su eficacia estos son iguales a los de nueva generación y más económicos.

Fármaco	Comienzo con Epilepsia Parcial	Síndrome Generalizado	Monoterapia
Felbamato	X	X	X
Gabapentina	X		
Lamotrigina	X	X	X
Topiramato	X	X	X
Tiagabina	X		
Oxacarbamazepina	X		X
Levetiracetan	X		
Zonizamida	X		

Tabla 5. Fármacos aprobados en Estados Unidos. Se recomienda utilizarlos en epilepsias refractarias, no como fármacos de primera elección.

6. Cuándo utilizar FAEs nuevos ?

En general se recomienda utilizarlos en pacientes con epilepsia refractaria.

En *epilepsias parciales* no hay diferencia con los antiguos con respecto a su eficacia. Depende del perfil del paciente. En *epilepsias generalizadas* se recomienda utilizar FAEs de amplio espectros.

7. Efectos Adversos de los nuevos FAEs

Los efectos adversos se miden en función de la calidad de vida del paciente. Esta va a depender de los ataques epilépticos que sufra el paciente y de los efectos secundarios de los fármacos que se administren.

A medida que aumentan los efectos secundarios la calidad de vida del paciente empeora.

LA Bamos

Según un estudio realizado por Guiliam[10] y colaboradores dentro de los fármacos de segunda generación dentro de los que poseen menores efectos adversos se encuentran: Lamotrigina, Gabapentina y por último Carbamacepina.

7.1 Principales Desventajas de los Nuevos FAEs[11]

Dentro de los efectos adversos los que principalmente se observan están relacionados con sedación, el peso, hiponatruremia, cognitivos, nefronefritis. En la Tabla 6 se resumen los principales efectos adversos de los FAEs de nueva generación aprobados en Estados Unidos.

Fármaco	Efecto Adverso principal
Lamotrigina	Enfermedad de Steven´s John
Gabapentina	Peso, sedación
Levetiracetan	Irritabilidad, cambio en el comportamiento
Oxacarbamazepina	Hiponatruremia, agrava epilepsia generalizada
Tiagabina	Sedación, agrava epilepsia
Topiramato	Cognitivo, lenguaje, acidosis, disminución de peso, glaucoma, nefroneflitis
Zonizamida	Irritabilidad, Peso, fotofobia, nefronefritis.

Tabla 6. Principales efectos adversos de los FAEs de nueva generación.

7.2 Influencia en el Peso

En la Tabla 7 se resumen los efectos de los FAEs observados en clínica sobre el peso. Se muestran los FAEs que producen ganancia de peso, perdida de peso y aquellos que no afectan el peso.

Ganancia de Peso	Neutral	Perdida de Peso
Acido Valproico	Lamotrigina	Topiramato
Carbamazepina	Levetiracetan	Felbamato
Gabapentina		Zonizamida

Tabla 7. Influencia de los FAEs sobre el peso.

7.3 Teratogenis

FAEs de primera generación como el Felbamato[12] y el Acido Valproico[13] (VPA) tienen un riesgo significativo.

El **VPA** a dosis menores de 500 mg/día no es de riesgo pero si a mayores dosis.

Lamotrigina a dosis menores de 200 mg/día no presenta problemas, a dosis de más de 300 mg/día tiene un efecto significativo.

Carbamazepina parece ser segura.

Sobre los otros fármacos de segunda generación existen pocos datos al respecto.[14]

7.4 Sobredosis

Es importante evitar sobredosis. Se han estudiado casos donde por encima de determinados valores de dosis esta ya no tiene importancia en el mejoramiento de la enfermedad y si se agravan los efectos adversos.

Es importante administrar dosis moderadas si bien es cierto que los efectos secundarios en los FAEs nuevos son menos importantes que en los antiguos.

Algunos valores a tener en cuenta son:

Fármaco	Dósis recomendada
Carbamazepina	∠ 600 mg/día
Acido Valproico	∠ 1 g/día
Lamotrigina	∠ 200 mg/día

Tabla 8. Dosis diaria recomendada.

8. Farmacocinética

La acción de los fármacos no depende únicamente de su capacidad para desarrollar una respuesta farmacológica. Es de importancia crítica que posean propiedades farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolización y excreción) que les permita alcanzar el lugar requerido para su acción y que su toxicidad sea mínima. Las propiedades fisicoquímicas de un fármaco van a determinar su capacidad para atravesar membranas biológicas, para depositarse en los tejidos grasos, unirse a proteínas séricas, o finalmente unirse a un receptor específico para ejercer su acción antes de sufrir su transformación metabólica, eliminación o ambas.

8.1 Unión a proteínas.

En los FAEs la unión a proteínas no es deseable por que si el fármaco se une a proteínas no es capaz de atravesar la Barrera Hematoencefálica (BHE).

A.Barrios

Fenitoína, Ácido Valproico, Carbamazepina, Vigabatrina tienen una unión alta a proteínas.

8.2. Eliminación hepática y renal

Los FAEs antiguos tienen en su mayoría una eliminación hepática. En la eliminación hepática esta involucrado el citocromo P-450, que es principal catalizador de las reacciones de oxidación (Fase I). En la Tabla 9 se resumen la principal vía de eliminación de los FAEs de última generación. Se incluye el ácido valproico.

Fármaco	Eliminación
Carbamazepina	Hepática- Citocromo P- 450
Acido Valproico	Hepática- Citocromo P- 450
Fenitoína	Hepática -Citocromo P- 450
Etosuximida	Hepática -Citocromo P- 450
Tiagabina	Hepática - Citocromo P- 450
Gabapentina	Renal – no interacciona con otros fármacos
Levetiracetan	Hepática por hidrólisis
Lamotrigina	Hepática por glucorunización

Tabla 9. Eliminación y metabolismo de FAEs.

8.3 FAEs y el citocromo P450

Todos los FAEs antiguos menos el Acido Valproico son inductores. Los fármacos inductores aceleran el metabolismo y reducen la concentración plasmática de otros fármacos como por ejemplo:

- Antidepresivos y antipsicóticos
- Warfarina
- Fármacos quimioterapeuticos
- Anticonceptivos orales
- Vitamina D y Calcio (produce osteoporosis)

8.4 Metabolismo no Hepático

Gabapentina y **Levetiracetan** no tienen metabolismo hepático por lo que no interaccionan con otras drogas.
Estos fármacos son de elección para pacientes con:

- ❖ Enfermedades hepáticas
- ❖ Transplantes de órganos
- ❖ Enfermos de cáncer

8.5. Glucorunización hepática

Lamotrigina: Glucorunización hepática

El metabolismo de Lamotrigina se ve enlentecido por el uso con ácido valproico, por lo que se recomienda usar dosis bajas en esta asociación.
El metabolismo se ve acelerado por hormonas esteroideas gonadales por lo que se debe usar dosis altas cuando se toman anticonceptivos orales y en el embarazo. No se recomienda usar **Lamotrigina** durante la lactancia ya que la glucorunización esta inmadura en el recién nacido.
Para el tratamiento de ancianos se recomienda: **Lamotrigina** y **Gabapentina.**

9. Resistencia

Las epilepsias de nuevo inicio, que se tratan con un FAE si fallan en la eficacia no en los efectos adversos es un mal indicio ya que es probable que no se encuentre un fármaco eficaz para estos pacientes.
Un tercio de los enfermos son refractarios estos quiere decir que no responden a los tratamientos con FAEs existentes en el mercado.
Los síndromes idiopáticos se controlan mucho mejor. Las epilepsias sintomáticas con daño cerebral son mucho más difíciles de controlar.
La resistencia esta relacionada a :

- Número de crisis
- Daño cerebral

Si dos o tres medicamentos fallaron en un paciente hay que pensar en tratamientos alternativos:

- ❖ Cirugía
- ❖ Dieta Cetogénica
- ❖ Drogas de Mecanismo de acción nuevos
- ❖ Estimulación Vagal
- ❖ Estimulación Cerebral directa

10. FAEs que empeoran las crisis epilépticas

Pueden los FAEs agravar las crisis epilépticas?

Estudios basados en observaciones clínicas en un gran número de pacientes han demostrado que algunos FAEs pueden agravar las crisis epilépticas. Se ha observado que FAEs que se utilizan en las convulsiones criptogénicas como Fenitoína y Carbamazepina, producen trastornos en la conducta y perdida de la atención.

Los criterios que se utilizaron para determinar la agravación de las crisis con el uso de determinados anticonvulsivos fueron:

Relación temporal
Relación con la dosis
Comienzo rápido
FAE con el uso repetido causa el mismo efecto
Ausencia de otros efectos adversos

10.1. Mecanismo de agravación de las crisis:

- Las crisis generalizadas empeoran con el uso de **fármacos Gabaérgicos** que aumentan la concentración de GABA.
- Por otro lado **fármacos bloqueantes de canales de sodio** empeoran las crisis de ausencia o las crisis mioclónicas.

10.2. FAEs Gabaérgicos

En crisis de Ausencia suele usarse Etosuximida. El mecanismo por el cuál ejerce su acción es por bloqueo canales de Ca^{++} tipo T en el Tálamo. FAEs que actúan sobre receptores $GABA_B$ talámicos empeoran las crisis generalizadas.[15]

Otros fármacos que empeoran los cuadros de pacientes con crisis mioclónicas son: Tiagabina, Gabapentina, Succinamida.

Gabapentina: No se conoce el mecanismo por el cuál actúa pero es capaz de empeorar las crisis de ausencia mioclónicas.

Succinamidas: *Acción primaria:* Bloquean los canales de Calcio tipo T. Tienen una *acción secundaria* agonista GABA débil.

Etoxusimida: Puede causar y agravar GTCS debido a su acción secundaria.

10.3. FAEs bloqueantes de canales de sodio

Ejercen su acción por sincronización de los canales de sodio en forma inactiva. FAEs que actúan por este mecanismo son Carbamazepina, Oxacarbamazepina, Fenitoína, Lamotrigina.

El uso de **Lamotrigina** en niños agrava la crisis mioclónica severa de la infancia, por mutación del gen del canal de sodio SNC1.

Con el uso de Acido Valproico no se observa agravamiento de las crisis.

11. Resumen

Entre las drogas desarrolladas antes de 1978, varias de ellas siguen siendo las más ampliamente usadas; fenitoína, carbamazepian, valproato, etosuximida, primidona, fenobarbital, y algunas benzodiazepinas.

Aunque las drogas antiepilépticas de primera generación son de considerable uso en clínica por muchos pacientes, 30% aproximadamente, siguen siendo refractarios al tratamiento farmacológico (farmacorresistencia). [16]

Algunos fármacos logran controlar las crisis a expensas de severos efectos colaterales: ataxía , diplopía, hepatotoxicidad, perdida de las palabras, perdida en el aprendizaje, los cuáles se ven agrabados por el hecho de ser medicamentos de uso prolongado.

Si bien algunos FAEs de segunda generación son menos tóxicos que los de primera generación tiene la desventaja de ser muy costosos y no ser más eficaces.

Según datos obtenidos de observaciones clínicas algunos FAEs que actúan por bloqueo de canales de sodio o que aumentan la concentración de GABA, agravan las crisis epilépticas o conducen a otras formas de epilepsias.

Otro problema importante para abordar el tratamiento de la epilepsia es que no se conocen aún las causas de la epileptogénesis.

Las cualidades particulares de los fármacos que afectan al SNC, imponen un desafío científico extraordinario: tratar de comprender las bases moleculares y celulares de las funciones enormemente complejas y variadas del encéfalo humano, en este caso los circuitos neuronales afectados por ejemplo en las epilepsias refractarias.[ver apéndice: otros circuitos neuronales afectados]. Así poder en una investigación interdisciplinaria encontrar los sitios y mecanismos de acción de nuevos fármacos para el tratamiento de aquellos casos refractarios.

El desarrollo de nuevas terapias aún sigue siendo lento por razones económicas y por el desconocimiento de la epileptogénesis.

Hoy en día existen tres modelos *in vivo* de rutina para la evaluación preclínica de nuevas drogas antiepilépticas. Ello son el MES test, PTZ test y el modelo de encendido (*kindling*).

Por lo tanto existe una gran necesidad de mejorar los tratamientos farmacológicos de esta enfermedad. Para desarrollar nuevas terapias más efectivas es necesario encontrar nuevas formas de abordar el problema.

- El conocer las herramientas para abordar el descubrimiento de un nuevo fármaco es de vital importancia en esta parte de la investigación, así como aplicar el modelo animal adecuado para los estudios preclínicos.

- Es necesario el desarrollo de nuevos modelos animales de experimentación, que permitan identificar nuevos mecanismos de acción y así nuevos objetivos terapéuticos.

- Los nuevos mecanismos de acción son blancos particulares ya que son potenciales para el descubrimiento de nuevas terapias.

- Por otra parte es útil el desarrollo de nuevas tecnologías para el diagnóstico apropiado de la epilepsia. Es importante identificar con precisión los tipos de crisis antes de administrar un fármaco antiepiléptico.

Referencias

[1] Dreifuss FE: Other antiepileptic drugs, in *Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS* (ed): Antiepileptic Drugs. *4th Edition*. Raven Press, New York, **1995**, 949-962.

[2] Dreifuss FE: Other antiepileptic drugs, in *Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS* (ed): Antiepileptic Drugs. *4th Edition*. Raven Press, New York, **1995**, 949-962.

[3] a) Merritt, H. H; Putnam, T.J. *J. Am. Med. Ass* **1938**, *111*, 1068. b) Merritt, H.H.; Putnam, T. *Arch Neurol Psychiatr* **1941**; *45*: 797.

[4] Sillanpä, M. *Acta Neurolog Scand*, **1981**; *64 (Suppl 88)*: 9-109.

[5] Lambert PA, Carraz G, Carbel S. *Ann Méd-Psycholog* **1966**; *124*: 707-710.

[6] White, S.T. *Epilepsia*, **2003**, *44, Suppl. 7*, 2-8.

[7] Taylor, C.*Mechanisms of New Antiepileptic Drugs*.. En: Delgado-Escueta, A.V.: Wilson, W.A.; Olsen, R.W.; Porter, R.J.; (Eds.) *Jasper´s Basic Mechanism of the Epilepsies, 3 rd Ed.: Advences in Neurology , Vol. 79.*, Lippincott, Williams & Wilkins . Philadelphia, **1999**, 1011-1026.

[8] Regesta, G., Tanganelli, P. *Epilepsy Res*, . **1999**, *34*, 109–122.

[9] Coferencia *Dr. Iriaqui*, IV Simposio de Neurociencias Fleni, 15-18 de Mayo **2006**.

[10] Giliam, F.G.; Fessler, A.J.; Baker, G.; Vahle, V.; Carter, J.; Attarian, H. Neurology. **2004**, *13; 62 (1)*, 23-27.

[11] Schmidt, D. *Epilepsy Research* , **2002**, *00*, 1-12.
[12] Beghi E. *Lancet Neurol.* **2004**, *10*:61, 8-21.

[13] Krauss GL.Neurology, **2005**, 64(1):172-4.

[14] Krauss GL.Neurology, **2005**, 64(1):172-4 .

[15] Mc Cormick, Contreras, D. *Ann. Rev. Physiol.*, **2001**.

[16] Stables, J.; Bertram, E.H.; White, S.H.; Coulter, D.A.; Dichter, M.A.; Jacobs, M.P.; Loscher, W., Lowenstein, D.H.; Moshe, S.L.; Noebels, J.L.; Davis, M. *Epilepsia*, **2002**, *43 (11)*:1410-1420.

Anexo 5

Modelos Animales usados para la Evaluación de Drogas Anticonvulsivas

Uno de los pasos más importante en el descubrimiento de una nueva droga antiepiléptica es la elección correcta del modelo animal para iniciar los ensayos *in vivo*.[1]

Los modelos animales *in vivo* se categorizan en modelos para ***convulsiones*** y para ***epilepsia***.

Dado que la epilepsia humana se define como la aparición espontánea y recurrente de episodios convulsivos, la inducción de episodios convulsivos sin un comportamiento epileptiforme crónico, se considera un modelo de convulsión y no de epilepsia.[2]

La gran diversidad de especies animales utilizados varia desde el uso de drosófila hasta primates no humanos.[3] La necesidad de un modelo en las evaluaciones preclínicas de nuevos antiepilépticos, es de importancia tanto para predecir la eficacia de una droga frente a un determinado tipo de episodio, como para evaluar los efectos adversos a la dosis que se administra el anticonvulsivo.

Un modelo ideal para la evaluación de la actividad antiepiléptica y efectos adversos debería reunir los siguientes requisitos:

1. desarrollo de episodios convulsivos recurrentes espontáneos,
2. tipos de episodios convulsivos similares en la fenomenológia preclínica a los tipos de episodios que ocurren en la epilepsia humana,
3. respuesta del EGG (electroencefalograma) del modelo, similar a las que ocurren en EEG para cada tipo de episodio convulsivo en humanos,
4. alta frecuencia de los episodios convulsivos, para el estudio de la eficacia de drogas en cuadros agudos y crónicos,
5. farmacocinética de la droga antiepiléptica (particularmente velocidad de eliminación) similar a la que se presenta en humanos, para que permita mantener los niveles de droga activa en un tratamiento crónico,
6. concentración de droga activa en plasma y cerebro similar a aquella requerida para el control de los diferentes tipos de episodios convulsivos en el paciente.

No existe un modelo que cumpla con todos estos requisitos.

Se ha desarrollado un modelo con animales de laboratorio con epilepsia congénita, los cuáles asemejan a la epilepsia idiopática en humanos mucho mejor que cualquier otro modelo experimental.[4,5]

I.A.Barrios

Sin embargo, el modelo experimental más usado, no es el que semeja a la epilepsia crónica sino a los episodios epilépticos únicos (single).

En estos casos los episodios son inducidos en animales pequeños de laboratorio (ratas, ratones) por medios eléctricos o químicos.[6]

Los modelos más usados son:

- **Maximal Electroshock Seizure**, **MES** test, que se basa en la inducción eléctrica de la convulsión. En el ensayo **MES**, las convulsiones tónicas sobre los miembros posteriores se inducen por estimulación eléctrica bilateral en córnea o transauricular. Este ensayo *predice la protección de la droga frente a convulsiones generalizadas tónico-clónicas primarias y secundarias en humanos.*[7] El modelo de Mes test no resultó ser útil para las crisis epilépticas parciales. Las drogas que son efectivas frente a este ensayo se dice que son semejantes a Fenitoína.[8]

- **Pentilentetrazol**, **PTZ** test, basado en la inducción química de la convulsión por inyección subcutánea del convulsivante pentilentetrazol. El pentilentetrazol es un antagonista del GABA. La protección de las drogas frente al ensayo **PTZ**, es indicativo de la eficacia de la misma contra ausencias generalizadas y/o convulsiones mioclónicas en humanos.[6]
  Las drogas eficaces frente a este ensayo tienen comúnmente un perfil similar a benzodiacepinas, potenciando los efectos inhibitorios del GABA[8].

Casi todos los antiepilépticos clínicos son capaces de proteger frente a por lo menos uno de estos dos ensayos.[9]

En la **Tabla 1** se muestra la correlación entre la actividad biológica en modelos animales de drogas anticonvulsivas de uso clínico frente a determinado tipo de crisis epiléptica en humanos.

El modelo por **encendido de hipocampo o amígdalas** (*hippocampal / amygdala kindling*), es un modelo adecuado para identificar compuestos eficaces para el control de las epilepsias parciales.[6] Este modelo resulta ser interesante, ya que subgrupos de ratas "encendidas" , mostraron resistencia a drogas como valproato, fenitoína y fenobarbital, mostrando la situación clínica de pacientes con epilépsia parcial refractaria. [10, 11]

El modelo inducido por estímulo eléctrico de "*encendido de amígdala*" es un modelo que induce la epilepsia en el lóbulo temporal (TLE, Temporal Lobule Epilepsya).[12] Consiste en aplicar al animal, estímulos eléctricos subconvulsivos, dos veces al día, hasta varios estímulos, que acaban produciendo intensos episodios

	Modelo Experimental			Epilepsia en Humanos: Convulsiones Parciales			Convulsiones Generalizadas		
Fármaco	MES: Conv. Tónica	PTZ: Convu Clóni-ca	Encendido amígdala: Convul-sión Focal	Simples	Complejas	General. Secundarias	Tónico-clónicas	Ausencia	Mioclónica
Carbamazepina	+	NE	+	+	+	+	NE	NE	NE
Fenitoína	+	NE	+	+	+	+	+	NE	NE
Fenobarbital	+	+	+	+	+	+	+	NE	+
Primidona	+	+	+	+	+	+	+	NE	+
Valproato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Etosuximida	NE	+	NE	NE	NE	NE	NE	+	+
Benzodiazepinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vigabatrin	NE	+	+	+	+	+	?	NE	NE
Lamotrigina	+	NE	+	+	+	?	NE	?	?
Felbamato	+	+	NT	+	+	+	NT	NT	NT
Levetiracetan	NE	NE	+	+	?	?	NE	+	NE
MK-801 (Antagonista NMDA)	+	+	NE	NE	NE	NE	?	?	?
Tiagabina	NE	+	+	+	+	+	NE	NE	+

Tabla 1. Comparación frente a modelos animales y respuesta clínica en humanos. General. Secundarias: se refiere a las convulsiones que evolucionan secundariamente a tónico-clónicas generalizadas. NE: No efectiva; NT: No testeada; +: protección; ? datos poco claros. Tomada de: *Epilepsy Research*, **1994**, *17*, 95-134 y Eliat VII (2004). 1- White, H.S. **Epilepsia, 2003,** 44, 2-8.

J. A. Barrios

convulsivos parciales y generalizados.[13] Este "*encendido parcial*" se piensa modela los estadíos tempranos de la epileptogénesis, cuando ocurren cambios epilépticos permanentes, antes del comienzo de las convulsiones espontáneas periódicas (o recurrentes). Si bien los animales "*encendidos parcialmente*" no presentan episodios espontáneos periódicos, este modelo ofrece la ventaja sobre el modelo post- SE (post- *Status epilepticus*) que la descarga puede ser controlada y monitoreada permitiendo realizar un examen de la relación entre los episodios y la fisiopatología asociada. El "encendido parcial" induce muchas de las características de la TLE que implican perdida de células límbicas y reorganización sináptica. [14, 15]

Por otra parte, se pueden inducir convulsiones espontáneas periódicas aplicándose más de 300 estímulos (conocido como over-kindling).[16]

Recientemente se ha desarrollado un procedimiento para el estudio de los cambios que ocurren en el cerebro de roedores durante el *encendido de amígdalas*, monitoreados con Resonancia Magnética Nuclear (RMN).[17]

Los modelos inducidos químicamente por administración local o sistémica de **pilocarpina y kainato** en roedores, conducen a estados de convulsiones límbicas repetitivas y *status epilepticus*. Este modelo reproduce varios fenómenos característicos de la *epilepsia del lóbulo temporal* en humanos. Se usa como modelo animal para estudiar las bases del mecanismo de la epileptogénesis. [18,19]

Primero existe un período latente seguido de un *status epilepticus* (estado epiléptico) y precedido de una fase crónica, la que se caracteriza por la aparición de episodios convulsivos límbicos espontáneos. [20, 21] El daño cerebral causado en este modelo en el estado de *status epilepticus*, se asocia en humanos a las *convulsiones febriles* las cuáles se encuentran normalmente en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal medio. [22]

Modelos animales adicionales típicos para el estudio de las convulsiones parciales (que incluyen modelos simples y complejos) y generalizadas (tónicas, tónico-clónicas y modelos de ausencia) abarcan la aplicación local de antagonistas para el receptor del GABA, como **penicilina, bicuculina, y picrotoxina**. Estos actúan interrumpiendo el balance de inhibición y excitación provocando el foco epiléptico. También la introducción de metales pesados como cobalto, aluminio, zinc, hierro, puede producir lesiones focales. [23, 24, 25, 26]

Existen más de 100 tipos de episodios y desordenes epilépticos[27] en humanos y modelos que aparentemente correlacionan con cada uno de estos desordenes. También existen modelos que no son específicos para ninguna de las condiciones en humanos pero igualmente muestran un comportamiento para las convulsiones parciales y generalizadas. Muchos de los desordenes clínicamente importantes en

humanos, como el síndrome Othtahara y Lennox-Gastaux, que afecta a niños en temprana edad y adolescentes, entre decenas de otros, siguen aún sin un modelo animal. [28]Como contrapartida, el avance de la genética molecular, en las últimas décadas, a permitido descubrir numerosas mutaciones (especialmente en ratones) asociadas con fenotipos epilépticos. En humanos se sabe que la epilepsias febril y la BFNC están asociadas con mutaciones en canales de Na^+ y K^+. Estos avances contribuyen al descubrimiento de nuevos mecanismos involucrados en la epileptogénesis.[28]

Referencias

[1] Kupferberg, H.J., antiepileptic drug development program: A cooperative effort of government and industry. *Epilepsia, 30* (Suppl. 1), **1989**, S51-S56.

[2] Engel J. Experimental animal models of epilepsy: classification and relevance to human epileptic phenomena. *Epilepsy Res Suppl* , **1992**, *8*, 9 –20.

[3] Noebels, J. L. Single-gene models of epilepsy. In: Delgado A, Wilson W, Olsen R, Porter R, editors. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies. 3rd ed. Advances in Neurology.* Philadelphia:Lippincott–Raven, **1999**, 227–38.

[4] Löscher, W., Genetic animals model of epilepsy as a unique resourse for the evaluation of anticonvulsant drugs. A review. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **1984**, 6, 531-547.

[5] Löscher, W., Genetic animals models of epilepsy. In: Driscoll, P.(Ed.) *Genetically Defined Animal Models of Neurobehavioral Dysfunctions.* Kirkhäuser, Boston, MA, **1992**, 111-135.

[6] Löscher, W. and Schmidt, D., Wich animal models should be used in the search of new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res.*, **1988**, 2, 145-181.

[7] Porter, R.J.; Cereghino, J.J.; Gladding, G.D.; Hessie, B.J.; Kupferberg, H.J.; Scoville, B.; White, B.G. *Clev. Clin. Q.*, **1984**, *51*, 293-305.

[8] Meldrum, B.S. *Epilepsia* , **1997**, *38*, S7–S15.

[9] Stables, J.P.; Kupferberg, H.J. Cap. 16: The NHI Anticonvulsant screening Project. En: Avanzini, G.; Regesta, G.; Tanganelli,P. ; Avoli, M. (Eds.), *Molecular and Cellular targets for anti-epileptic drugs*, Jhon Libbey & Company Ltd, **1997**, 191-198.

[10] Löscher, W. and Frey, H. H. Transport of GABA at the blood-CFS interface. *J.Neurochem.*, **1982**, *38*, 1072-1079.

[11] Löscher, W. Rundfeldt, C. and Hönnack, D., Pharmacological characterization of phenytoin- resistant amygdala-kindled rats, a new model of drug resistant partial epilepsy. *Epilepsy Res.*, **1993**, *15*, 207-220.

[12] Morimoto, K.; Fahnestock, M.; Racine, R.J. *Progress in Neurobiology*, **2004**, *73*, 1–60.

[13] McNamara JO. Kindling model of epilepsy. *Adv Neurol*, **1986**; *44*, 303–318.

[14] Pitkanen A, Tuunanen J, Kalviainen R, Partanen K, Salmenpera T. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* **1998**; 3, 233–53.

[15] McIntyre DC, Poulter MO, Gilby K. *Epilepsy Res* . **2002**; *50*: 79–92.

[16] Brandt C, Ebert U, Löscher W. Epilepsy induced by extended amygdala kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Res* , **2004**; 62:135–56.

[17] Bianca Jupp , John P. Williams, Yasvir A. Tesiram , Milosh Vosmansky, Terence J. O'Brien . MRI compatible electrodes for the induction of amygdala kindling in rats. *Journal of neuroscience Methods*, **2006**, on-line.

[18] Ben-Ari, Y., Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* , **1985**, *14*, 375-403.

[19] Buckmaster, P.S., Dudek, F.E., Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats. *J. Comput. Neurol.*,**1997**, *385*, 385- 404.

[20] Cavalheiro, E.A., Riche, D.A., Le Gal La Salle, G.Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **1982**, *53*, 581-589.

[21] Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Cavalheiro, E.A.. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* , **1990**, *14*, 511-517.

[22] Mathern, G.W., Babb, T.L., Leite, J.P., Pretorius, K., Yeoman,K.M., Kuhlman, P.A. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res.*, **1996**, 26, 151-161.

[23] Avanzini G, Moshe SL, Schwartzkroin PA, Engel J. Animal models of localization-related epilepsy. In: Engel J, Pedley TA, editors. Epilepsy: a comprehensive textbook. Philadelphia:Lippincott–Raven, **1997**, 427– 42.

[24] Ribak CE, Seress L, Weber P, Epstein CM, Henry TR, Bakau RA. Alumina gel injections into the temporal lobe of rhesus monkeys cause complex partial seizures and morphological changes found in human temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*, **1998**; *401*, 266 –90.

[25] Craig CR, Colasanti BK. Cobalt-induced focal seizures: neuronal networks and actions of antiepileptic drugs. In: Faingold C, Fromm G, editors. Drugs for control of epilepsy: actions on neuronal networks involved in seizure disorders.Boca Raton, FL: CRC Press, **1992**, 125– 42.

[26] Dambinova SA, Granstrem OK, Tourov A, Salluzzo R, Castello F, Izykenova GA. Monitoring of brain spiking activity and autoantibodies to N-terminus domain of GluR1 subunit of AMPA receptors in blood serum of rats with cobalt-induced epilepsy. *J Neurochem*, **1998**; *71*, 2088 –2093.

[27] Matthew R. Sarkisian, Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders, *Epilepsy & Behavior*, **2001**, 2, 201-216.

Anexo 6

Programa de Evaluación de Drogas Antiepilépticas

1. Introducción

Existen una gran variedad de ensayos destinados a la evaluación de distintos tipos de crisis epilépticas. [1; Anexo 5]

El ensayo farmacológico debe detectar la acción anticonvulsiva provocando convulsiones experimentales en animales de laboratorio similares a las manifestaciones clínicas en humanos. Por otro lado debe predecir los efectos adversos a las dosis anticonvulsivas.

Así se detectan compuestos con potencial actividad y se descartan aquellos que no muestran una ventana terapéutica aceptable.

En vista de los diversos tipos de convulsiones epilépticas [Anexo 2] debe usarse más de un modelo biológico para el análisis del perfil farmacológico de nuevos compuestos anticonvulsivos. En cuanto a los efectos adversos habitualmente presentes en drogas anticonvulsivas, se considera en la evaluación preclínica la neurotoxicidad, mediante la respuesta al ensayo de Rotorod.

2. Elección del ensayo

La elección del ensayo es además importante en el estudio del *perfil farmacológico* de los compuestos anticonvulsivos, ya que los resultados obtenidos frente a los modelos animales, sirven como indicadores de potencial actividad frente a distintas crisis convulsivas en humanos (Tabla 1).

El **ensayo MES** es un modelo para convulsiones generalizadas tónico-clónicas tanto primarias como secundarias[2]. Por otra parte la protección frente al **ensayo PTZ** es indicativa de eficacia frente a ausencias generalizadas y/o convulsiones mioclónicas en humanos.

Como ejemplo de esto tenemos al fármaco fenitoína que protege frente al ensayo MES y se utiliza para convulsiones tónicas y/o clónicas (grand mal) en humanos.

Por otra parte los fármacos Etosuximida y Trimetadiona protegen en las convulsiones clónicas provocadas por PTZ, y son efectivas para el tratamiento de las convulsiones mioclónicas y de ausencia en humanos. [3] Como estos existen muchos otros ejemplos.[3]

I.A.Burrios

3. Programa de Evaluación para Drogas Anticonvulsivas desarrollado por el NIH.

En 1975, la *Epilepsy Branch* (NINCDS-NIH, Estados Unidos) del *Antiepileptic Drug Development Program* (Programa ADD) dentro del Anticonvulsant Screening Program (ASP)[4,5] ha fomentado el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de la epilepsia. A su vez ha desarrollado un Programa de Evaluación Preclínico para Drogas Antiepilépticas. En la actualidad casi todos los laboratorios a nivel mundial siguen este programa al momento de determinar si nuevas estructuras posen características de actividad prometedora

Este programa plantea la metodología a seguir para la evaluación preclínica utilizando modelos animales de laboratorio. El ASP consta de siete Fases cada una de las cuales utilizan diferentes ensayos y aporta datos sobre distintos aspectos de acción de las drogas.

Dentro de estos aspectos podemos mencionar existencia de actividad anticonvulsiva hasta tolerancia luego de administración repetida de la droga incluyendo neurotoxicidad, índice terapéutico, duración de la acción, comparación de la actividad según la vía de administración, etc.

En la Tabla 1 se describen las siete Fases del Programa y la batería de ensayos empleados en cada una de las Fases.

Fases	Descripción	Especie Animal	Vía de adm.♦
Fase 1	*Perfil Farmacológico:* Identificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica para determinar el nivel de actividad: • Ensayo MES • Ensayo PTZ • Ensayo Rotorod	Ratones albinos de 18-23 g.	*i.p*
Fase 2	Cuantificación de la Acción Anticonvulsiva y Neurotóxica: Determinación de ED_{50} , TD_{50}, IP. • Ensayo MES • Ensayo PTZ • Ensayo Rotorod	Ratones albinos de 18 a 23 g.	*i.p*
Fase 3	Perfil de Toxicidad • Dosis Letal media (LD_{50}) • Dosis hipnótica media (HD_{50})	Ratones albinos de 18 a 23 g.	*i.p*
Fase 4	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva por vía oral: determina las características de absorción y metabolismo. • Ensayo MES • Ensayo PTZ • Ensayo Rotorod	Ratones albinos de 18 a 23 g.	*p.o*
Fase 5	Comparación con drogas antiepilépticas conocidas e identificación del posible mecanismo de acción: • Ensayo de umbral convulsivo por PTZ • Ensayo de umbral convulsivo por Picrotoxina • Ensayo de umbral convulsivo por Bicuculina • Ensayo de umbral convulsivo por estricnina • Estudios in vitro de unión a receptores.	Ratones albinos de 18 a 23 g.	*i.p*
Fase 6	Cuantificación de actividad convulsiva y Neurotoxica en otras especies: ED_{50}, TD_{50}, PI. • Ensayo MES • Ensayo PTZ • Ensayo sentido posicional • Ensayo Marcha y postura	Ratas	*p.o*
Fase 7	Dosis Letal Mínima (LD3) y Tolerancia • LD3 adm. Diaria 3 días • LD3 adm. Diaria 5 días • Ensayo duración del sueño por hexobarbital • Estudio *in vitro* de enzima microsomal	Ratas	*p.o*

Tabla 2. Descripción de las 7 Fases que abarca el Programa de Evaluación de Drogas Antiepilépticas. ♦ vía de administración: oral (p.o), intraperitoneal (i.p), subcutánea (s.c).

A continuación se describirán en detalle las Fases I y las Fases II de este Programa que fueron las llevadas a cabo en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

I.A.Barros

4. Fase I

La Fase I del ASP del programa ADD involucra la *identificación* de la acción anticonvulsiva (Tabla 1) mediante la prueba de los compuestos nuevos a tres niveles de dosis (30, 100, y 300 mg/kg). La clasificación de las estructuras ensayadas en cuatro categorías permite decidir cuáles serán capaces de continuar dentro del proyecto y cuáles se descartan.

Los compuestos se clasifican en Categorías[6] según:

Categoría	Característica
1	Activa a 100 mg/Kg o menos
2	Activa a más de 100 mg/Kg
3	No activos más de 300 mg/Kg
4	Inactivos a 300 mg/Kg o tóxicos a 30 mg/Kg

Tabla 3. Clasificación de los compuestos en categorías según su actividad anticonvulsiva en Fase I.

Aquellas estructuras que presentan actividad a 30 mg/kg pero también efectos neurotóxicos (Categoría **4**) se evalúan a dosis menores (Handbook 85).

5. Fase II

La Fase II del Programa cuantifica la actividad anticonvulsiva y neurotóxica de una droga. Los valores de ED_{50} frente a los ensayos MES y PTZ son los parámetros más ampliamente usados para describir la potencia de los nuevos compuestos con acción anticonvulsiva.

Constituyen la primera indicación preclínica de potencial capacidad antiepiléptica asociado a determinado tipo de convulsión humana. Además permite comparar potencias anticonvulsivas con otros compuestos antiepilépticos clásicos.

6. Tratamiento estadístico de los datos

Para el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en Fase II del presente trabajo se utilizó el método de Litchfield y Wilcoxon.[7] Aplicando este método se puede obtener:

1. DE_{50} ó TD_{50}. Dosis Efectiva 50 o la Dosis Tóxica 50.
2. los intervalos de confianza para estas dosis.
3. la función pendiente de la recta (S).
4. los intervalos de confianza de dicha función.

Para ello se vuelcan en una planilla Excel los datos obtenidos para cada uno de los compuestos a los que se le determinó la ED_{50}.

Los puntos para cada recta deben ser como mínimo cuatro con valores entre 10 y 90 % de porcentaje de actividad.

La tabla que se utiliza para volcar los datos se muestra a continuación:

6.1 Datos de entrada.

- Dosis usada (*dose*),
- el número de animales protegidos (*n react*),
- número total de animales(*n test*)
- porcentajes de protección (% eff obs.)

Los datos de actividad se convierten a probits (*Probit obs.*). Este mismo método puede utilizarse en forma equivalente si se quiere cuantificar los efectos neurotóxicos.

6.2 Gráficos

Se grafica el logaritmo de la dosis (*log dose*) en función de los probits correspondientes (*probit obs.*)y traza la recta que interprete bien a los puntos principalmente de protección.

6.3 Peso estadístico de la recta

El peso estadístico de la recta propuesta se evalúa con el valor de $(Chi)^2$ de la recta (*Tot Chi 2*) en base a las diferencias entre valores observados y esperados (o

L.A.Barros

recogidos) (*diff o-e*). Esto se realiza para cada dosis y con el número promedio de animales por dosis (*Ave N ani*).

Como los datos recogidos no son significativamente heterogéneos, la recta se considera aceptable cuando el valor de $(Chi)^2$ no supera cierto valor límite (Chi 2 T2) estipuledo para distintos grados de libertad (*Deg Free*).

6.4 ED_{50} y la función S

El dato de DE_{50} surge directamente de la recta mientras que el valor de la función pendiente surge de la expresión:

$$\mathbf{S= (ED_{84} /ED_{50} + ED_{50}/ED_{16})/2}$$

6.5 Intervalos de confianza de ED_{50} y S

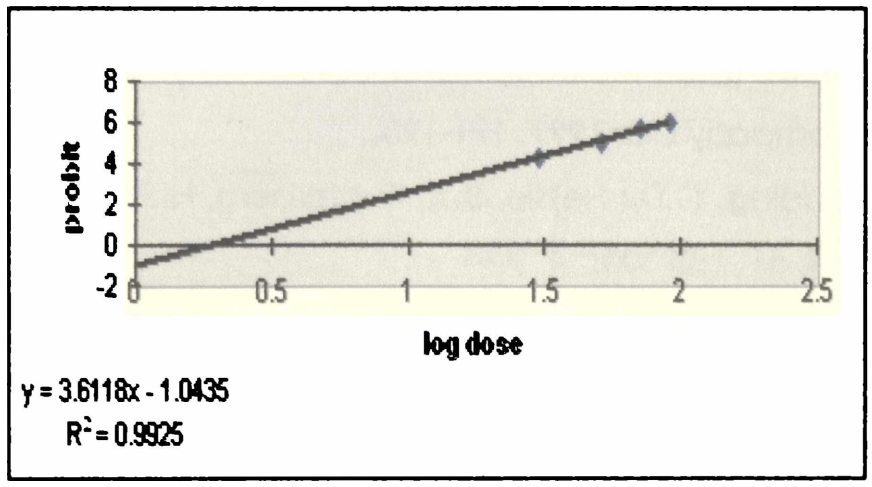
Los valores *fed* y *fs* tienen en cuenta el número de dosis usadas (*N doses*)
el número de animales involucrados, en los puntos que caen dentro de valores, de probit entre 4-6 de actividad esperada (N e/16-84), la función pendiente (S) y el valor A que depende de los valores de las dosis más altas y bajas usadas (cuyo cociente es R).

Estos factores permiten calcular los intervalos de confianza para la ED_{50} y S.

En el ejemplo de la Tabla 4 aparecen marcados los valores de ED_{50} y S así como los de los intervalos de confianza (en gris).

Los cuadros de las columnas pintados en verde representan los datos que se deben ingresar manualmente. En este ejemplo se muestra el cálculo de la ED_{50} del compuesto 12-VPS.

dose	log dose	n react	n test	%eff obs	correct	probit obs	probit exp	% eff exp	diff o-e	Chi 2
30	1.477121	1	4	25		4	4.2916	24	0.975	0
50	1.69897	2	4	50		5	5.0929	53.5	-3.5	0.0045
70	1.845098	3	4	75		6	5.6207	73.33	1.67	0.001
90	1.954243	4	4	84.2		6.02	6.0149	84.4	-0.2	0



Tot Chi 2	0.0055
N doses	4
Ave N ani	4
Chi 2 line	0.022
Deg Free	2
Chi 2 T2	5.99
N e/16-84	16
pendiente	3.6118
ordenada	-1.043
R2	0.9925

ED16 =	25.07007
ED50 =	47.12553
ED84 =	88.58433
S =	1.879752

f ed =	1.548156
f s =	2.855593

conf lim I	30.43978	
conf lim S	72.95767	45.11131
conf lim I	0.65827	
conf lim S	5.367808	125.2702

R =	3
A =	1.75

I.A.Barrio

Referencias

[1] Sarkisian, M.R.; *Epilepsy & Behavior*, **2001**, 2, 201-216.

[2] Fisher, R.S. *Brain Research Reviews*, **1998**, *14*, 245-278.

[3] Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson, T. *Epilepsy Resarch*, **2004**, *61*, 1-48.

[4] Stables, J.P.; Kupferberg, H.J. *Cap.16: The NHI anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: Preclinical anticonvulsan screening project*. En: Avanzini, G.; Regesta, G.; Tanganelli, P.; Avoli, M. (Eds.) *Molecular and cellular targets for anti-epileptic drugs*. John Libbey & Company Ltd. **1997**, 191-198.

[5] Porter, RJ.; Cereghino, J.J.; Gladding, G.D.; Hessie, B.J.; Kupferberg, H.J.; Scoville, B.; Whitte, B.G. *Clev. Clin. Q.*, **1984**, *51*, 193-305.

[6] Malawska,B., Kulig,a, K.; Spiewaka, A.; Stablesb, J.P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**, *12*, 625–632.

[7] Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **1949**, 96, 99-113.

ANEXO 7

Sulfamatos y sulfamidas: su potencial terapéutico.

1. Introducción

A partir de la molécula simple de ácido sulfámico (**1**), la O- sustituida (**2**), *N*-sustituida (**3**) o *O,N*-di/tri-sustituida (**4**) y (**5**) dieron origen a una gran variedad de **sulfamatos**, los cuales mostraron tener una diversidad de acciones terapéuticas específicas (Figura 1).

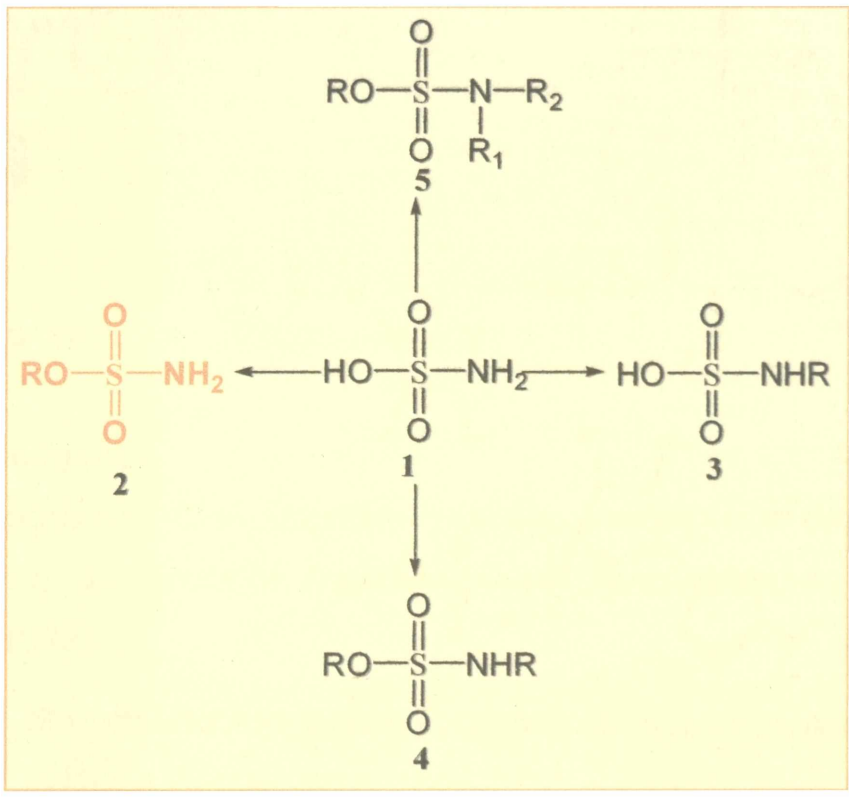


Figura 1. Sulfamatos derivados del ácido sulfámico con actividad terapéutica.

Todos los compuestos de tipo **1-5** poseen aplicaciones farmacológicas. Estos derivados comenzaron a ser explotados por el uso de diseño racional de fármacos para obtener diferentes tipos de agentes terapéuticos.

2. Antibióticos.

Entre los nuevos agentes terapéuticos que se han desarrollado recientemente se encuentran una nueva clase de antibióticos inhibidores de la aminoacil- *t*-RNA sintetaza (aaRSs), enzima responsable en las bacterias de mantener la fidelidad en la síntesis proteica. Este se ha convertido en un nuevo blanco terapéutico para el

desarrollo de nuevos antibacterianos.[1,2] El compuesto natural Nucleosidin, **6**, un 5'-O – sulfamoil nucleosido, posee gran actividad antimicrobiana [3] así como muchos de sus análogos[4, 5, 6,7], sin embargo su alta toxicidad impidió su uso terapéutico. Por otro lado, compuestos análogos del adenocil adelilato, sulfamatos tipo **7**, demostraron a concentraciones nanomolares gran afinidad y estabilidad frente a una serie de aaRSs. [8, 9, 10] Aminoacil sulfamatos, análogos del compuesto tipo **8**, también son potentes inhibidores selectivos de la enzima bacterial. [11, 12]

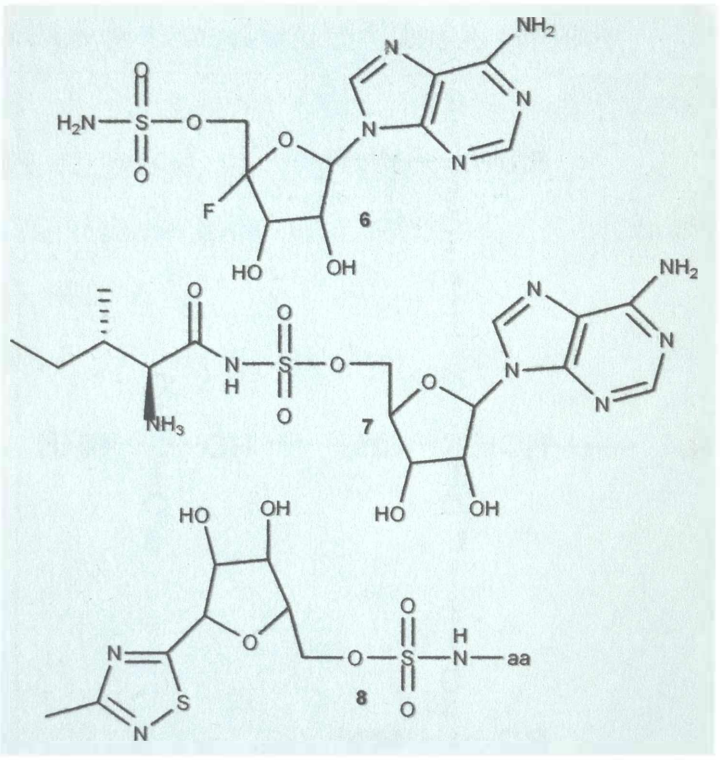


Figura 2. Sulfamatos con actividad antibacteriana, inhibidores de aaRS.

Hasta el momento ninguno de los inhibidores de aaRSs se encuentra en uso clínico, por lo que este blanco continuará siendo importante para el diseño y desarrollo de nuevos antibacterianos[13].

3. Antivirales.

Nuevos antivirales han incorporaron una función sulfamato, de los cuales al menos dos tipos de estos derivados fueron mayoritariamente investigados: los nucleótidos/nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)(**9**, **10**) de los cuáles **9**[14] resultó ser activo frente al virus del herpes simples tipo 1(**10**) y sus derivados manifestaron actividad anti-HIV. [15, 16, 17, 18] La otra familia son los inhibidores de la proteasa del HIV (PIs). Entre ellos se encuentra **11**, y sus análogos de los cuáles **12** resultó ser el más activo. [19]

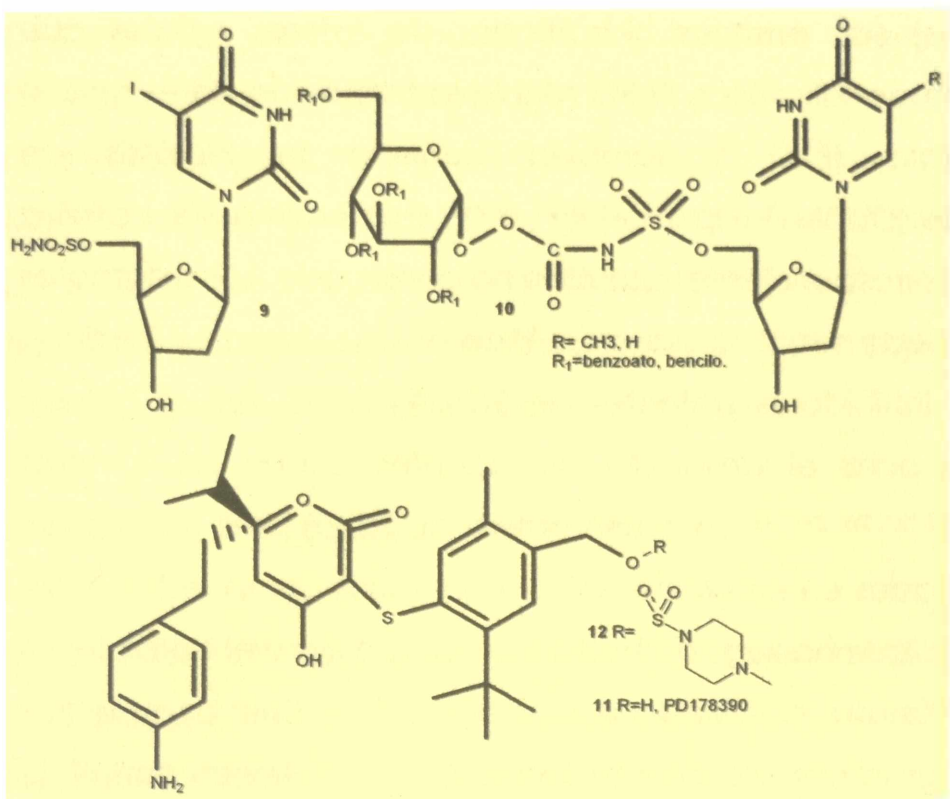


Figura 3. Sulfamatos con actividad Anti-Viral.

4. Anticancerígenos.

Entre las drogas anti- cancerígenas los sulfamatos ocupan un papel significativo, con por lo menos dos blancos importantes: sulfatasa esteroidea (STSs) y la anhidrasa carbónica (CAs).

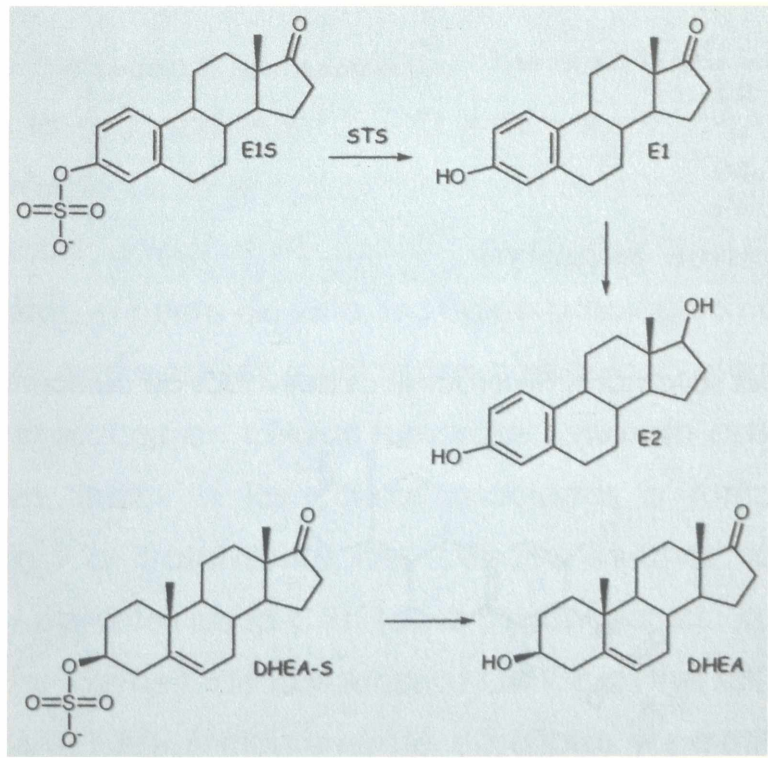


Figura 4. Origen de estrógeno en tumores hormona-dependientes, y el rol de la sulfatasa esteroide.

Las sulfatasas esteroides (STSs) son enzimas hidrolíticas de ésteres sulfatos que pertenecen a una gran familia de sulfatasas. [20] STS regula la formación de estrona a partir de la estrona sulfato (E1S) y también controla la hidrólisis de dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S) (Figura 4).[20,21,22,23,24] Esta enzima STS, cataliza la hidrólis de E1S y DHEA-S, al correspondiente esteroide no conjugado. Los sulfamatos tipo **2** ($ROSO_2NH_2$, donde R puede ser un anillo aromático o un sistema policíclico), mimetizan a los sulfatos, son inhibidores potentes de STSs.[25, 26] STSs son un blanco terapéutico muy importante para el desarrollo de agentes contra los tumores hormona-dependiente. [23, 24, 26, 27, 28, 29, 30] Un gran número de inhibidores de STSs del tipo sulfamato han sido reportados en los últimos años, con varios compuestos entre ellos el 667COUMATE (Figura 5), que ha llegado hasta fase clínica para el tratamiento de tumores de pulmón y próstata hormona dependientes.[31, 32] Este campo fue rápidamente cubierto por un gran número de inhibidores que se obtienen con el fin de aumentar las propiedades anticancerígenos y disminuir los efectos adversos (entre otros, estrogenicidad, un problema encontrado en los compuestos de primera generación tal como EMATE, **13**).[33]

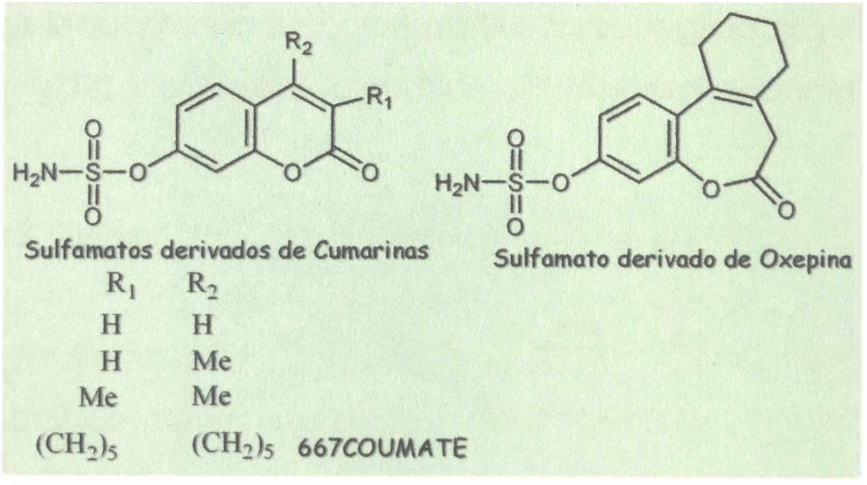


Figura 5. Inhibición de STS por sulfamatos Heterocíclicos derivados de cumarinas y oxepina.

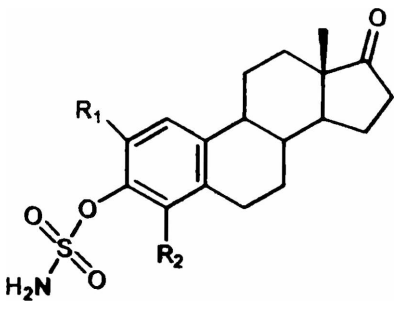


Figura 6. Inhibición de STS con Sulfamatos Esteroideos. [34, 35]

13: R_1=H, R_2=H ; EMATE.

Dependiendo de los grupos R estas estructuras pueden variar mucho su actividad biológica desde inactivas para R= alquil o alil , y muy efectivas para el caso de R=2-nitro y 2-fluorometil.[34, 36]

Modificaciones en el anillo D, así como el largo de la cadena alquílica, son parámetros que influyen en la actividad inhibitoria de la STS.[36, 37, 38, 39]

Muchos otros STSs esteoidales fueron reportados en patentes, Nussbaumer y Billich, los han citado en un trabajo de reciente revisión.[40]

5. Inhibidores de la Anhidraza Carbónica.

Las enzimas anhidraza carbónica (CAs) catalizan la hidratación reversible de dióxido de carbono (CO_2) a bicarbonato, tratando de este modo el CO_2 que se genera en los procesos fisiologicos.[41, 42,43, 44,45,46] (Ecuación 1).

$$EZn^{2-}\text{--}OH^- + CO_2 \leftrightarrow EZn^{2-}\text{-}HCO_3^- \leftrightarrow EZn^{2-}\text{--}OH_2 + HCO_3^-$$

$$EZn^{2-}\text{--}OH_2 \leftrightarrow EZn^{2-}\text{-}HO^- + H^-$$

Ecuación 1. Proceso catalizado por la enzima anhidraza carbónica

El ión Zn (II) es esencial para la catálisis en las α-CAs.[48-50, 47] El paso limitante en la ecuación 1 es la segunda reacción, la transferencia de un protón que genera la especie Zn-hidróxido de la enzima.[47-52] Muchas de las actualmente conocidas CAs poseen otras actividades catalíticas tales como: estereasas, hidrolasas, etc., pero su importancia desde el punto de vista fisiológico-patológico no es conocida.[48-50]

Entre las muchas enzimas CAs (anhidrazas carbónica), al menos dos, CA IX y CA XII, están sobre expresadas en células tumorales, estando casi ausentes en células de tejidos normales. Inhibir a las células asociadas a tumores CAs es una nueva estrategia para al tratamiento del cáncer. Muchos sulfamatos actúan como inhibidores muy potentes de la CAs (dósis nanomolares). La estructura cristalográfica determinada por Rayos X de la isoenzima CA II, con tres sulfamatos (ácido sulfámico, Topiramato, EMATE) fue recientemente descripta, y permitió el diseño racional de nuevos inhibidores (Figura 7).

E.A.Barrios

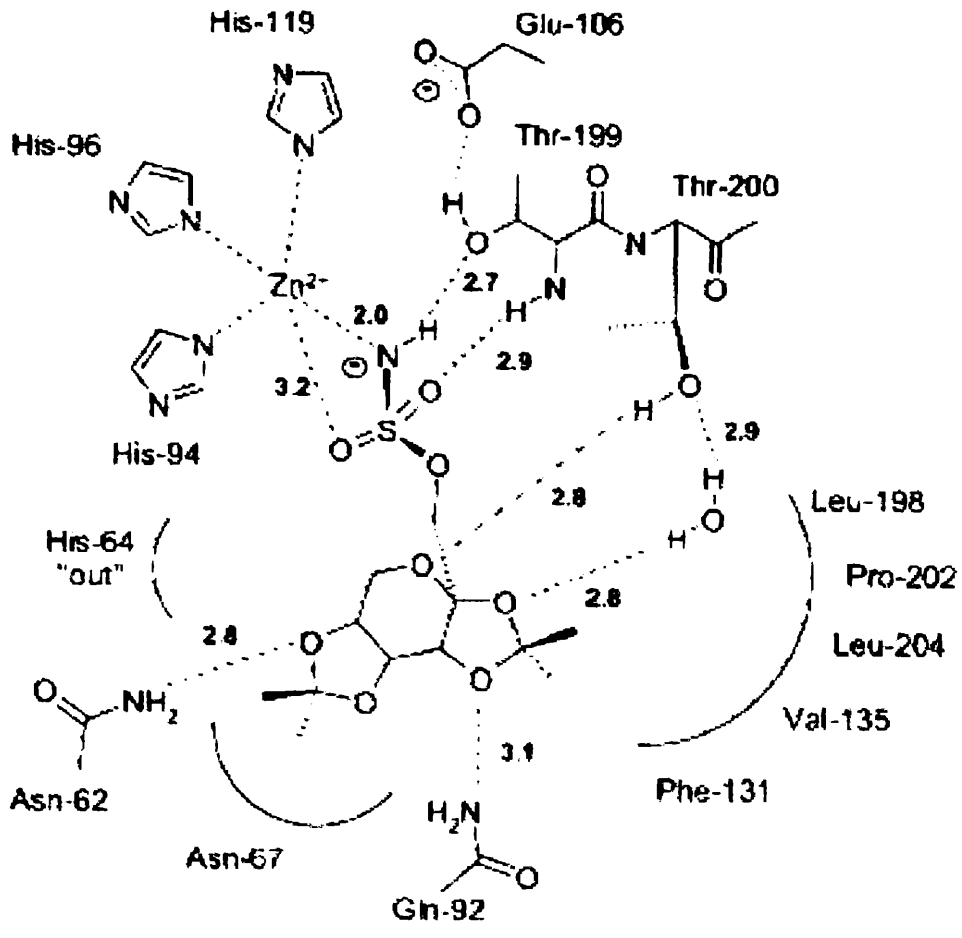


Figura 7. Representación esquemática del modo de unión de Topiramato con hCAII. Los enlaces de hidrógeno entre el inhibidor y el Topiramato estan en líneas punteadas. Las distancias se dan en A.Tomado de: 137. Sliskovic DR, Krause BR, Picard JA, Anderson M, Bousley RF, Hamelehle KL, Homan R, Julian TN, Rashidbaigi ZA, Stanfield RL. Inhibitors of Acyl-CoA: Cholesterol O-acyltransferase (ACAT) as hypocholesterolemic agents. The first water-soluble ACAT inhibitor with lipid-regulating activity. *J Med Chem*, **1994**;37:560–562.

Se observó que los sulfamatos han sido efectivos a concentraciones nanomolares, para inhibir CA IX así como CA I y CA II, que no están relacionadas con la producción de tumores.

6. Anticonvulsivos

Un gran número de anticonvulsivantes con la función sulfamato, también fueron publicados, entre ellos el que se destaca por su amplio uso en clínica es el Topiramato.[48] Este se propone que actúa por mucho mecanismos de acción entre ellos: incremento de la transmisión GABAérgica, antagonistas de receptores Kaimato/ AMPA, inhibición de canales de sodio voltaje dependiente. Otro mecanismo

asociado el cuál esta en discusión[49, 50] es el compartido por Topiramato y Zonisamida, de inhibición de anhidraza carbónica. Estos compuestos tienen un grupo que se coordina al ión Zn^{+2} de la CAs, el grupo sulfonamida en el caso de la Zonisamida y el grupo sulfamato en el caso del Topiramato. Existe una hipótesis respecto a los efectos antiepilépticos del Topiramato y Zonisamida pueden deberse a la retención de CO_2 secundaria a la inhibición de las células rojas de la sangre y las enzimas del cerebro.[51]
Entre los efectos adversos de este último, se observó la perdida de peso de los pacientes que toman esta droga antiepiléptica. Por lo que se propuso recientemente usar esta droga, y sulfamatos relacionados, en el tratamiento de pacientes con obesidad.[52]
Usando al Topiramato y a RWJ-37497 (Figura 8) el grupo de Maryanoff publicó una gran serie de azúcares funcionalizados como sulfamatos como un nuevo tipo de anticonvulsivos. Si se realizan modificaciones como el cambio del grupo sulfamato ($O\text{-}SO_2NH_2$) por carbamato, azido sulfonil oxi, sulfamida, amino, metilsulfamoil, en este tipo de azúcares se observa una pérdida de la actividad anticonvulsiva.[53] El compuesto con mayor actividad anticonvulsiva resultó ser RW-37947[2], que adicionalmente al grupo sulfamato posee un grupo sulfato cíclico en la molécula.

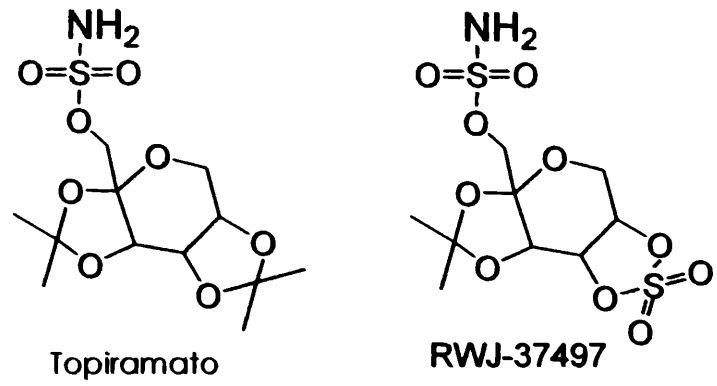


Figura 8. Sulfamatos como anticonvulsivos.

Recientemente, durante la redacción de la presente Tesis doctoral el grupo de Maryanoff patentó una serie de sulfamatos y sulfamidas con actividad anticonvulsiva cuya estructuras generales se muestran en la Figura 9.[54] Siendo el compuesto más activo de la serie frente al ensayo MES (10mg/kg a ½ hora) el compuesto **14** Figura 9.

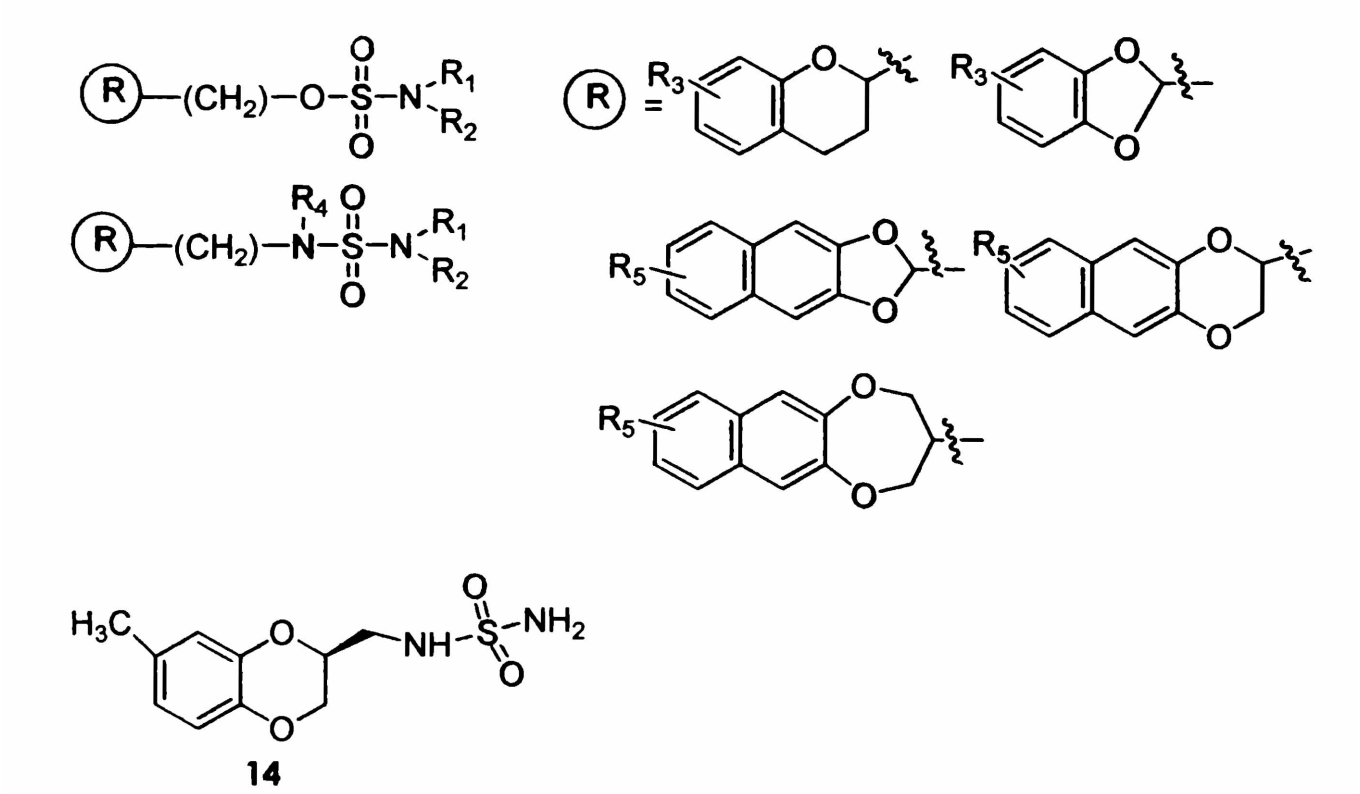


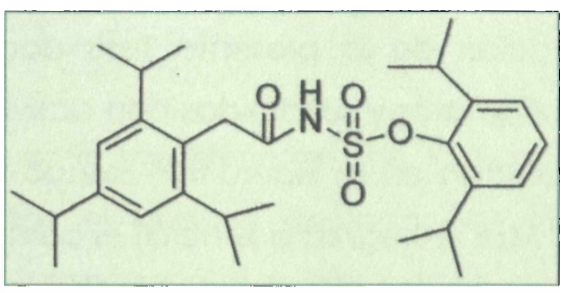
Figura 9. Sulfamatos y sulfamidas con actividad anti-MES.

7. Anti-Obesidad

El mecanismo por el cuál Topiramato se usa para el tratamiento de la obesidad se basa en la inhibición mitocondrial de las isoenzimas CA, CA V, involucradas en la lipogénesis. Este efecto se descubrió por observación de pacientes obesos medicados con Topiramato como anticonvulsivante. Estos pacientes llegaban a perder hasta un 20% de su peso corporal.[53]

8. Tratamiento de la hiperlipidemia y asterosclerosis

Algunos sulfamatos mostraron tener potente actividad inhibitoria de la Acil Coenzima A: colesterol aciltransferasa, una enzima involucrada en el metabolismo del colesterol. El agente importante, avasimibe, se encuentra en fase III clínica como agente para el tratamiento de la hiperlipidemia y aterosclerosis.



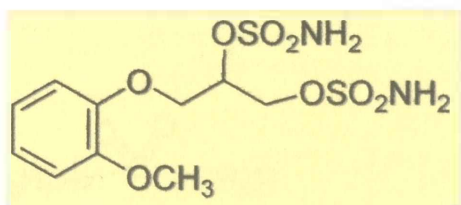
Avasimibe

10. Anti-artritis y osteoporosis.

La artritis es un desorden del sistema inflamatorio caracterizado por un daño importante en el tejido conectivo llevando a la destrucción progresiva de huesos y cartílagos. [55, 56, 57]

En los últimos 40 años se han utilizado diversas clases de agentes terapéuticos para el tratamiento de la artritis entre ellos corticosteroles adrenergicos y antiflamatorios no esteroideos. [55, 57, 58.]

El desarrollo de compuestos que actúen inhibiendo la resorción y perdida de la materia ósea, es uno de los desafíos. Bisulfamatos como AHR-15010 fue publicado como acción antiartritis en ensayos en ratos como único mecanismo de acción.[55, 58, 57] Se postula que la acción resulta del efecto inhibitorio de dicho compuesto sobre CAs (específicamente CA II) que esta involucrada en la resorción ósea.[59, 60, 61]



AHR-15010

11. Sulfamidas

El grupo funcional *sulfamida* ha sido estudiado como inhibidor de la proteasa HIV[62,63] (Figura 10), agonista de los receptores 5-HT_{1D}[64], (Figura 11) componentes activos de análogos de epinefrina[65], acción broncodilatadora[66] (Figura 12) componentes no hidrolizables de peptidomiméticos[67], y también como inhibidores de anhidraza carbónica.[68, 69, 70]

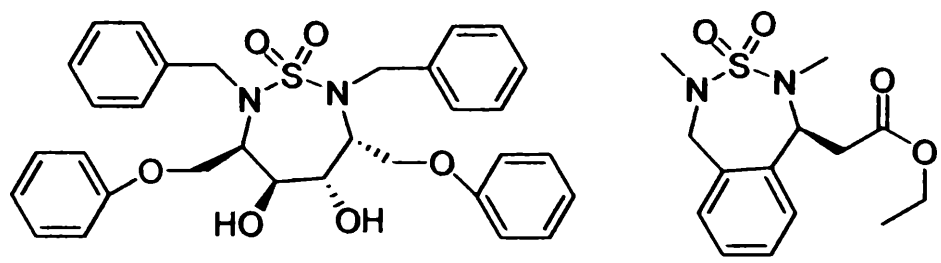


Figura 10. Sulfamidas inhibidoras de la proteasa HIV.

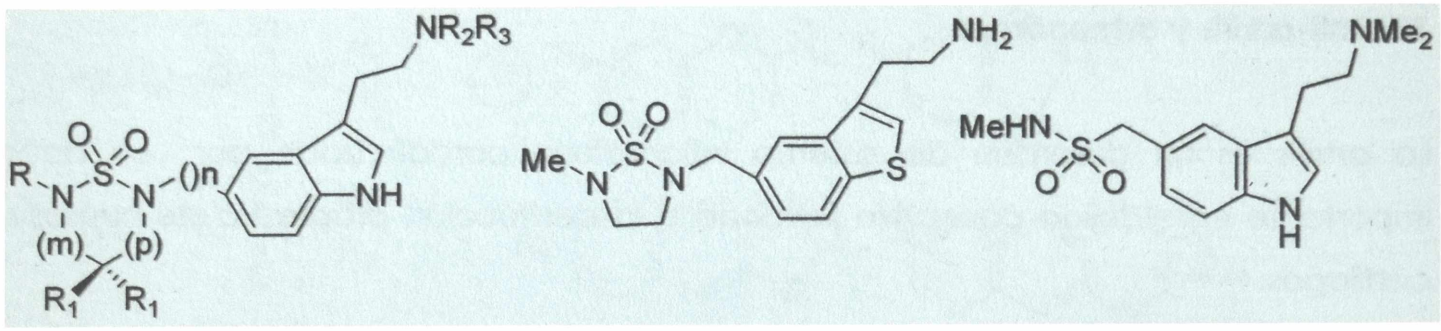
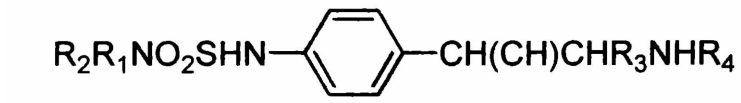


Figura 11. Estructuras generales de sulfamidas con actividad agonista a receptores 5-HT_{1D}



R1-R4=varios grupos alquilos

Figura 12. Sulfamidas con actividad β-bloqueante.

También han sido evaluadas como inhibidoras de anhidraza carbónica[82] (Figura 13).



Figura 13. Sulfamidas diversamente sustituidas como inhibidoras de anhidrasa carbónica.

Si bien gran cantidad de sulfamidas se sintetizaron con distintos fines, este grupo funcional no estuvo presente en ninguno de los antiepilépticos de uso clínico o en vías de desarrollo. Este grupo funcional fue estudiado como anticonvulsivante por primera vez en nuestro grupo de trabajo.[71, 72]

En Resumen:

El grupo funcional **sulfamato** así como la función **sulfamida**, poseen un gran atractivo de posibilidades para el diseño de nuevos agentes farmacológicos, los cuáles por un lado, esta relacionado a la diversidades de actividades biológicas que presentan siendo muchas de ellas muy importantes.

Sulfamatos como Topiramato, n-butilsulfamato y n-pentilsulfamato y sulfamidas como N-butilsulfamida, N-ciclohexilsulfamida, entre otras han sido evaluados como inhibidores de Anhidraza carbónica mostrando potente actividad inhibitoria en este ensayo *in vitro*.

En el presente trabajo de Tesis se evaluaron entre otros sulfamatos n-butilsulfamato y n-pentilsulfamato y la sulfamida *N*-butilsulfamida como anticonvulsivantes resultando ser activos frente al MES test. (Capítulo 3)

Referencias

[1] Schimmel P. Tao J. Hill J. Aminoacyl tRNA synthetase as targets for new anti-infectives. *FASEB J*, **1998**, *12*, 1599-1609, y referencias citadas en él.

[2] Von deer Haar F, Gabius, H-J, Cramer F. *Angew Chem Int Ed Engl* , **1981**, *20*, 217-223.

[3] Thomas S O, Singleton VL, Lowery JA, Sharper RW, Pruess LM, Porter JN, Mowat JH, Bohonos N. *Antibiot Annu*, **1956-1957**; 716-721.

[4] Shuman DA., Robins MJ, Robins RK. The synthesis of nucleoside sulfamates related to nucleocidin. *J.Am.Chem.Soc*, **1970**, 92, 3434-3437.

[5] Takahashi E. Beppu T. *J. Antibiot*, **1982**, 35, 939-947.

[6] Kini, G. D; Henry E. M; Robins, R.K; Larson S.B.; Marr J.J.; Berens, R.L, Bacchi CJ, Nathan, H.C; Keithly, J. S. *J.Med.Chem.*, **1990**, *33*, 44-48.

[7] Peterson, E. M.; Brownell, J.; Vince, R. *J.Med.Chem.*; **1992**, *35*, 3991-4000.

[8] Forest AK, Jarvest R.L; Mensah, L. M.; O'Hanlon P.J.; Pope, A. J.; Sheppard, R.J. *Bioorg. Med.Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 1871-1874.

[9] Brown MJB, Mensah LM, Doyle ML, Broom NJP, Osbourne N, Forrest AK, Richardson CM, O'Hanlon PJ, Pope AJ. *Biochemistry* **2000**;39, 6003–6011.

[10] Yu XY, Hill JM, Yu G, Wang W, Kluge AF, Wendler P, Gallant P. Synthesis and structure–activity relationships of a series of novel thiazoles as inhibitors of aminoacyl-tRNAsynthetases. *BioorgMed Chem Lett* , **1999**, 9, 375–380.

[11] Yu XY, Hill JM, Yu G, Wang W, Kluge AF, Wendler P, Gallant P. *Bioorg. Med Chem. Lett.*, **1999**; 9, 375–380.

[12] Zydowsky T, Yu G, Hill J, Rebek J, Shue YK. US Patent 5726195, **1998**.

[13] Winum, J-Y; Scozzafava, a.; Montero, J-L; Supuran, C.T. *Medical Research Review*, **2005**, *25* (2), 186-228.

[14] Jennings LJ, Macchia M, Parkin A. Synthesis of analogues of 5-iodo-2 0-deoxyuridine-5 0-diphosphate.*J Chem Soc Perkin Trans*, **1992**; *1*, 2197–2202.

[15] Camarasa MJ, Fernandez-Resa P, Garcia-Lopez MT, De las Heras FG, Mendez-Castrillon PP, Alarcon B, Carrasco L. Uridine 50-diphosphate glucose analogues: Inhibitors of protein glycosylation that show antiviral activity. *J Med Chem* **1985**; *28*, 40–46.

[16] Fernandez-Resa P, Garcia-Lopez MT, De las Heras F, San Felix A, Alarcon B, Carrasco L. Diphosphate modified antiviral analogues of uridine 50-diphosphate glucose derivatives. *Eur J Med Chem*, **1986**, *21*, 245–249.

[17]Fiandor J, Garcia-Lopez MT, De las Heras F, Mendez-Castrillon PP, San Felix A, Alarcon B, Carrasco L. Hexose-modified anti-viral analogues of uridine 50-diphosphate glucose derivatives. *Eur J Med Chem.*, **1986**; *22*, 59–65.

[18]Perez-Perez, M.J.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Camarasa, M.J. *Bioorg. Med. Chem* **1993**; *1*, 279–284.

[19] Vara Prasad, J.V.N.; Markoski, L.J.; Boyer, F.E.; Domagala, J.M.; Ellsworth, E.L.; Gajda, C.; Hagen, S.E.; Tait, B.D.; Lunney, E.A.; Tummino, P.J.; Ferguson, D.; Holler, T.; Hupe, D.; Nouhan, C-; Gracheck, S.; Vanderroest, S.; Saunders, J.; Iyer, K.; Sinz, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**; 9, 2217–2222.

[20]Nussbaumer, P.; Billich, A. *Exp Opin Ther Patents*, **2003**, *13*, 605–625.

[21] Poirier, D.; Ciobanu, L.C.; Maltais, R. *Exp Opin Ther Patents*, **1999**, 9, 1083–1099.

[22] Smith, H. J.; Nicholls, P. J.; Simons, C.; Le Lain, R. *Exp Opin Ther Patents*, **2001**, *11*, 789–824.

[23] Ahmed, S.; James, K.; Owen, C.P.; Sampson, L.; Patel, C.K. *Curr. Med. Chem.*; **2002**, 9, 263–273.

[24] Purohit, A.; Woo, L.W. L.; Chander, S.K.; Newman, S.P.; Ireson, C.; Ho, Y.; Grasso, A.; Leese, M. P.; Potter, B. V.L.; Reed, MJ. *J Steroid Biochem Mol Biol* , **2003**, *86*, 423–432.

[25] Howarth, N. M.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter. B.V.L. *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 219–221.

[26] Woo LWL, Purohit A, Reed MJ, Potter BVL. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1349–1351.

[27] Nussbaumer, P.; Billich, A. *Exp Opin Ther Patents* , **2003**, *13*, 605–625.

[28]Poirier, D.; Ciobanu, L.C.; Maltais, R. *Exp Opin Ther Patents*, **1999**, 9, 1083–1099.

[29] Smith, H.J.; Nicholls, P.J.; Simons, C.; Le Lain, R. *Exp Opin Ther Patents*, **2001**, *11*, 789–824.

[30] Howarth, N.M.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, BVL. *J. Med. Chem.* **1994**; *37*, 219–221.

[31] Purohit , A.; Woo, LWL.; Barrow, D.; Hejaz, H.A.M.; Nicholson, R.I.; Potter, B.V.; Reed, M.J; *Mo.l Cell. Endocrinol.*; **2001**, *171*, 129–135.

[32] Nussbaumer, P.; Lehr, P.; Billich, A. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 4310–4320.

[33] Elger, W.; Schwarz, S.; Hedden, A.; Reddersen, G.; Schneider, B. *J. Steroid. Biochem. Mo.l Bio.*;, **1995**, *5*, 395–403.

[34] Purohit, A.; Vernon, K.A.; Wagenaar; Hummelinck, A.E.; Woo, L.W.L.; Hejaz, H.A.M.; Potter, B.V.L.; Reed, M.J. *J. Steroid. Biochem. Mol. Bio.*;, **1998**, *64*, 269–275.

[35] Reed, J.E.; Woo, L.W.L.; Robinson, J.J.; Leblond, B.; Leese, M.P.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V.L. *Biochem. Biophys. Res. Commun* .; **2004**, *317*, 169–175.

[36] Li PK, Chu GH, Guo JP, Peters A, Selcer KW. Development of potent non-estrogenic estrone sulfatase inhibitors. *Steroids*, **1998**; *63*, 425–432.

[37] Ciobanu, L.C.; Boivin, R.P.; Luu-The, V.; Labrie, F.; Poirier, D. *J. Med. Chem.*;, **1999**, *42*, 2280–2286.

[38]Fischer, D.S.; Chander, S.K.; Woo, L.W.; Fenton, J.C.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*; **2003**, *84*, 343–349.

[39] Fischer, D.S.; Woo, L.W.; Mahon, M.F.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V. *Bioorg. Med. Chem.*; **2003**; *11*, 1685–1700.

[40] Nussbaumer, P.; Billich, A. *Exp Opin Ther Patents* **2003**; *13*, 605–625.

[41]Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Casini, A. *Med. Res. Rev.*, **2003**; *23*, 146–189.

[42] Supuran, C.T.; Scozzafava, A. *Exp. Opin. The.r Patents.*; **2002**; *1*, 2:217–242.

[43] Supuran CT, Scozzafava A. *Opin Ther .Patents*, **2000**;*10*:575–600.

[44] Tripp, B. C.; Bell, C.B., Cruz, F.; Krebs, C; Ferry, J.G. *J. Biol.Chem*, **2004**; *279*, 6683–6687.

[45] Lane, T.W.; Morel, F.M. *Proc. Nat.l Acad. Sc.i USA*, **2000**; *97*, 4627–4631.

[46] So, A.K.; Espie, G.S.; Williams, E.B.; Shively, J.M.; Heinhorst, S.; Cannon, G.C. *J. Bacteriol.*, **2004**; *186*, 623–630.

[47] Weber, A.; Casini, A.; Heine, A.; Kuhn, D.; Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Klebe, G. *J. Med. Chem*, **2004**; *47*:550–557.

[48] Maryanoff, B.E.; Nortey, S.O.; Gardocki, J.F.; Shank, R.P.; Dodgson, S.P.; *J. Med. Chem.*, **1987**, 30, 880–887.

[49] Barrios, I.A.; Bruno-Blanch, L.E.; Estiú, G.L. *J. Mol.Struct.Theochem*, **2002**, *580*, 243-250.

[50] Chufán, E.E.; Pedregosa, J.C.; Baldini, O.n.; Bruno-Blanch, L.E. *Il Farmaco*, **1999**, *54*, 838-841.

[51] Masereel, B.; Rolin, S.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *J.Med. Chem*, **2002**, *45*, 312-320.

[52] Supuran, C.T. *Exp Opin Ther. Patents* **2003**; *13*:1545–1550.

[53] Maryanoff, B.E.; Costanzo, M.J.; Nortey, S.O.; Greco, M.N.; Shank, R.P.; Schupsky, J.J.; Ortegon, M.P.; Vaught, J.L. *J. Med. Chem.*, **1998**; *41*, 1315–1343.

[54] David, F.; Parker, M, N.; Reitz, A.B.; Maryanoff, B.E. Pat WO **2006**/007435 A1.

[55] Lo, Y.S.; Nolan, J.C.; Walsh, D.A.; Welstead, W. *J. Eur Pat Appl* ,**1990**; 403, 185.

[56] Nolan, J.C.; Walsh, D.A.; Lo, Y.; Gathright, C.E.; Radvany, C.H.; Foxwell, M.; Whitman, L.; Graff, G.; Sancilio, L.F. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1990**; *42*, 533–537.

[57] Walsh, D.A.; Lo, Y.S.; Shamblee, D.A.; Welstead, W.J.; Nolan, J.C.; Graff, G. *J. Med. Chem.*, **1990**; 33, 2068–2070.

[58] Nolan, J.C; Walsh, D.A.; Lo, Y.; Gathright, C.E.; Radvany, C.H.; Foxwell, M.; Whitman, L.; Graff, G.; Sancilio, L.F. *J.Pharm. Pharmacol.*, **1990**; *42*, 533–537.

[59] Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Casini, A. *Med. Res. Rev.* , **2003**; *23*,146–189.

[60] Supuran, C.T.; Scozzafava, A. *Exp, Opin. Ther. Patents*, **2002**; *12*, 217–242.

[61] Supuran, C.T.; Scozzafava, A. *Exp, Opin. Ther. Patents*, **2000**; *10*, 575–600.

[62] Bäckbro, K.; Lowegren, S.; Osterlund, K.; Atepo, J.; Unge, T.; Hulten, J.; Bonham, N.M.; Schaal, W.; Hallberg, A. *J. Med. Chem*. **1997**, *40*, 898-902.

[63] Hulten, J.; Bonham, N.M.; Nillroth, U.; Hanson, T.; Zuccarello, G.; Bouzide, A.; Aqvist, J:; Classon, B.; Danielson, U.H.; Karlen, A.; Kvarnstrom, I.; Samuelson, B.; Hallberg, A. *J.Med.Chem*., **1997**, *40*, 885-897.

[64] Castro, J.L.; Baker, R.; Giublin, A.R.; Hobbs, S.C:; Jenkins, M.R.; Rusell, M.G.N.; Beer, M.S.; Stanton, J.A.; Scholey, K.; Hargreaves, R.J. *J.Med.Chem*. **1994**, *37*, 3023-3032.

[65] Acheson, R.M.; Bite, M.G.; Kemp, J.E.G. *J.Med.Chem*. **1981**, *24*, 1300-1304.

[66] Van Arman, C. G.; Miller, L. M.; O'Malley, M. P. J. *Pharmacol*. Exp. *Ther*. **1961**, 133, 90.

[67] Dougherty, J.M.; Probs, D.A.; Robinson, R.E.; Moore, J.D.; Klein, T.A.; Snelgrove, K.A.; Hanson, P.R. *Tetrahedrom*, **2000**, *56*, 9781- 9790.

[68] Abbate, F.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Orioli, P.; Stubbs, M. T.; Klebe, G. *J. Med. Chem*. **2002**, *45*, 3583-3587.

[69] Winum, J.-Y.; Innocenti, A.; Nasr, J.; Montero,J.-L.; Scozzafava, A.; Vullo D.; Supuran C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2005**, *15*, 2353-2358.

[70] Casini, A.; Winum, J.-Y.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2003**, *13*, 837-840.

[71] 3D- QSAR Design of Novel Antiepileptic Sulfamides. Luciana Gavernet, M. Josefina Dominguez Cabrera, Luis E. Bruno-Blanch and Guillermina L. Estiú. *Bioorg. Med.Chem.*, **2006**. Aceptado.

[72] Tesis Doctoral Luciana Gavernet. Presentada Junio **2006**, UNLP.

ANEXO 8

2D y 3D-QSAR

1. Introducción

El objetivo principal de las metodologías QSAR es poder predecir nuevas estructuras químicas, para priorizar los esfuerzos en la síntesis de nuevos ligandos.

La química computacional ha experimentado un enorme crecimiento en los últimos años. Ha logrado contribuir con nuevos métodos, integrando diferentes disciplinas como la informática, matemática, física y química orgánica, estadística, farmacología y bioquímica. La amplitud de este campo se puede ver en el Handbook reciente de Química Computacional.[1] Dentro de la química computacional, todos los métodos que relacionan la estructura molecular con descriptores de propiedades moleculares o actividades biológicas se pueden agrupar bajo el término (SPR)[i] Relación estructuras-propiedades. Los métodos QSAR[ii] (Relación Cuantitativa Estructura Actividad) son un tipo de SPRs ya que relacionan descriptores con la actividad biológica. El análisis QSAR es una herramienta utilizada en el Diseño Racional y permite cuantificar como una variación estructural modifica la actividad biológica. Para encontrar una relación entre la estructura molecular y las propiedades hay que representar a la estructura molecular a través de parámetros estructurales y/o fisicoquímicos denominados descriptores (electrónicos, lipofílicos, estéricos, etc).[2] Luego estos descriptores son usados para modelar la actividad biológica, utilizando cálculos computacionales de programas estadísticos de distinta complejidad que permiten encontrar ecuaciones matemáticas y relacionar la actividad biológica con los descriptores (Figura 1).

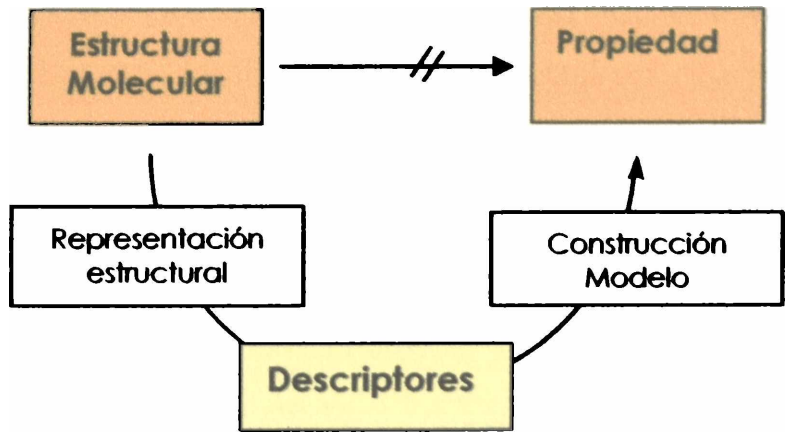


Figura 1. Construcción de la relación estructura-propiedad (actividad).

[i] SPR: Structure-Properties Relationship.
[ii] QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship.

En las últimas décadas se ha desarrollado una gran variedad de métodos para obtener descriptores moleculares.[3, 4, 5]

El análisis QSAR puede realizarse sin necesidad de conocer la estructura tridimensional del sitio receptor. Para ello, al igual que en la determinación del *patrón farmacofórico,* se debe contar con un conjunto de estructuras que manifiesten la misma respuesta biológica o interactúen con el mismo sitio receptor.

De esta manera podemos inferir que parámetros o porciones son responsables de manifestar una determinada actividad biológica. La ecuación matemática resultante nos permite determinar las propiedades que son importantes en la distribución sistémica y participan en el mecanismo de acción de un fármaco.

2. 2D-QSAR

Estudiando familias de congéneres, Hansch y Fuyita en 1964[6], y Hansch,[7] pudieron demostrar la existencia de una correlación entre la energía libre de unión ligando-receptor y la actividad biológica. El modelo extratermodinámico de Hansh permitió expresar valores de actividad biológica tales como constantes de afinidad, constates de inhibición, etc. con descriptores fisicoquímicos (log P, π, σ, y factor estérico).

Ecuación extratermodinámica de Hansch

$$\log 1/C = a \log P + b\sigma + c\,\pi + \ldots + k$$

donde **1/C**: actividad biológica

Descriptores o parámetros: Son propiedades moleculares calculadas a partir de la estructura química (peso molecular, área superficial, coeficiente de partición, etc.)

Definición de los descriptores:

Lipofílico
Log X = **log** PR_X - **log** PR_H

Hidrofóbico

P=Corg/Cac (P: coef. de partición octanol/agua).

Electrónico

σX = **log** K_X - **log** K_H (K: cte disociación)

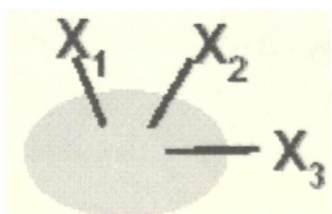
Al mismo tiempo Free y Wilson[8] desarrollaron un modelo matemático que relaciona la contribución de los sustituyentes en una molécula (aditividad estructural) con la actividad biológica. En este modelo no se utilizan descriptores fisicoquímicos sino estructurales. Considera que la contribución de cada sustituyente a la actividad es independiente una de otra. Como resultado obtiene una ecuación lineal multiparamétrica, que expresa la actividad biológica del conjunto en término de contribuciones de los sustituyentes.

Modelo de Free-Wilson

$$\log 1/C = \Sigma ai + \mu$$

ai = contribución de un grupo sustituyente.

μ = contribución a la actividad del compuesto de referencia.



X1, X2, X3 = sustituyentes

A partir de estos modelos se han desarrollado distintos modelos para interpretar la relación estructura actividad dando lugar a diferentes métodos que se clasifican según el tipo de descriptor que se utilice.

Los modelos de análisis 2D-QSAR dan una aproximación de cómo determinados parámetros o descriptores fisicoquímicos influyen en la actividad de una familia de congéneres. Se obtiene como resultado ecuaciones matemáticas que no tienen en cuenta las interacciones espaciales tridimensionales (conformación) que ocurren en una interacción fármaco-receptor. Esta limitación es superada por el análisis 3D-QSAR.

3. 3D-QSAR

Este método considera las propiedades espaciales de la molécula en estudio en lugar de considerar sustituyentes o porciones. Esto significa que da importancia a la conformación de la molécula en el espacio para la interacción droga-receptor.

Los programas actuales son asequibles y fáciles de usar. La filosofía de la metodología 3D-QSAR se basa en que las características más importantes de la molécula son *su tamaño* y *forma global* (campos estéricos) y sus *propiedades electrónicas* (campos electrónicos). Estos descriptores se independizan de parámetros relacionados con la identidad de los átomos de la molécula.

La metodología 3D-QSAR/CoMFA mide la similaridad molecular en el espacio utilizando descriptores que no dependen de la identidad de los átomos de la molécula.

Definidas estas características es posible estudiar como afectan a las propiedades biológicas. La relación cuantitativa entre los descriptores y la actividad biológica se puede describir haciendo uso de cálculos estadísticos, redes neuronales[9,10] o algoritmos genéticos[11].

Existen varias metodologías para el estudio 3D-QSAR, pero la más utilizada se conoce como CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis: Análisis Comparativo de Campos Moleculares)[12]. La metodología CoMFA asume que:

- la interacción fármaco-receptor no es covalente
- cambios en la actividad biológica están correlacionados con cambios en los campos de fuerza estéricos y/o electrostáticos de las moléculas.

Pasos a seguir al utilizar la metodología CoMFA [13]

La metodología CoMFA consiste en tres pasos fundamentales:

- Alineación de las moléculas.
- Cálculo de las propiedades o descriptores moleculares.
- Análisis computacional de las relaciones propiedades-actividad.

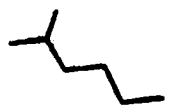
Procedimiento

❖ El conjunto de prueba (training set) que es el conjunto de las estructuras de los compuestos que han sido evaluados biológicamente con el mismo test y poseen al menos esa actividad biológica y el conjunto a testear (test set) estructuras no incluidas en el training set, deben presentar diversidad estructural.

❖ Se deben generar estructuras 3D de todas las moléculas del conjunto de datos.

❖ Alinear las moléculas de acuerdo a las propiedades de superficie y el farmacóforo, usando por ejemplo el programa Sybyl. En el caso de no contar con un farmacóforo se debe utilizar un método computacional para identificar una conformación adecuada para la alineación. La alineación de las moléculas en la grilla es un requerimiento muy importante en un estudio CoMFA. [14]

❖ Colocar las moléculas en una caja y generar una grilla que abarque un volumen lo suficiente grande como para contener a toda la molécula



(Figura 1). Cada punto (lattice) de la grilla define una posición en el espacio relativa a la molécula.

❖ Agregar un átomo de prueba (generalmente un átomo de hidrógeno o un carbono con hibridación sp3) con una carga positiva en uno de los puntos de la grilla.

❖ Calcular las propiedades del campo (interacciones estéricas y electrostáticas) para cada molécula entre el átomo de prueba y la molécula en estudio. Este proceso se repite para todos los puntos de la grilla. Con este procedimiento es posible definir propiedades geométricas y electrónicas en forma cuantitativa. Los datos obtenidos se tabulan para cada compuesto del conjunto (Figura 1, Tabla QSAR). En la tabla cada fila caracteriza una molécula y cada columna un descriptor.

❖ Una serie de *contornos* se pueden dibujar uniendo los *puntos de la grilla*, de valores similares definiendo un valor de corte, de la forma y tamaño de la molécula, las que generan numéricamente la *línea de contorno* más cercana.

Un proceso similar se lleva a cabo para medir las interacciones electrostáticas entre el átomo de prueba cargado en cada *punto de la grilla* y la molécula en estudio.

Análisis QSAR

El paso siguiente es relacionar estas propiedades con la actividad biológica de las moléculas. Esto es menos sencillo y difiere significativamente de la metodología 2D-QSAR.

En general en un estudio 2D-QSAR hay relativamente pocas variables involucradas con respecto al número de compuestos analizados. Por ejemplo: lipofilicidad, el factor π, el factor σ, y un factor de tamaño para cada molécula, siendo sólo cuatro variables para relacionar con la actividad biológica. En este caso estudiando 100 moléculas hay más moléculas que variables es posible encontrar una ecuación que relacione las variables con la actividad biológica. En la metodología 3D-QSAR las variables para cada molécula son las calculas por las interacciones estéricas y electrónicas para cada uno de los cientos de *puntos de la grilla*. Con 100 moléculas en estudio el número de variables sobrepasa significativamente al número de estructuras, y no es posible relacionar estas variables con la potencia biológica por medio de ecuaciones matemáticas de regresión linear como las que se utilizan en 2D-QSAR. Para ello se han desarrollado

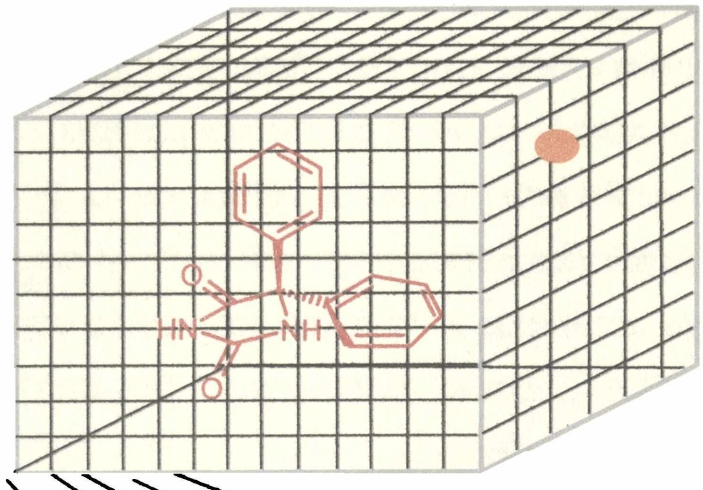
A.Barros

diferentes programas de análisis estadístico entre ellos se encuentra el PLS (Partial Least Square, Cuadrados Parciales mínimos).

Estructuras 3D

Alineación de las moléculas en la grilla.

Colocar en la grilla un átomo de prueba.



Átomo de prueba

Tabla QSAR

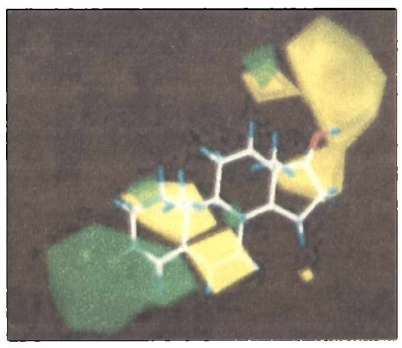
	Actividad (Y)	S1	S…..	E_1	En……
Comp.1	1				
……..	…..				
Comp.n	0.5				

PLS

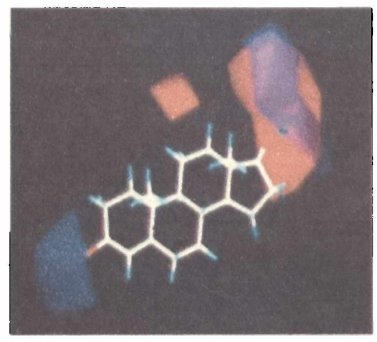
Análisis multivariable

$$Y = a + \beta_1 S_1 + \beta_2 S_2 + \ldots + \beta_n S_n + \beta_n E_1 + \beta_n E_2 + \ldots + \beta n E_n$$

Ecuación QSAR



Mapa de contorno estérico



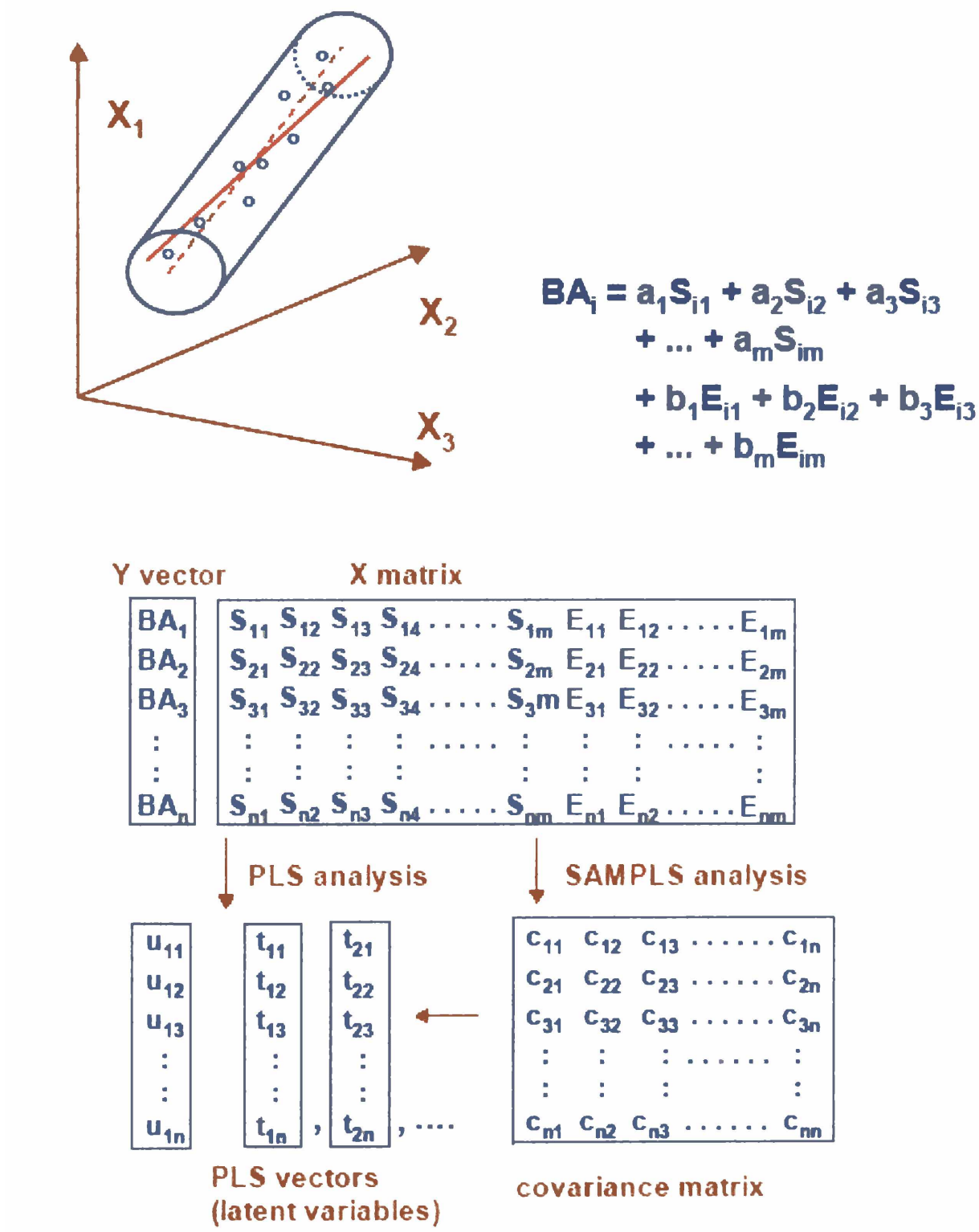
Mapa de contorno electrónico

Mapas de Contorno resultantes

Figura 1. Esquema general de aplicación del método CoMFA.(modificado de: Donald, B.B.; Lipkowitz, K.B. *Review in Computational Chemestry*, **1997**, *Vol.11*, Chapter 3, 127.

PLS y Validación cruzada

PLS[15,16] es un procedimiento estadístico, diferente al utilizado en las ecuaciones 2D-QSAR (RLM: Regresión Lineal Múltiple), capaz de generar ecuaciones lineales robustas a partir de una tabla con más columnas (descriptores) que filas (número de compuestos).



donde u= kt k= constante k1, k2, ...kj; j=número de vectores PLS.

Figura 2. Obtención de los vectores PLS.

Esencialmente éste es un proceso computacional analítico, y el cálculo matemático del análisis estadístico se basa en la aproximación de mínimos

parciales (suma vectorial), donde se elige una recta tal que la distancia de los puntos a la recta es la menor posible (Figura 2).

Este proceso se repite una y otra vez para tratar de encontrar la mejor ecuación que relacione las propiedades biológicas con las diferentes variables (descriptores).

Como parte del proceso, el programa reduce el número de variables *filtrando* aquellas que claramente no se relacionan con la actividad biológica. Para ello el programa realiza una *validación cruzada*. En la validación cruzada se llega a una ecuación QSAR con un subconjunto de compuestos y se predice con esa ecuación la actividad biológica de los compuestos que se dejaron afuera. Un procedimiento usado es el LOO (Leave-one-out) donde una estructura es dejada intencionalmente fuera del conjunto de prueba.

Una vez que la ecuación QSAR se define esta se comprueba frente a la estructura que fue sacada del conjunto de prueba para verificar que la ecuación predice la actividad. Estos resultados se reutilizan en otro cálculo, pero ahora la estructura que fue excluida se incluye en los cálculos y una estructura diferente se deja afuera. Esto devuelve una ecuación mejorada la cuál se testea nuevamente frente a la estructura que se dejó afuera, y así el proceso continúa hasta que la validación cruzada se realiza frente a todos los compuestos del conjunto de prueba (Figura 3).

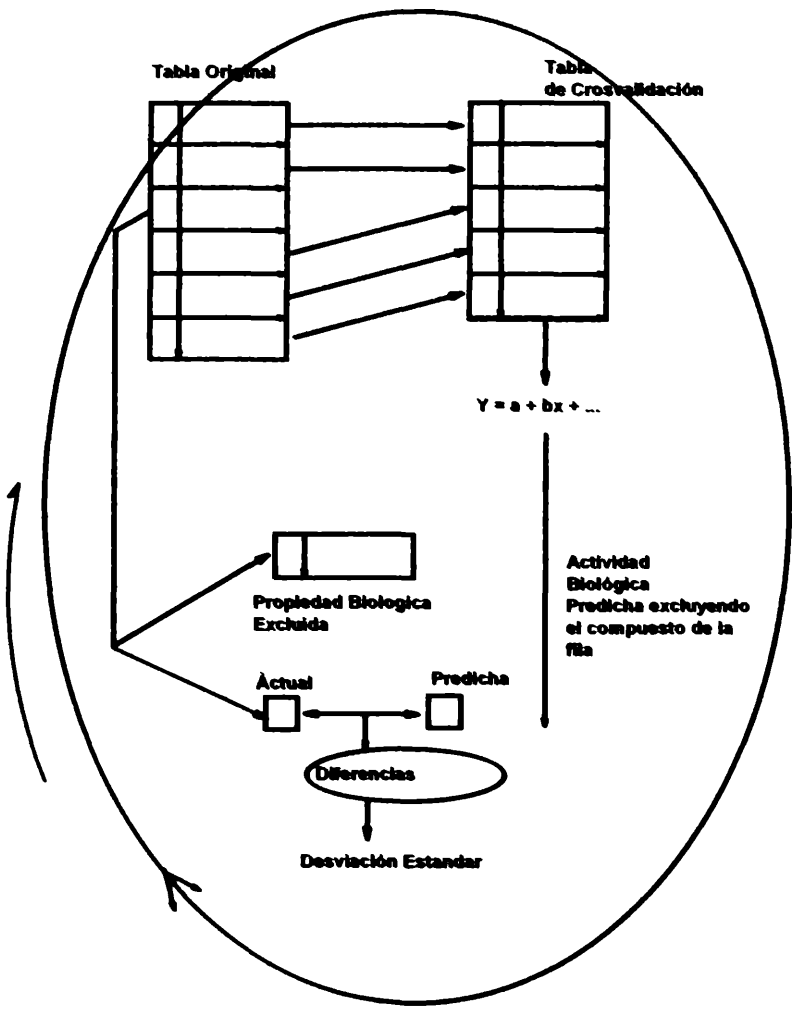
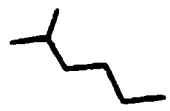


Figura 3. En la validación cruzada se llega a una ecuación QSAR con un subconjunto de compuestos y se predice con esa ecuación la actividad biológica del/los compuesto/s que se dejan afuera. Los procedimientos que se puede utilizar son el LOO (Leave-one-out) donde una estructura es dejada intencionalmente fuera del conjunto de prueba, o cuando se dejan afuera varios objetos (validación cruzada en grupos).



Ecuación QSAR

Al final del proceso el programa devuelve una ecuación filtrando aquellas variables que no correlacionan con la actividad o cuyo aporte a la ecuación no es significativo. Este número de variables óptimo es utilizado en la ecuación QSAR final la cuál se calcula incluyendo a todos los compuestos del conjunto de prueba.

El proceso obtiene una representación gráfica la cuál muestra cuáles son las regiones estéricas y/o electrostáticas importantes alrededor de la molécula para la actividad biológica (Figura 1, mapas de contorno).

Un mapa de contornos estéricos muestra una serie de contornos coloreados indicando interacciones estéricas que benefician o perjudican a la actividad, alrededor de una determinada molécula de las moléculas analizadas. Un mapa de contorno similar se usa para las interacciones electrostáticas.

Efecto Hidrofóbico- CoMSIA

En el análisis 2D-QSAR, el factor hidrofóbico es importante y la mayoría de las ecuaciones incluyen el valor de *log P* (coeficiente de partición octanol /agua). El calculo del factor hidrofóbico en el análisis 3D-QSAR utilizando el programa CoMFA no es posible realizarlo ya que este se basa en los factores estéricos y electrostáticos únicamente.

Sin embargo, estudios 3D-QSAR pueden llevarse a cabo teniendo en cuenta el factor hidrofóbico. El modelo CoMSIA[iii] (Análisis comparativo de indices de similiralidad molecular) calcula indices de similaridad en el espacio alrededor de cada una de las moléculas alineadas. Este modelo combina campos estéricos, electrostáticos, hidrofóbicos y formación de puente H.[17, 18, 19]

Los mapas de contorno derivados de la aplicación de ambos métodos CoMFA y CoMSIA permiten entender los requerimientos para la interacción ligando-receptor teniendo en cuenta efectos estéricos, electrostáticos, lipofílicos e interacciones puente de H.[20]

4. CoMFA vs 2D-QSAR

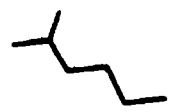
Los descriptores QSAR típicos como p*Ka*, σ, π, log P, E_s, se pueden correlacionar con éxito con varios de los descriptores de campo de la metodología CoMFA. [21]

[iii] Comparative Molecular Similarity Indices Analysis.

El análisis CoMFA también puede mapear en el espacio tridimensional contornos de frontera electrostáticos relacionados a energía del orbital molecular.[22] Por lo tanto si se puede resolver la alineación de las moléculas correctamente el análisis CoMFA puede aportar mayor información con respecto a las propiedades moleculares en la interacción droga-receptor que la proporcionada por un análisis QSAR convencional si tenemos en cuenta que es capaz de incluir en sus descriptores a los del QSAR 2D y además estudiar el espacio tridimensional.

En Resumen:

El análisis 3D-QSAR provee un resumen de cómo los cambios estructurales en una droga afectan la actividad biológica. Un modelo 3D-QSAR puede predecir que el aumento del volumen en una región particular de una molécula puede aumentar la actividad. Esto podría sugerir que excite un bolsillo hidrofóbico que permitiría una interacción extra. Sin embargo, también es posible que este efecto estérico adicional cause que la molécula se una con una orientación diferente a la de otras moléculas en el análisis, y esta sea la razón de su aumento de actividad.



Referencias

[1] Wiley-VCH,Weinheim. *Handbook of Chemoinformatics*, **2003**, *4*, J. Gasteiger (ed.).

[2] Gasteiger, Johann. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006** , *Vol. 49, No. 22*, 1-6.

[3] Todeschini, R.; Consonni, V. *Handbook of Molecular Descriptors*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2001**.

[4] Gasteiger, J. A Hierarchy of Structure Representations. In *Handbook of Chemoinformatics. From Data to Knowledge*; Gasteiger, J., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2003**; 1034-1061; ISBN 3-527-30680-3.

[5] *Chemoinformatics. A Textbook*; Gasteiger, J., Engel, T., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2003**; ISBN 3-527-30681-1.

[6] C. Hansch, T. Fujita. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86,1616–1626.

[7] C. Hansch, *Acc. Chem. Res.* **1969**, 2,232–239.

[8] Free, S. M. Jr.; Wilson, J. W. *J. Med. Chem.* **1964**, *7*, 395-399.

[9] Holcomb, T.R.; Morari, M. *Comput. Chem. Eng.*; **1992**, *16*, 393.

[10] Qin, J.L.; McAvoy, T.J. *Comput. Chem. Eng.*; **1992**, *16*, 379.

[11] Holland, J.H. *Sci. Am.*, **1992**, *267*, 66.

[12] Crammer, R. D. ; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. *J. Am.Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959–5967.

[13] Chapter 1: Quantitative structure-activity relationships. En: Patrik, G.L. An Introduction to Medicinal Chemestry, Oxford university Press, New York, **2001**, 258-288.

[14] Crammer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. *J. Am.Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959–5967.

[15] Wold, S.; Albano, C.; Dunn, W. J.; Edlund, U.; Esbenson, K.; Geladi, P.; Hellberg, S.; Lindburg, W.; Sjostrom, M. *In Chemometrics*; Kowalski, B., Ed.; Reidel: Dordrecht, The Netherlands, **1984**; 17.

[16] Geladi, P. J. Chemon. **1998**, *2*, 231.

[17] Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4130–4146.

[18] Klebe, G.; Abraham, U. *J. Comput. Aided Mol. Design*, **1999**, *13*, 1–10.

[19] Bohm, M.; Sturzebecher, J.; Klebe, G. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 458–477.

[20] M. R. Doddareddy, Cho, Y.S.; Koh, H.Y.; Pae, A.N. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3977–3985.

[21] (a) Kim, K.H.; Martin Y.C. *J.Med.Chem.*, **1991**, *34*, 2056.(b) Kim,K.H.; Martin Y.C.*J.Org.Chem.*, **1991**, *56*, 223.(c) Kim, K.H. In *3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Aplications*, H.Kubinyi, Ed.; ESCOM, Leiden, **1993**, 619-642.

[22] Greco, G.; Nvellino, E.; Silipo, C.; Vttoria, A. *Quant. Struct. Act. Relat.*, **1992**, *11*, 461.

I.A.Bioics

Anexo 9

Bioisósteros

La capacidad de un **bioisóstero** de presentar una actividad biológica similar se le atribuye a que **comparten propiedades fisicoquímicas comunes.**

Bioisóstero: Se define como tales a moléculas o grupo de átomos (funciones químicas) que producen una respuesta biológica semejante o antagónica al poseer propiedades físicas y/o químicas análogas.

La racionalización del concepto de *bioisóstero* por modificación de compuestos lideres se remite a *Langmuir* en 1919 y esta relacionada con la similitud que encontró en las propiedades fisicoquímicas de átomos, grupos, radicales y moléculas.[1] Langmuir comparó las propiedades físicas de varias moléculas como N_2 y CO, N_2O y CO_2, N_3^- y NCO^- y encontró que eran similares. En base a esto relacionó 21 grupos de isósteros. Aplicando la regla del octeto dedujo que el número y arreglo de electrones en estas moléculas son los mismos.

Una extensión de este concepto la introdujo Grimm en 1925 con la *Ley de Desplazamiento de Hidruros de Grimm.*[2, 3]

Esta Ley dice" *Átomos en cualquier sitio de la Tabla Periódica hasta cuatro lugares antes de un gas inerte, cambia sus propiedades por unión con 1 a 4 átomos de Hidrógeno, de tal forma que la combinaciones resultantes se comportan como pseudoátomos los cuáles son similares a los elementos situados en los grupos 1 a 4 lugares respectivamente, a su derecha.*" Tabla 1.

C	N	O	F	Ne	Na
	CH	NH	OH	FH	-
		CH_2	NH_2	OH_2	FH_2^+
			CH_3	NH_3	OH_3^+
				CH_4	NH_4^+

Tabla 1. Ley de desplazamiento de Hidruro de Grimm.

Erlemmeyer amplió la clasificación de Grimm y redefinió a los isósteros como átomos, iones, y moléculas en donde la capa externa de electrones se considera idéntica.[4]

La aplicación del concepto de isosterismo para modificar la actividad biológica, dio lugar al termino *bioisosterismo*.

Friedman[5] definió ***bioisoteros*** como todos los átomos y moléculas que encajan con la definición de isósteros y tienen un **tipo similar de acción farmacológica, la cuál puede ser también antagonista.**

- **Clasificación**

Se puede clasificar a los bioisósteros como clásicos y no clásicos.[6]Los bioisósteros clásicos se refieren a aquellos átomos, o grupos cuyos isóteros están dentro de la definición de la Ley de desplazamiento de Grimm y Erlemmeyer.
Estos a su vez se clasifican en:

- Átomos o grupos monovalentes
- Átomos o grupos divalentes
- Átomos o grupos trivalentes
- Átomos tetra sustituidos
- Anillos equivalentes

Los bioisósteros no clásicos no obedecen a la definición estérica y electrónica de la Ley de desplazamiento de Grimm y Erlemmeyer. Se caracterizan por no poseer el mismo número de átomos o grupos que la porción que esta siendo reemplazada.
Estos se dividen también en subgrupos:

- Estructuras cíclicas y no cíclicas
- Grupos intercambiables

Ejemplos de grupos bioisósteros intercambiables no clásicos, se muestran en la Tabla 2[7], éstos están relacionados a los bioisósteros no clásicos usados en este trabajo de Tesis.

Grupo Bioisóstero	Fórmula
Amida	-NHCO-
Amida invertido	-CONH-
Tioamida	-NHCS-
Homólogo de amida	$-CH_2NHCO-$
Cetometileno	$-COCH_2-$
Urea	-NHCONH-
Metilenamina	$-CH_2NH-$
Carbamato	$-NHCO_2-$
Tiocarbamato	-NHCOS-
Ester	$-CO_2-$
Sulfonamida	$-NHSO_2-$
Hidroxietileno	$-CH(OH)CH_2-$

Tabla 2. Bioisósteros no clásicos del Grupo amida.

Referencias

[1] Langmuir, I. *J.Am.Chem.Soc.*, **1919**, *41*, 1543-1559.

[2] Grimm, H.G. *Z.Electrochem* **1925**, *31*, 44-480.

[3] Grimm, H.G. *Naturwisenschaften*, **1929**, *17*, 557-564.

[4] Erlemmmeyer, H.; Leo, M. *Helv.Chim.Acta*, **1932**, *15*, 1171-1186.

[5] Friedman, H.L. *NASNRS* **1951**, *206*, 295-358.

[6] Burger, A. *In medicinal Chemestry, 3rd ed.*; Burger, A., Ed.; Wiley-Interscience: New York, **1970**, 64-80.

[7] Patani, G.A.; LaVoie, E.J. *Chem.Rev.*, **1996**, 96, 3147-3176.

Federratas

Capítulo 1. Página 19. Línea 13
Es: ..." ensayos clínicos (Anexo 4). "

Capítulo 1. Página 22. Línea 21
Es: " (Anexo 8). El conjunto de prueba..."

Capítulo 1. Página 23.
Figura 7. ....."Los átomos numerados representan al farmacóforo de la Figura 6."

Capítulo 1. Página 24. Línea 8
Donde dice Figura 7 es Figura 9.

Capítulo 1. Página 27. Línea 3
Donde dice ver Figura 4 es Figura 9.

Capítulo 1. Página 29. Línea 10
Es...." Con bases 6-31 G**."

Capítulo 1. Página 29. Línea 15
Es...." (G98 B3LYP /6-31G**."

Capítulo 2 . Página 39. Figura 2
El compuesto **5** es **6** y viceversa.

Capítulo 2. Página 45. Línea 11
Es: "..no se usa"....

Capítulo 2. Página 47. Línea 20.
Es .. .." (Esquema 5) a través de diversas"...

Capítulo 2. Página 49. Línea 19
Es: "....Topiramato , **6**. "

Capítulo 2. Página 49. Línea 23
Es .." (Esquema 8)"..

Capítulo 2. Página 50. Línea 8
Es: ..." clorosulfonil isocianato"...

Capítulo 2. Página 53. Esquema 15.
Es: " **Esquema 15.** Método **D** a): i) CH_2Cl_2, 0°C, 1 h; ii) 0°C , T°C amb. 18h. Método **E** b): Reacción del alcohol CSI. Metodo **F** c)"....

Capítulo 2. Página 54.Línea 12.
Dice: "...experimentales obtenidos, que se utilizó..." Es: "...experimentales obtenidos, se utilizó...

Capítulo 2. Página 54.Línea 13.
Es: (Esquema 17)..."

Capítulo 3. Página 110. Línea 17.
Es: " ...(Anexo 6)"... No "...(Figura)..."

Capítulo 3. Página 116. Línea 8.
Es: .." al menos un episodio"...

Capítulo 3. Página 124. Línea 2
Es: ..." la interpretación de la variación"...

Capítulo 3. Página 126. Línea 11.

Es: ..."alcohol (Val-OH):"...

Capítulo 3. Página 128. Línea 5.
Es: .." interdisciplinario obtener"...

Anexo 1. Página 155. Línea 20
Es: "generando así el patrón farmacofórico"...

Anexo 2. Página 169. Línea 14
Es:..." en vías de desarrollo (100 personas/10 mil)".

Anexo 3. Página 191.Línea 14
Es:...." hipersincronía"

Anexo 7. Página 257. Línea 13
Es: Sulfamidas