



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

**TOPOLOGÍA MOLECULAR APLICADA A LA  
BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA**

---

Farm. Mauricio Emiliano Di Ianni

Director: Dr. Luis Enrique Bruno Blanch / Co- Director: Dr. Alan Talevi

**2015**







## **AGRADECIMIENTOS**

Luis Bruno Blanch – Alan Talevi – Facultad de Ciencias Exactas – UNLP – CONICET – ANPCyT – Carolina Bellera – Lucas Alberca – Melisa Gantner – Andrea Enrique – María Luisa Villalba – Luciana Gavernet – Pablo Palestro – Laureano Sabatier – Julián Prieto – María Esperanza Ruiz – Sofía Goicoechea – Roque Dietrich – María Laura Sbaraglini – Francisco Morales – Sebastián Scioli – Alexandra Elbakyan – INAME – LASSE – Manuel Couyoupetrou – Ruben Greco – Sung Ching Moon – CINVESTAV- Padres –Hermanos – Amigos de hoy y de ayer – Gisela Díaz.



## ÍNDICE

|  |                 |
|--|-----------------|
| <b>Breve planteo del problema</b>  | <b>Pág. 11</b>  |
| <b>Capítulo I. Hitos en la Historia de la Epilepsia</b>  | <b>Pág. 17</b>  |
| <i>Contexto Histórico (Pág. 19) – Salud Pública y Capital Social de la Epilepsia (Pág. 26)</i>   |                 |
| <b>Capítulo II. Epilepsia</b>  | <b>Pág. 29</b>  |
| <i>Epilepsia: la enfermedad (Pág. 31) – Prevalencia de la Enfermedad (Pág. 33) – Clasificación de las epilepsias (Pág. 33) – Causas de la Epilepsia (Pág. 35) – Tratamiento de la Epilepsia (Pág. 37) – Epilepsia y Mortalidad (Pág. 41)</i>   |                 |
| <b>Capítulo III. Epilepsia Refractaria</b>   | <b>Pág. 49</b>  |
| <i>Definición de la ILAE e Impacto de la Epilepsia Refractaria (Pág. 51) – Mecanismos de Resistencia a Fármacos (Pág. 53) – La Hipótesis del Transportador (Pág. 54) – Glicoproteína-P (Pág. 53) – Base Molecular de la Poliespecificidad (Pág. 57) – Poliespecificidad de Sustrato (Pág. 60) – Inhibidores del transporte mediado por P-gp (Pág. 60) – ¿Cómo abordar clínicamente el problema de la farmacorresistencia mediada por P-gp? (Pág. 61) – Regulación de la expresión de la P-gp (Pág. 62)</i> |                 |
| <b>Capítulo IV. Fármacos Antiepilépticos</b>   | <b>Pág. 75</b>  |
| <i>Diversidad y Clasificación (Pág. 79) – Neurobiología y actividad antiepiléptica de los FAEs (Pág. 81) – El transporte de FAEs por la P-gp (Pág. 88) – Perspectiva sobre el desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivos (Pág. 91) – Desarrollo de nuevos FAEs con menos efectos adversos (Pág. 93) – Nuevos horizontes en el campo de la investigación y desarrollo de nuevos FAEs (Pág. 95)</i>   |                 |
| <b>Capítulo V. Química Medicinal</b>   | <b>Pág. 111</b> |
| <i>Lineamientos del enfoque / Argumentos (Pág. 114) – Cribado Virtual (Pág. 116) – Técnicas de Cribado Virtual (Pág. 119) – Desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia refractaria (Pág. 130)</i>   |                 |
| <b>Capítulo VI. Metodología</b>  | <b>Pág. 143</b> |
| <i>Generación de modelos QSAR (Pág. 145) – Selección de la actividad biológica a modelar. Construcción de la base de datos de sustratos y no-sustratos de P-gp (Pág.</i>   |                 |

147) -Tamaño y partición de la base de datos (Pág. 148) - Digitalización de estructuras químicas. Cálculo y manejo de descriptores moleculares (Pág. 150) - Generación / entrenamiento de los modelos (Pág. 153) - Validación de las Funciones Discriminantes (Pág. 157) - Criterios de selección de las mejores FDs (Pág. 158) - Valor de Corte. Combinación de modelos / Fusión de Datos (Pág. 160) - Cribado Virtual (Pág. 163) - Ámbito de aplicabilidad (Pág. 164) - Evaluación Biológica (Pág. 164) - Determinación de la actividad antiepiléptica de los candidatos seleccionados en modelos animales (Pág. 165) - Potencial de las sustancias seleccionadas para tratar epilepsias farmacorresistentes (Pág. 168) - Ensayo de transporte bidireccional en mono-capa de células MDCK II - MDR I (Pág. 168) - Ensayo de las drogas en un modelo de convulsiones farmacorresistentes inducidas por ácido 3-mercaptopropiónico (3-MP) (Pág. 170)

## **Capítulo VII. Resultados y Discusión**

**Pág. 179**

*Construcción de la base de datos de sustratos y no-sustratos de P-gp (Pág. 181) - Generación y validación de los modelos (Pág. 182) - Valor de Corte. Combinación de modelos / Fusión de Datos (Pág. 188) - Cribado virtual (Pág. 196) - Evaluación Biológica. Determinación de la actividad antiepiléptica de los candidatos seleccionados en modelos animales (Pág. 199) - Potencial de las sustancias seleccionadas para tratar epilepsias fármacorresistentes. Ensayo de transporte bidireccional en mono-capa de células MDCK II - MDR I (Pág. 201)*

## **Capítulo VIII. Conclusiones**

**Pág. 209**

## **Anexo**

**Pág. 213**







## BREVE PLANTEO DEL PROBLEMA

La epilepsia es un desorden crónico del cerebro que afecta a alrededor de 50 millones de personas en todo el mundo. Esta enfermedad no tiene una preferencia etaria, afectando a personas de cualquier edad, sino una regional: el 80% de los pacientes epilépticos pertenecen a países en vías de desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2015).

La epilepsia en la mayoría de los casos se caracteriza por la presencia de convulsiones recurrentes, las cuales son breves episodios de contracciones musculares involuntarias de alguna parte del cuerpo (convulsión parcial) o del cuerpo entero (convulsión generalizada). Estos episodios en ocasiones se acompañan por pérdida de la conciencia, así como también del control de esfínteres. Las convulsiones son el resultado de una descarga eléctrica excesiva de un grupo neuronal que puede situarse en partes del cerebro muy diversas. Estas cubren un rango de intensidad que va desde breves lapsos de pérdida de atención o espasmos musculares, a severos episodios de contracciones musculares de larga duración. La frecuencia con la que aparecen los episodios epilépticos también es variable, siendo en ocasiones menos de una por año hasta varias por día (Organización Mundial de la Salud, 2015).

La batería de tratamientos destinados a hacer frente a esta enfermedad comprende desde sofisticadas técnicas quirúrgicas de resección del foco epileptogénico, pasando por un arsenal de fármacos de diversas familias químicas, hasta llegar a dietas específicas y terapia basada en deportes (Laxer et al., 2014; Löscher, 2011; Arida, 2011). A pesar de los muchos esfuerzos realizados para encontrar un tratamiento exitoso para este mal, actualmente existe un 30% de la población de epilépticos que no logra controlar la aparición de convulsiones, condición conocida como **epilepsia refractaria o intratable** (Organización Mundial de la Salud, 2015). Además, las terapias farmacológicas actuales, presentan efectos adversos graves y comprometen seriamente la calidad de vida y la adherencia al tratamiento de los pacientes epilépticos (Löscher, 2011; Talevi & Bruno-Blanch, 2013). El impacto de la epilepsia, es multifacético y posee un amplio espectro de efectos. El carácter impredecible y peligroso de las convulsiones eleva el riesgo de lesiones, hospitalización y mortalidad y afecta negativamente la salud mental de los pacientes, que con frecuencia, deriva en ansiedad, depresión y deterioro cognitivo (Kerr, 2012).

Sufrir epilepsia, y en menor medida, recibir un tratamiento para la epilepsia, tiene un claro impacto en la autoestima del paciente. Incluso hoy, muchos pacientes epilépticos y sus familias son víctimas de estigmatización y marginación (De Boer,

2008). Los individuos que sufren de epilepsia pueden verse socialmente excluidos, privados de educación y de empleo y en algunos países, impedidos para contraer matrimonio (Organización Mundial de la Salud, 2015). Esta realidad ha llevado a varios países, entre ellos la Argentina, a sancionar y promulgar leyes, que protegen la integridad física y dignidad moral, a la vez que garantizan un tratamiento gratuito a los pacientes epilépticos (Organización Mundial de la Salud, 2015; Boletín Oficial, 2001).

El presente trabajo de tesis persigue el objetivo general de descubrir nuevos fármacos anticonvulsivos, capaces de controlar la sintomatología de la epilepsia refractaria asociada a regulación hacia arriba de la glicoproteína-P (P-gp), una proteína transportadora que restringe la biodistribución y promueve la eliminación de una gran diversidad de compuestos exógenos desde el organismo (Fromm, 2004; Taft, 2009) entre otras funciones. Abundante evidencia científica relaciona la sobre-expresión de esta glicoproteína con el fenómeno de resistencia múltiple a fármacos en varias enfermedades, entre ellas la epilepsia (Thomas, 2003; Kim, 1998; Löscher, 2005; Chengyun, 2006; Brandt, 2006; Marchi, 2004; Lazarowski, 2007; Robey, 2008). La afinidad de las sustancias por esta macromolécula es una propiedad relacionada con los procesos ADME/Tox (Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) a tener en cuenta al momento de iniciar un proyecto de descubrimiento de nuevos fármacos. La incorporación de filtros ADME/Tox *in vitro* e *in silico* en las etapas iniciales del proceso de desarrollo de nuevos fármacos ha logrado reducir considerablemente el porcentaje de proyectos que fracasan a nivel preclínico o clínico debido a problemas en la distribución de la droga en el organismo (Kola, 2004; Hop, 2004). Tales filtros descartan en las fases tempranas del proyecto de investigación de nuevos agentes terapéuticos aquellas estructuras que potencialmente podrían presentar características ADME/Tox desfavorables.

La Química Medicinal actual ha propuesto dos estrategias para superar la farmacorresistencia mediada por P-gp. La Primera consiste en desarrollar inhibidores de la glicoproteína, y co-administrarlos con fármacos conocidos que hayan demostrado ser sustratos de la P-gp. La segunda, propone identificar potenciales sustratos de la P-gp al principio del ciclo de desarrollo de nuevos fármacos, para seleccionar candidatos a fármaco menos propensos a ser transportados por este transportador (Penzotti, 2002.). En este trabajo, se explora la segunda estrategia, por medio de la construcción de modelos computacionales basados en el ligando. Estos modelos son clasificadores que establecen si una sustancia es sustrato o no de la glicoproteína-P. Dado que ya fue desarrollado dentro del grupo un clasificador que indica si una sustancia determinada presentará actividad anticonvulsiva o no (Talevi, 2007), la propuesta es utilizar estas funciones en conjunto, para extraer de grandes bases de datos aquellas sustancias anticonvulsivas capaces de eludir a la P-gp. Una vez halladas las

moléculas con estas características, deberán someterse a validación experimental, a través de los ensayos *in vitro* e *in vivo* pertinentes.

En esta pequeña sección inicial, se ha presentado el escenario en el cual se desarrolla el presente trabajo de tesis, es decir, se introduce a la problemática y a la manera en que se aborda para hallar una entre diversas posibles soluciones. En los capítulos que siguen, se recorrerán en detalle cada uno de los aspectos tenidos en cuenta en este estudio, de manera que el primer bloque, puramente teórico y de carácter introductorio, sentará las bases sobre las cuales pivotará la segunda parte, dedicada a la manera en que se proyectó y ejecutó una posible solución a la problemática de la epilepsia refractaria.

## REFERENCIAS

Arida R., Scorza F., Cavalheiro E. Role of Physical Exercise as Complementary Treatment for Epilepsy and other Brain Disorders. *Current Pharmaceutical Design*, **19** (38): 6720-6726. (2013).

Baker G., Jacoby A., Buck D., Stalgis C., Monnet D. Quality of life of people with epilepsy: a European study. *Epilepsia*, **38**: 353-362. (1997).

Boletín Oficial 03 de Abril de 2001. Ley 25.404. Adopción de Medidas de Protección para las Personas que Padecen Epilepsia. Buenos Aires, 7 de Marzo de 2001. (2001).

Brandt C., Bethmann K., Gastens A., Loscher W. The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, **24**:202-211. (2006).

Chengyun D., Guominq L., Elia M., Catania M., Qunyuan X. Expression of multidrug resistance type 1 gene (MDR1) P-glycoprotein in intractable epilepsy with different aetiologies: a double-labelling and electron microscopy study. *Neurological Science*, **27**:245-251. (2006).

De Boer H., Mula M., Sander J. The global burden and stigma of epilepsy. *Epilepsy Behavior*, **12**: 540-546. (2008).

Fromm M. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences*, **25**: 423-429. (2004).

Hop C., Cole M., Davidson R., Duignan D., Federico J., Janiszewski J. High throughput ADME screening: practical considerations, impact on the portfolio and enabler of in silico ADME models. *Current Drug Metabolism*, **9**: 847–853. (2004).

Kerr M. The impact of epilepsy on patients' lives. *Acta Neurologica Scandinavica*, **126**(194): 1–9. (2012).

Kim R., Fromm M., Wandel C., Leake B., Wood A., Roden D., Wilkinson G. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors, *Journal of Clinical Investigation*, **101**: 289–294. (1998).

Kola I., Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**: 711-716. (2004).

Laxer K., Trinkka E., Hirsch L., Cendes F., Langfitt J., Delanty N., Resnick T., Benbadis S. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy & Behavior*, **37**: 59-70. (2014).

Lazarowski, A., Czornyj, L., Lubieniaki, F., Girardi, E., Vazquez, S. and D'Giano, C. ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy. *Epilepsia*, **48**: 140–149. (2007).

Löscher W., Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiology*, **76**: 22–76. (2005).

Löscher, W., Schmidt, D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia*, **52**(4): 657–678. (2011).

Marchi N., Hallene K., Kight K., Cucullo L., Moddel G., Bingaman W., Dini G., Vezzani A., Janigro D. Significance of MDR1 and multiple drug resistance in refractory human epileptic brain. *BMC Medicine*, **2**:37. (2004).

Organización Mundial de la Salud. Nota Descriptiva N° 999. Mayo 2015. (2015).

Penzotti J., Lamb M., Evensen E., Grootenhuis P. A computational ensemble pharmacophore model for identifying substrates of P-glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**:1737–1740. (2002).

Robey W., Lazarowski A., Bates S. P-Glycoprotein—A clinical target in drug-refractory epilepsy? *Molecular Pharmacology*, **73**:1343–1346. (2008).

Taft R. Drug excretion. In *Pharmacology: Principles and Practice*, Hacker M, Messer WS, Bachmann KA (eds). Academic Press: San Diego, USA; 175–201. (2009).

Talevi A., Bellera C., Castro E., Bruno-Blanch L. A successful virtual screening application: prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *Journal of Computed Aided Molecular Design*, **21**: 527–538. (2007).

Talevi, A.; Bruno-Blanch, L. E. On the development of new antiepileptic drugs for the treatment of pharmaco-resistant epilepsy: different approaches to different hypothesis. In: *Pharmaco-resistance in Epilepsy. From Genes and Molecules to Promising Therapies*, pp. 207-224. EA, R. L. C., Ed. Springer: New York. (2013).

Thomas H., Coley H. Overcoming multi-drug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*, **10**: 159–165. (2003).





## CAPÍTULO I

### HITOS EN LA HISTORIA DE LA EPILEPSIA



Leones guardianes de las murallas de la puerta de Istar, una antigua entrada a la ciudad de Babilonia. Museo del Pérgamo, Berlín, Alemania.



## EPILEPSIA

### Contexto Histórico

La palabra epilepsia deriva del latín *epilepsia*, y este del griego ἐπιληψία, que significa interceptación<sup>1</sup>. De esto se desprende que la epilepsia es un trastorno ancestral; en efecto, los registros médicos de las civilizaciones más antiguas mencionan, de alguna manera u otra, a esta enfermedad. La epilepsia es un desorden que puede aparecer en todas las especies de mamíferos, probablemente aumentando su frecuencia en la medida en que los cerebros se vuelven más complejos. La epilepsia destaca por su distribución en todo el mundo, siendo los países en vías de desarrollo los más afectados pese a que no reconoce límites de clase social, geográficos o raciales; se produce en ambos sexos y en todas las edades, especialmente en la infancia y adolescencia y, cada vez más, en las poblaciones envejecidas (Reynolds, 2002).

La primera descripción escrita de una convulsión epiléptica aparece en un texto del año 2000 a.C., escrito en lenguaje acadio, utilizado en la antigua Mesopotamia. El autor describe a un paciente con sintomatología similar a la epilepsia: *“Gira su cuello hacia la izquierda, sus manos y pies están tensos y sus ojos bien abiertos, de su boca brota espuma sin tener ninguna conciencia de lo que está sucediendo”*, ante esta escena, la persona era sometida a un exorcismo, ya que se consideraba que se encontraba bajo la influencia del Dios de la Luna, sufriendo de una posesión denominada *antasubbû*, traducido como *“la mano del pecado”* (Labat, 1951). Este retrato define claramente el origen ancestral de una concepción sobrenatural sobre la epilepsia, a partir de la cual surge la estigmatización de los pacientes. En otras palabras, tanto el propio padecimiento como el estigma asociado tienen un origen arcaico.

Reportes posteriores sobre la epilepsia pueden a su vez encontrarse en textos médicos del Antiguo Egipto. El papiro quirúrgico Edwin Smith (1700 a.C.) hace referencia a convulsiones epilépticas al describir varios casos de pacientes que se *“estremecen excesivamente”* al sufrir algún tipo de traumatismo craneoencefálico o durante el proceso de examinación de heridas craneales. Esta descripción podría representar el primer reporte escrito de convulsiones focales causadas por irritación cortical, es decir epilepsia traumática (Magiorkinis, 2010).

Los babilonios también conocían la epilepsia, describiendo de manera clara esta condición y atribuyéndosela a espíritus malignos (Longrigg, 2000).

---

<sup>1</sup> <http://www.rae.es/> Real Academia Española © Todos los derechos reservados.

En el código Hamurabbi (1790 a.C), aparecen leyes relacionadas con la epilepsia. Se menciona que un esclavo puede ser devuelto con reembolso del dinero, si es que *Bennu* aparece dentro del mes de realizada la compra. De acuerdo con las investigaciones de Marten Stol, *Bennu*, es otra palabra para referirse a la epilepsia (Stol, 1993). Por su parte el *Sakikku* [Todas las Enfermedades] es uno de los más antiguos textos babilónicos sobre medicina (1067-1046 a.C.) en el cual se refiere a la epilepsia como *antasubba*<sup>2</sup> y *miqtu*. Este escrito, hace referencia a varios signos para el pronóstico, diagnóstico y el tratamiento de la condición epiléptica. El texto babilónico traducido describe semiológicamente muchos de los ataques epilépticos que hoy conocemos: convulsiones febriles, convulsiones en niños, *petit y grand mal*, el estado postictal, convulsiones focales y sensoriales, convulsiones parciales simples y complejas, el *status epilepticus* y la narcolepsia (Eadi, 2001; Scurlock, 2005).

Actualmente, la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) organiza y dirige una comisión específica formada por prestigiosos epileptólogos los cuales se encargan de organizar y clasificar los distintos tipos de epilepsias y de actualizar constantemente la terminología asociada a las mismas. El último avance en este sentido consiste en una compleja clasificación minuciosamente codificada según el tipo de convulsión y el diagnóstico electro-clínico específico resultando en la descripción de alrededor de 20 tipos distintos de convulsiones y 30 síndromes epilépticos (Jette, 2015).

A pesar de haber realizado una amplia descripción del fenómeno clínico, los babilonios no poseían el concepto de patología, con lo que, nuevamente, asignaban un espíritu maligno en particular a cada tipo de convulsión. Como consecuencia, el tratamiento no era médico, sino espiritual (Saraceno, 2005).

Un tiempo antes de que el padre de la medicina, Hipócrates de Cos (460-370 a.C.) se propusiese desterrar el carácter sobrenatural que envolvía a la epilepsia y proponer una etiología basada en una disfunción cerebral, la medicina India, a través del Cháraka – samjitá (VI a.C.), ya había adelantado una definición de epilepsia: “*Perdida repentina de la conciencia debida a la perturbación de la memoria y lucidez mental acompañada de convulsiones*”. En este texto, se describen cuatro tipos distintos de epilepsia, así como los síntomas premonitorios (aura) y un tipo de epilepsia llamada *Abasmara*, en el que los pacientes pierden la memoria (Pirkner, 1929).

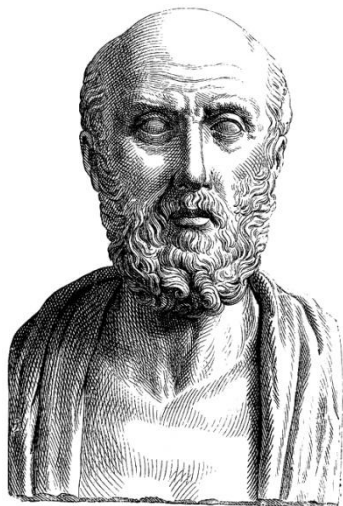
Durante el siglo V a.C., Hipócrates emprendería una dura lucha entre sus pares con el objetivo de abolir la noción sobre el origen místico de la epilepsia. El padre de la medicina moderna se encargó de criticar duramente a los médicos que atribuían

---

<sup>2</sup> Observar la similitud entre la palabra acadia “*antasubbû*” y la babilonia “*antasubba*”.

esta enfermedad a una intervención divina, llamándolos charlatanes y embusteros. Comenzó por brindar la primera descripción formal de la epilepsia en su escrito denominado “*Tratado sobre la Enfermedad Sagrada*”, el cual presenta diciendo:

*“A propósito de la llamada enfermedad sagrada he aquí lo que ocurre: me parece que no es en modo alguno más divina ni más sagrada que las demás enfermedades, sino que tiene una causa natural. Pero los hombres creyeron que su causa era divina, o por ignorancia o por el carácter maravilloso de la dolencia, que no se parece en nada a las otras enfermedades. Y si la imposibilidad de conocer lo divino confirma su punto de vista, la banalidad del sistema de curación que adoptan lo contradice, dado que la tratan por medio de purificaciones y encantamientos. Ahora bien, si se ha de considerar divina por sus extraordinarios rasgos, serán muchas las enfermedades sagradas y no una sola, porque yo demostraré que aquellas otras a quienes nadie considera sagradas no son menos extraordinarias ni prodigiosas... La verdadera raíz de esta dolencia, como también de muchas otras enfermedades violentas, está en el cerebro.”<sup>3</sup>*



**Hipócrates (460 - 370 a.C)**

Además de ser el primero en proponer una etiología cerebral de la epilepsia, Hipócrates, sugirió que podría tratarse de un mal hereditario<sup>4</sup>. Hipócrates, llamó a las crisis epilépticas “La gran enfermedad” originando el término “*grand mal*”. Él realizó una descripción clínica de la epilepsia, incluyendo los signos motores unilaterales, el aura y las convulsiones focales<sup>5</sup>. Sobre los factores que pueden conducir a las convulsiones, Hipócrates destacó los cambios en el viento y la temperatura de los mismos, la exposición de la cabeza al sol, los llantos y el miedo. En cuanto al pronóstico, estableció que es menos favorable cuando las convulsiones aparecen durante la temprana edad y más favorable cuando aparecen en la adultez.

Finalmente, con respecto a la terapéutica de la epilepsia, Hipócrates consideraba que esta enfermedad podía ser curada:

*“En consecuencia esta enfermedad considerada sagrada nace a raíz de causas idénticas a las demás, es decir, de los elementos que se acercan y se alejan del cuerpo, como el frío, el sol y los vientos, que cambian y nunca permanecen estables. Estas*

<sup>3</sup> Hippocrates. The sacred disease. In: *The genuine Works of Hippocrates*. Birmingham, AL, The Classics of Medicine Library, Gryphon Editions. (1985).

<sup>4</sup> Hippocrate. De la maladie sacrée, livre 6. In: Littré E, editor. *Oeuvres complètes d' Hippocrate*. Paris: Baillièrè; p: 364. (1849).

<sup>5</sup> Hippocrate. Sixième livre des épidémies, livre 5. In: Littré E, editor. *Oeuvres complètes d' Hippocrate*. Paris: Baillièrè;. P: 324. (1849).

*cosas son divinas, de modo que no hay ninguna necesidad de hacer distinciones con ella y considerarla más divina que las otras, todas son divinas y todas son humanas; y cada una tiene una naturaleza y esencia peculiares, pero ninguna es incurable ni irremediable.”<sup>6</sup>*

Reforzando el planteo de Hipócrates, Aristóteles (384 – 322 a.C.), aporta la relación existente entre el sueño y las crisis nocturnas<sup>7</sup>. Finalmente, y ya en el umbral de nuestra era, Galeno de Pérgamo (130 – 200/216 d.C.) condensa la propuesta de Hipócrates, aportando la nosología sistemática y una descripción altamente precisa de la epilepsia, en su obra maestra *Definiciones Médicas*:

*“Un ataque de la mente y los sentidos acompañado de una caída súbita, con o sin convulsiones. Además, a estos pacientes, les brotan fluidos espumantes por la boca cuando la crisis está remitiendo”<sup>8</sup>.*

Galeno fue capaz de discernir entre tres formas de epilepsia: (1) idiopática, atribuida a un desorden cerebral primario; (2) formas secundarias, provocadas por perturbaciones de la función cardíaca transmitida a través de la circulación de fluidos al cerebro y; (3) un tercer tipo, atribuida a perturbaciones en otras partes del cuerpo humano que se transmiten secundariamente al cerebro. Según Galeno:

*“En todas las formas de epilepsia, es el cerebro el que está enfermo”* (Brock, 1929).

El advenimiento del cristianismo y posteriormente la edad media se encargaron de reasignarle a la epilepsia el origen místico y demoníaco que Hipócrates combatió durante años. En el Nuevo Testamento se relata en varias ocasiones, como Jesucristo, por medio de la fe, “sana a una persona endemoniada”:

Evangelio según San Lucas IX, 37 – 43. **Jesús sana a un muchacho endemoniado.**

*“<sup>37</sup> Al día siguiente, cuando descendieron del monte, una gran multitud les salió al encuentro. <sup>38</sup> Y he aquí, un hombre de la multitud clamó diciendo: Maestro, te ruego que veas a mi hijo, pues es el único que tengo; <sup>39</sup> y sucede que un espíritu le toma, y de repente da voces, y le sacude con violencia, y le hace echar espuma, y estropeándole, a duras penas se aparta de él. <sup>40</sup> Y rogué a tus discípulos que le echasen fuera, y no pudieron. <sup>41</sup> Respondiendo Jesús, dijo ¡Oh generación incrédula y perversa! ¿Hasta cuándo he de estar con vosotros, y os he de soportar? Trae acá a tu hijo. <sup>42</sup> Y mientras se acercaba el muchacho, el demonio le derribó y le sacudió con violencia; pero Jesús*

---

<sup>6</sup> Hippocrate. De la maladie sacrée, livre 6. In: Littre E, editor. Oeuvres complètes d' Hippocrate. Paris: Baillière; p: 382. (1849)

<sup>7</sup> Aristotle. On sleep and waking. In: Hett WS, editor. On the Soul, Parva naturalia, On Breath. London: Loeb, 456B, p: 334-336. (1957).

<sup>8</sup> Galen. Definitiones medicae. In: Kühn CG, editor. Opera omnia, vol. 19. Leipzig: C. Nobloch; p: 414. (1821)

reprendió al espíritu inmundo, y sanó al muchacho, y se lo devolvió a su padre. <sup>43</sup> Y todos se admiraban de la grandeza de Dios<sup>9</sup>”.

Evangelio según San Marcos X, 14 – 29. **Jesús sana a un muchacho.**

<sup>14</sup> Cuando llegaron a donde estaban los otros seguidores, vieron que mucha gente los rodeaba y que estaban discutiendo con los maestros de la ley. <sup>15</sup> Tan pronto la gente vio a Jesús, quedó muy sorprendida y todos corrieron a saludarlo. <sup>16</sup> Jesús les preguntó: ¿Qué están discutiendo con ellos? <sup>17</sup> Uno de entre la multitud le respondió: Maestro, te he traído a mi hijo porque está atormentado por un espíritu que no lo deja hablar. <sup>18</sup> Cuando se apodera de él, lo hace caer al suelo, escupe espuma por la boca, le rechinan los dientes y se queda rígido. Les pedí a tus seguidores que expulsaran al espíritu, pero no pudieron. <sup>19</sup> Cuando Jesús escuchó esto, dijo: ¡Partida de incrédulos! ¿Cuánto tiempo más tendré que estar con ustedes? ¿Hasta cuándo tendré que soportarlos? Tráiganme al muchacho. <sup>20</sup> Trajeron al muchacho. Cuando el espíritu vio a Jesús, hizo que el muchacho empezara a convulsionar. El muchacho cayó al suelo, dio muchas vueltas y echó espuma por la boca. <sup>21</sup> Jesús le preguntó al papá: — ¿Cuánto tiempo ha estado así? Él le respondió: Ha estado así desde que era niño. <sup>22</sup> Muchas veces lo ha tirado al fuego o al agua para matarlo. Por favor, si puedes hacer algo, ten compasión de nosotros y ayúdanos. <sup>23</sup> Jesús le dijo: No digas: “Si puedes hacer algo”, todo es posible para el que cree. <sup>24</sup> Enseguida el papá del muchacho gritó muy fuerte: ¡Creo, ayúdame a creer aún más! <sup>25</sup> Cuando Jesús vio que se estaba reuniendo mucha gente, reprendió al espíritu maligno: Espíritu que has vuelto sordo y mudo a este muchacho, te ordeno que salgas de él y no vuelvas a entrar nunca más. <sup>26</sup> El espíritu gritó, tiró al muchacho al suelo, lo hizo convulsionar otra vez y salió de él. El muchacho estaba tan agotado que parecía un cadáver. Unos decían que estaba muerto. <sup>27</sup> Pero Jesús lo tomó de la mano y lo ayudó a ponerse de pie. El muchacho se levantó sin problemas. <sup>28</sup> Cuando Jesús entró en casa y estaba solo, sus seguidores le preguntaron en privado: ¿Por qué nosotros no pudimos expulsarlo? <sup>29</sup> Jesús les dijo: Esa clase de demonios sólo se pueden expulsar por medio de la oración y el ayuno<sup>10</sup>”

Evangelio según San Mateo XVII, 14–20. **Jesús sana a un muchacho endemoniado.**

<sup>14</sup> Cuando llegaron a la multitud, un hombre se acercó a Jesús y se arrodilló delante de él. <sup>15</sup> Señor, ten compasión de mi hijo. Le dan ataques y sufre terriblemente. Muchas veces cae en el fuego o en el agua. <sup>16</sup> Se lo traje a tus discípulos, pero no pudieron sanarlo. <sup>17</sup> ¡Ah, generación incrédula y perversa! respondió Jesús. ¿Hasta cuándo tendré que estar con ustedes? ¿Hasta cuándo tendré que soportarlos? Tráiganme acá al muchacho. <sup>18</sup> Jesús reprendió al demonio, el cual salió del muchacho, y éste quedó sano desde aquel momento. <sup>19</sup> Después los discípulos se acercaron a Jesús y, en privado, le preguntaron: ¿Por qué nosotros no pudimos

<sup>9</sup> [www.biblegateway.com](http://www.biblegateway.com)

<sup>10</sup> [www.biblegateway.com](http://www.biblegateway.com)



expulsarlo? <sup>20</sup> Porque ustedes tienen poca fe les respondió. Les aseguro que si tienen fe tan pequeña como un grano de mostaza, podrán decirle a esta montaña: “Trasládate de aquí para allá”, y se trasladará. Para ustedes nada será imposible<sup>9</sup>.”



**La Transfiguración. Rafael Sanzio  
(1517 - 1520)**

Siglos más tarde, el pintor Rafael Sanzio (1483 - 1520), incluye este pasaje bíblico en su obra “La Transfiguración”, donde se puede ver claramente al joven sufriendo una convulsión en brazos de su padre.

No fue hasta el renacimiento, cuando Paracelso (1493 - 1541), en un intento de recuperar el raciocinio helénico, concibe la importancia de la relación médico - paciente en el tratamiento de epilépticos. Sin embargo, a pesar del enorme esfuerzo realizado por estas mentes privilegiadas que sin tener los medios que hoy conocemos, fueron capaces de dilucidar, describir y comprender un mal de altísima complejidad como la epilepsia, el paciente continuó siendo estigmatizado y marginado por la sociedad en la que vive hasta el día de hoy.

El conocimiento científico en torno a este padecimiento, fue avanzando paulatinamente a partir del siglo XVII en adelante, momento en el cual, el concepto Hipocrático de la epilepsia comenzó a arraigarse en Europa. En esta época se libró un gran debate orientado a diferenciar los “desórdenes mentales” de los “desórdenes nerviosos”, el cual culminaría en el surgimiento de la neurología moderna del siglo XIX (Willis, 1684).

En la primera mitad del siglo XX, con el desarrollo del electroencefalograma en humanos, se demuestra la teoría eléctrica de la epilepsia, propuesta por Robert Bentley Todd en 1849 y publicada en los artículos periódicos de la *Royal College of Physicians* de Londres (Todd, 1849). Todd era consciente de los grandes avances en el área del electromagnetismo por mantener una amistad con su contemporáneo londinense Michael Faraday. Influenciado por éste, Todd concibe a la “fuerza nerviosa” como una fuerza polar análoga a la electricidad pero mediada por fenómenos moleculares o nutricionales totalmente desconocidos; posteriormente, él optó por el término “polaridad nerviosa”. Aplicando el concepto de “descargas disruptivas” de Faraday (conversión de electricidad en luz y calor debido al incremento de polaridad), Todd propuso que en la epilepsia, un





**Robert Bentley Todd (1809 - 1860)**

Todd, fue capaz de prever de manera brillante muchos de los elementos que juegan un papel fundamental en la generación y propagación del impulso nervioso, al postular una analogía entre el cerebro y la batería galvánica, y siendo pionero en el uso del microscopio en medicina, anticipó la morfología de las células nerviosas (Todd, 1856):

*“...hay mucha evidencia para justificar y confirmar el hecho de que cada “fibra” (refiriéndose a los axones), está unida a una “vesícula neuronal” (refiriéndose a los cuerpos neuronales), y que cada vesícula, puede ser el punto de partida de una o más fibras...” (R. Todd).*

Los aportes de Todd, desencadenaron un crecimiento exponencial en el conocimiento en torno a los fenómenos que se producen en el cerebro epiléptico. Tuvieron que pasar 50 años para que Camilo Golgi (1843 – 1926) y Santiago Ramon y Cajal (1852 – 1934) en 1899 anunciaran la existencia de las células neuronales, hallazgo que les valió el premio Nobel. En 1929, Hans Berger (1873 – 1941), reporta el descubrimiento del electro-encefalograma en humanos (Berger, 1929), lo que condujo rápidamente a que William Gordon Lennox (1884–1960), en el Congreso de neurología de Londres de 1935, confirmase que las convulsiones son el resultado de descargas eléctricas en el cerebro, hito que acabó definitivamente con las teorías alternativas del origen de la epilepsia, como la teoría vascular (Reynolds, 2005). En 1952, los premios Nobel Alan Lloyd Hodgking (1914 – 1998) y Andrew Huxley (1917 – 2012) sentarían las bases para explicar

---

<sup>11</sup> Corriente eléctrica administrada sobre material animal. Término utilizado en honor a Luigi Galvani (1737 -1798), quien descubrió y describió la repuesta que provoca la aplicación de una corriente eléctrica sobre músculos aislados, animales vivos o muertos, cadáveres humanos, entre otros espectaculares experimentos.

que la “polaridad nerviosa” dilucidada por Todd, se debe a diferencias en las concentraciones de iones específicos en el interior y el exterior de las células nerviosas, transportados a través de canales iónicos (Reynolds, 2004).

Luego de la segunda mitad del siglo XX, las técnicas computarizadas de imágenes como la Tomografía Axial computada (TAC), la Imagen por Resonancia Magnética (IRM), la Video-Telemetría y la Magneto-encefalografía, llegarían para revolucionar el campo del diagnóstico médico incluyendo al de la epilepsia.

En un plano paralelo, la farmacoterapia de la epilepsia comienza su era moderna en 1856 con el surgimiento de los bromuros, el fenobarbital en 1912 y la fenitoína en 1938 y experimenta un crecimiento exponencial hasta la actualidad (Löscher, 2011), este tópico será tratado en una sección posterior.

### **Salud Pública y Capital Social de la Epilepsia**

A pesar de todos los avances científicos realizados desde el siglo XIX, la epilepsia sigue inmersa en un gran problema social cuyos cimientos están constituidos por los conceptos sobrenaturales o sagrados que lograron arraigarse profundamente a través de la historia. La ignorancia generalizada, el miedo y la incomprensión contribuyen a la marginación tanto legal como social de los pacientes epilépticos (Saraceno, 2005).

En este contexto, distintos grupos de personas relacionadas a la medicina y áreas afines, comienzan a reunirse para plantear y poner en práctica una postura científica y social orientada a una tarea fundamental: mejorar las vidas de las personas con epilepsia.

En el año 1909, en la ciudad de Budapest, un grupo de médicos Europeos, fundan la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) (Meinardi, 1999), la cual se orientaría a la colaboración internacional para generar conocimiento y educación sobre la epilepsia, difundiéndolo a través de lo que hoy es la prestigiosa revista de neurología clínica, *Epilepsia*. En 1961, se toma conciencia de la dimensión social de la epilepsia creándose la Oficina Internacional de la Epilepsia (International Bureau for Epilepsy, IBE), una organización sin fines de lucro de alcance mundial que engloba tanto a pacientes como a personas del ámbito científico.

En los últimos 30 años, la ILAE, ha jugado un rol protagónico en la definición y clasificación de convulsiones y síndromes epilépticos (ILAE, 1981; ILAE, 1989). Desde 1997, tanto la ILAE como la IBE, funcionan bajo el ala de la Organización Mundial de la Salud (OMS) por medio de lo que llaman las Campañas Globales Contra la Epilepsia. Gracias a esta iniciativa, muchos países, entre ellos la

Argentina, hoy disponen de una Ley Nacional, que protege la dignidad y los derechos civiles de los pacientes epilépticos, así como también garantiza que el Estado provea asistencia y tratamiento de manera gratuita a aquellas personas que sufran esta enfermedad. Este espíritu es el que finalmente logrará reducir a la nada a los vestigios de aquella concepción sobrenatural de la epilepsia que supo ser hasta el día de hoy el pretexto para segregar socialmente a personas en estado de vulnerabilidad.

## REFERENCIAS

Berger H. Uber das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, **87**:527–570. (1929).

Brock A. Greek medicine, being extracts illustrative of medical. London: Dent & Sons. (1929).

Eadie M., Bladin B. A disease once called sacred: a history of the medical understanding of epilepsy. Eastleigh: John Libbey; p. 17-20. (2001).

ILAE. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, **22**: 489–501. (1981).

ILAE. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia*, **30**: 389–399. (1989).

Jette N., Beghi E., Hesdorffer D., Moshe S., Zuberi S., Medina M., Bergen D. ICD coding for epilepsy: Past, present, and future—A report by the International League Against Epilepsy Task Force on ICD codes in epilepsy. *Epilepsia*, **56**(3): 348–355. (2015).

Labat R. Traité akkadien de diagnostics et pronostics médicaux. Paris – Leiden: Académie Internationale d’Histoire des Sciences, Brill; p. 80–1, 188–99. (1951).

Longrigg J. Epilepsy in ancient Greek medicine: the vital step. *Seizure*, **9**: 12–21. (2000).

Löscher W., Schmidt D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia*, **52**: 657–678. (2011).

Magiorkinis E., Sidiropoulou K., Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: Epilepsy in antiquity, *Epilepsy & Behavior*, **17**(1): 103-108. (2010).

Meinardi H. International League Against Epilepsy and its journal *Epilepsia* 1909–1999. Hilversum, Van der Weij BV Grafische Bedrijven. (1999).

Pirkner E. Epilepsy in the light of history. *Annals of Medicine History*, **1**: 453–480. (1929).

Reynolds E. Epilepsy in the world. Launch of the Second Phase of the ILAE/IBE/WHO Global Campaign Against Epilepsy. *Epilepsia*, **43**(6): 1–3. (2002).

Reynolds E. The John Hughlings Jackson 1935 Centenary Congress Medal. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, **76**(6): 858–859. (2005).

Reynolds E. Todd, Faraday, and the Electrical Basis of Epilepsy. *Epilepsia*, **45**: 985–992. (2004).

Saraceno B., Avanzini G., Lee P., eds. *Atlas: Epilepsy Care in the World*. World Health Organization. (2005).

Scurlock J., Andersen B. Diagnoses in Assyrian and Babylonian medicine. Chicago: Univ. of Illinois Press; p. 315–323. (2005).

Stol M. Epilepsy in Babylonia. Amsterdam: Brill; p: 5–7. (1993).

Todd R. The Lumleian lectures on the pathology and treatment of convulsive diseases. *London Medical Gazette*, **8**: 661–822. (1849).

Todd R., Bowman W. The physiological anatomy and physiology of man, 2 volumes. London: Parker. (1856).

Willis T. Pathology of the brain and nervous stock: on convulsive diseases. In: Pordage S, ed. The remaining medical Works of that famous and renowned physician *Dr Thomas Willis of Christ Church in Oxford, and Sidley Professor of Natural Philosophy in that famous University*. London, Dring, Harper, Leigh and Martyn, p: 1–89. (1684).





**Vincent van Gogh.** La noche estrellada (1889)

*“...entonces, de repente, vinieron las nauseas más mortales sobre mí espíritu, y sentí estremecerse cada nervio de mi cuerpo como si hubiese tocado los cables de una batería galvánica, mientras que las figuras angelicales se convertían en espectros sin sentido... sobrevino la negrura de la oscuridad; todas las sensaciones fueron devoradas como descendiendo corriendo con locura hacia el Hades. El silencio, la quietud y la noche eran el universo.”*

El pozo y el péndulo. Edgard Allan Poe. 1842.



## **EPILEPSIA: LA ENFERMEDAD**

La epilepsia fue definida conceptualmente en el año 2005 por un trabajo conjunto de la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) y la Oficina Internacional de Epilepsia (IBE) como un desorden del cerebro caracterizado por la predisposición sostenida en el tiempo a desarrollar convulsiones epilépticas (Fisher et al., 2005). Esta definición es interpretada de manera práctica como la aparición de dos convulsiones no provocadas separadas por un intervalo mayor a 24 horas y se utiliza como criterio de diagnóstico oficial de epilepsia. Dado que el riesgo de aparición de una segunda convulsión luego de una primera no provocada es de 40-52% (Berg & Shinnar, 1991) mientras que con dos convulsiones no febriles no provocadas, el riesgo a 4 años de sufrir una nueva es de 73% (Fisher et al., 2014), y que en ocasiones es muy importante para la salud del paciente anticiparse a la aparición de nuevas crisis, muchos epileptólogos experimentaron la necesidad de disponer de medios que les permitan iniciar un tratamiento independientemente del criterio establecido en 2005, con el objetivo de prevenir los riesgos inherentes a las crisis convulsivas repetitivas y el desarrollo de un estado crónico como consecuencia de esta reaparición recurrente de crisis epiléptica (Villanueva et al., 2010).

La definición de las “dos convulsiones no provocadas” ha sido de gran utilidad, pero es inadecuada en varios escenarios clínicos. Un paciente puede presentar una convulsión aislada luego de insultos cerebrales tales como un accidente cerebrovascular, infección del sistema nervioso central (SNC) o traumatismo craneoencefálico. Con los trastornos mencionados el paciente presenta un riesgo de sufrir una segunda convulsión no provocada comparable al riesgo de sufrir una nueva convulsión luego de dos convulsiones no provocadas (Hesdorffer et al., 2009).

Cuando dos individuos con un historial de al menos una convulsión no provocada tienen el mismo riesgo de sufrir una nueva que un individuo que ha sufrido dos convulsiones no provocadas, tenemos un argumento para decir que sufren epilepsia. Por otro lado, dentro de los límites de la definición del 2005, un paciente podría tener epilepsia fotosensible y sin embargo no ser considerado epiléptico ya que las convulsiones son provocadas por la luz. Otro podría permanecer libre de convulsiones y de tratamiento farmacológico durante 50 años y aun así seguir padeciendo epilepsia. Estos son algunos de los justificativos por los cuales el equipo de trabajo dedicado a definir y actualizar la terminología asociada a la epilepsia de la ILAE, reconociendo la necesidad de suplir las falencias de la anterior definición, ha brindado una ampliación de la misma, la cual fue denominada

“Definición clínica práctica de la epilepsia” (Fisher et al., 2014). Consiste en un marco clínico que establece lo siguiente:

- La epilepsia es una enfermedad cerebral definida por la aparición de cualquiera de las siguientes condiciones:

1. Al menos dos convulsiones no provocadas (o reflejas) separadas por un intervalo de tiempo mayor a 24 horas.

2. Una convulsión no provocada (o refleja) y una probabilidad de desarrollar nuevas convulsiones similar al riesgo de recurrencia general (al menos 60%) después de dos convulsiones no provocadas, en el transcurso de 10 años (Hauser et al, 1998).

3. Diagnóstico de síndrome epiléptico, entendido por tal a cualquier conjunto de signos y síntomas electro-clínicos o semiológicos hallados sobre la base de alteraciones genéticas, del desarrollo, lesiones específicas u otras causas, que de estar presentes, se presume que pueden derivar en epilepsia, incluso si el riesgo de desarrollar convulsiones es bajo, como por ejemplo en el caso de epilepsia benigna con espigas centro-temporales (Fisher et al., 2014; Berg et al., 2010).

- La epilepsia es considerada resuelta para individuos que, sufriendo un síndrome epiléptico dependiente de la edad, han superado la edad aplicable y permanecido libre de convulsiones por más de 10 años o aquellos que permanezcan libres de convulsiones por los últimos 10 años, sin medicación antiepiléptica por los últimos 5 años (Fisher et al., 2014).

Las definiciones traen aparejadas consecuencias. Desde el punto de vista del paciente, la epilepsia está asociada con estigmatización y repercusiones psicológicas, sociales, cognitivas y económicas tan importantes como para ser tomadas en cuenta al construir una definición conceptual de la enfermedad (Fisher et al., 2005). Por otra parte, la nueva definición práctica puede mejorar el abordaje terapéutico de la epilepsia por medio de la concientización de los profesionales médicos acerca de la necesidad de considerar más en profundidad el riesgo posterior a la aparición de una convulsión no provocada. De esta manera pueden iniciarse tratamientos de forma preventiva para disminuir al mínimo el daño cerebral por convulsiones recurrentes.

Dado que el tratamiento farmacológico puede estar justificado sin un diagnóstico definitivo, debe analizarse cada cuadro de manera individualizada. Los creadores de esta nueva definición han tenido especial cuidado en lograr que la misma abarque a personas de cualquier clase social y que sea independiente de cualquier tecnología costosa no universalmente accesible (Fisher et al., 2014).



## **Prevalencia de la Enfermedad**

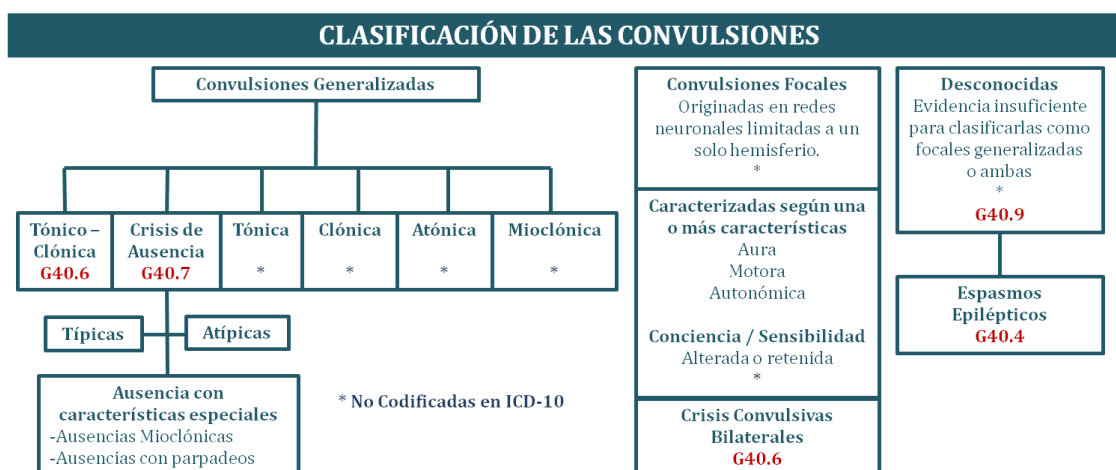
A nivel mundial. Se estima que 65 millones de personas viven hoy con epilepsia (Ngugi et al., 2010). La incidencia de la epilepsia en países desarrollados es aproximadamente de 50 casos cada 100.000 habitantes por año con las mayores tasas en niños y ancianos (Banerjee et al., 2009; Forsgren et al., 2005). En países de ingresos bajos y medios, donde los pacientes no siempre reciben un tratamiento adecuado, la incidencia asciende a 100 casos cada 100.000 habitantes por año (Banerjee et al., 2009; Sander, 2003). En los países desarrollados, los nuevos casos aparecidos en la población general oscilan entre 40 y 70 por cada 100.000 habitantes. En los países en vías de desarrollo, la cifra suele acercarse al doble debido al mayor riesgo de sufrir afecciones que pueden producir daño cerebral permanente. Cerca del 80% de los casos mundiales de epilepsia se registran en regiones de bajos recursos. Solo una cuarta parte de esos pacientes reciben el tratamiento que necesitan, situación denominada brecha terapéutica. (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la epilepsia representa un 0.5% de la carga mundial de morbilidad (medida que combina los años de vida perdidos debido a la mortalidad prematura con el tiempo vivido en situaciones en las que la salud no es plena). La epilepsia tiene importantes repercusiones económicas por la atención sanitaria que requiere, las muertes prematuras y la pérdida de productividad laboral que ocasiona. Aunque los efectos sociales varían según el país, la discriminación y la estigmatización social que rodean la epilepsia son a menudo más difíciles de vencer que las propias convulsiones. Como ejemplo, en EE.UU hasta los años setenta a las personas que manifestaban crisis epilépticas se les podía negar el acceso a restaurantes, teatros, centros recreativos y otros edificios públicos en tanto que en China e India la epilepsia es considerada a menudo como motivo para prohibir o anular casamientos. De esta manera la estigmatización de la enfermedad puede hacer que los afectados no busquen tratamiento para evitar que se los identifique como epilépticos (Organización Mundial de la Salud, 2015).

## **Clasificación de las Epilepsias**

Después de 1985, el primer gran aporte para la clasificación de las epilepsias fue realizado por la Comisión de Clasificación y Terminología de la ILAE en el año 2010 (ILAE, 1981; ILAE 1989; Berg et al., 2009). A través de las últimas dos décadas, los avances en neuro-imagen, neurofisiología y genética dieron como resultado un mayor entendimiento de las causas de la epilepsia incidiendo por lo tanto en el tratamiento de la enfermedad. La estructura central de la clasificación del 2010

está comprendida por: tipo de convulsión, síndrome y etiología (Berg et al., 2009). Esta clasificación fue diseñada para reflejar los mencionados avances científico-tecnológicos y ayudar en el proceso de diagnóstico clínico, enfatizando en que la evaluación de una persona con epilepsia comienza con la descripción del tipo de convulsiones o cuando sea posible, la definición de un síndrome epiléptico y clasificación de etiología (Jette et al., 2015).



**SÍNDROMES ELECTRO-CLÍNICOS Y OTRAS EPILEPSIAS AGRUPADAS POR DIAGNOSTICO ESPECÍFICO**

| Periodo Neonatal                          |              | Infancia  |              | Niñez  |              | Adolescencia- Adulthood                                      |              |
|---|--------------|---|--------------|--|--------------|--|--------------|
| Convulsiones Neonatales Auto-limitadas    | <b>P90</b>   | Convulsiones Febriles   | <b>R56</b>   | Convulsiones Febriles  | <b>R56</b>   | Epilepsia Ausente Juvenil                                    | <b>G40.3</b> |
| Epilepsia Neonatal Familiar Auto-limitada | <b>G40.8</b> | Convulsiones Febriles +                                       | <b>G40.8</b> | Convulsiones Febriles +  | <b>G40.8</b> | Epilepsia Mioclónica Juvenil                                 | <b>G40.3</b> |
| Síndrome de Ohtahara                      | <b>G40.8</b> | Epilepsia Infantil Auto-limitada                              | <b>G40.8</b> | Epilepsia Occipital Temprana                                     | <b>G40.8</b> | Epilepsia con convulsiones tónico-clónicas generalizadas     | <b>G40.3</b> |
| Encefalopatía Mioclónica Temprana         | <b>G40.8</b> | Síndrome de West  | <b>G40.4</b> | Epilepsia con Mioclónias Atónicas                                | <b>G40.4</b> | Epilepsia autonómica dominante con características auditivas | <b>G40.0</b> |
|   |              | Síndrome de Dravet  | <b>G40.8</b> | Epilepsia Autolimitada con disparos centrotemporales             | <b>G40.0</b> | Otras Epilepsias Familiares del Lóbulo Temporal              | <b>G40.0</b> |
|   |              | Epilepsia Mioclónica en la Infancia                           | <b>G40.3</b> | Epilepsia del Lóbulo Frontal Autosómica Dominante Nocturna       | <b>G40.0</b> |  |              |
|   |              | Epilepsia de la Infancia con convulsiones focales migratorias | <b>G40.8</b> | Síndrome de Lennox-Gataut  | <b>G40.4</b> |  |              |
|   |              |   |              | Encefalopatía Epiléptica con disparos continuos durante el sueño | <b>G40.8</b> |  |              |
|   |              |   |              | Síndrome de Landau-Kleffner                                      | <b>G80.3</b> |  |              |

**Figura 1|** Terminología revisada para la clasificación de epilepsias y convulsiones ILAE 2011-2014 junto con los códigos ICD-10.

La figura 1 muestra la última revisión de este sistema de clasificación y su integración con la décima modificación de los códigos internacionales para las enfermedades (ICD-10) de la OMS.

Como se puede observar, la codificación ICD-10 presenta varias diferencias con la clasificación propuesta por la ILAE, agrupando epilepsias distintas en la misma categoría. La estructura de la clasificación ILAE está orientada a representar todas las variantes de la epilepsia en beneficio de profesionales médicos en ejercicio e investigadores; la OMS, en cambio, se enfoca en definir la gravedad de la enfermedad en términos de frecuencia, relación causa-efecto, complicaciones, mortalidad y costos.

Es evidente que se necesita una armonización entre ambas propuestas. Como consecuencia, la OMS ya ha alineado su nueva versión de códigos ICD, ICD-11, a la clasificación vigente de la ILAE, incorporando síndromes epilépticos y etiologías así como también códigos asociados a convulsiones, como por ejemplo, convulsiones sintomáticas agudas, estado epiléptico, etc., y códigos asociados a complicaciones de las convulsiones, como la muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP), un aspecto previamente ignorado en las clasificaciones iniciales ICD de la OMS (Jette et al., 2015).

### **Causas de la epilepsia**

Los avances actuales en el campo de la genética molecular, la neuro-imagen y disciplinas afines están conduciendo a una sistematización racional, basada en mecanismos, de las causas de la epilepsia. En este contexto, las causas de la enfermedad pueden clasificarse en genéticas, metabólicas/estructurales, y desconocidas (Berg & Scheffer, 2011).

**Causas Genéticas (Epilepsia Idiopática):** las causas genéticas contribuyen a una amplia diversidad de epilepsias en seres humanos. Dichas causas originan algunas formas raras de la enfermedad que se heredan con un modelo mendeliano, autosómico dominante o autosómico recesivo.

Se han identificado genes mutantes asociados a diversos tipos de epilepsia. La epilepsia generalizada con crisis convulsivas de origen febril (GEFS+) se origina por una mutación puntual en la subunidad  $\beta$  de un canal de Sodio operado por voltaje (*SCN1B*). Se ha demostrado que dos formas de convulsiones neonatales familiares benignas se generan debido a mutaciones en dos genes que codifican para canales de Potasio distintos pero relacionados, *KCNQ2* y *KCNQ*. La epilepsia nocturna del lóbulo frontal autosómica dominante (ADNFLE) se relaciona con mutaciones de los genes que codifican para las subunidades  $\alpha 4$  y  $\beta 2$  del receptor colinérgico nicotínico *CHRNA4*. La epilepsia mioclónica juvenil autosómica dominante se asocia a una mutación de la subunidad  $\alpha 1$  del receptor GABA-A. Las epilepsias vinculadas a condiciones neurológicas progresivas tales como

encefalopatía mitocondrial y fenilcetonuria, también pueden incluirse en el grupo de epilepsias genéticas. La heterogeneidad de las mutaciones descritas hasta la fecha ha impedido el desarrollo de pruebas de diagnóstico simples, pero es probable que en los próximos años se produzcan avances que tengan un impacto tanto en el diagnóstico clínico como en el tratamiento de la epilepsia (Scheffer & Berkovic, 2003; Tafakhori et al., 2015; Achkar et al., 2015).

**Causas Metabólicas / Estructurales (Epilepsia Sintomática):** En este caso, la epilepsia es el resultado secundario de una alteración metabólica o estructural determinada. Las causas metabólicas y estructurales fueron combinadas en una sola categoría separada de las genéticas. Debe tenerse en cuenta sin embargo que existen lesiones estructurales tales como las malformaciones del desarrollo cortical que muchas veces tienen causas genéticas (Barcovich et al., 2005); lo mismo ocurre con numerosos desórdenes metabólicos.

La causa es considerada metabólica/estructural cuando existe una lesión estructural estática o progresiva o condiciones metabólicas como trastornos innatos del metabolismo, que se sabe que están asociados al aumento del riesgo de convulsiones. Pueden citarse como ejemplos a los traumatismos craneo-encefálicos, anoxia cerebral, accidente cerebro-vascular, esclerosis mesial-temporal, infecciones y encefalopatía hipóxica isquémica, entre otros (Thurman et al., 2011).

**Causa desconocida (Epilepsia Criptogénica):** En estos casos se desconoce la causa de la epilepsia con lo que se requiere mayor investigación para su identificación. El término criptogénica hace referencia a epilepsias y síndromes epilépticos focales o generalizados, con etiología no demostrada por las técnicas habituales de laboratorio o neuro-imagen, pero que se cree que son sintomáticos de una alteración histopatológica o celular oculta, aunque no de naturaleza genética; la ILAE ha recomendado reemplazar el término por epilepsia de causa desconocida (Thurman et al., 2011).

Existen una serie de factores que dificultan la asignación de una causa y que son generalmente pasados por alto:

**1. Causa Multifactorial de la Epilepsia:** Durante la última década, se ha puesto especial énfasis en recalcar que en la mayoría de los casos la epilepsia tiene una causa multifactorial (Talevi & Bruno-Blanch, 2013). La epilepsia puede ser el resultado de la combinación de factores tanto genéticos como adquiridos, por lo que asignar una categoría definida a la causa es muchas veces una decisión arbitraria. Sin embargo, habitualmente existe una causa predominante a la cual se atribuye el caso. En la práctica clínica, la urgencia de iniciar un tratamiento anticonvulsivo suele ser el justificativo de esta arbitrariedad.

**2. Causa versus Mecanismo:** John Hughlings Jackson insistió en que la causa de la epilepsia puede ser considerada un mecanismo de ictogénesis o epileptogénesis necesario para liberar energía del SNC en contraste con la asignación de la causa a una condición subyacente la cual en última instancia conduce a la epilepsia (Shorvon, 2011; Taylor, 1930). Él observó que la mayoría de las convulsiones poseen muchas similitudes en su evolución temporal, independientemente de la lesión que las causa. En las epilepsias genéticas, actualmente se está muy cerca de definir las causas dilucidando un mecanismo molecular, asimismo se están comenzando a esbozar explicaciones sobre los mecanismos ictogénicos de muchas epilepsias sintomáticas (Vezzani, 2015). Si el conocimiento actual fuera más completo, la asignación de la causa acorde al mecanismo podría ser la situación ideal y de hecho, debería ser el centro de cualquier esquema de clasificación (Shorvon, 2011).

**3. La causa depende del grado de investigación:** La identificación de la causa es altamente dependiente del grado de investigación y del desarrollo de tecnología. Antes del advenimiento de las imágenes obtenidas por resonancia magnética nuclear por ejemplo, muchos casos de displasia cortical y de esclerosis hipocampal no podían ser identificados de manera definitiva. De manera similar, previo a los avances en el campo de la genómica, muchas de las causas genéticas de la epilepsia no podían ser diagnosticadas (Shorvon, 2011).

## **Tratamiento de la Epilepsia**

En la actualidad existen varias formas de tratar los distintos tipos de epilepsia y crisis convulsivas, cada una de ellas asociada a determinadas tasas de efectividad, factibilidad, aspectos positivos y negativos, accesibilidad, carácter invasivo, pronóstico a largo plazo o impacto sobre la calidad de vida del paciente (Laxer et al., 2014). A continuación se hace una breve descripción de los tratamientos que actualmente se imparten para las epilepsias y convulsiones.

**1. Tratamiento Farmacológico (Farmacoterapia):** Los fármacos antiepilépticos (FAEs) proveen un control satisfactorio de las convulsiones en el 70% de los casos, permaneciendo un 30% de los pacientes con un cuadro no controlado (Kwan & Sander, 2004). Estos fármacos poseen la notable característica de proteger contra las convulsiones mientras permiten el normal funcionamiento del SNC. Los mismos actúan sobre una diversidad de blancos moleculares modificando selectivamente la excitabilidad de neuronas de manera que bloquean los disparos epilépticos pero sin perturbar la actividad cerebral normal. Esto ocurre principalmente a través de efectos sobre canales de sodio y canales de calcio operados por voltaje mediante los cuales interfieren en el comportamiento eléctrico de las neuronas y modulan la

liberación de neurotransmisores respectivamente. Compuestos como las benzodiacepinas y los barbitúricos modulan alostéricamente canales iónicos activados por ligandos como el GABA-A potenciando la inhibición sináptica por medio del aumento del flujo de iones cloruros en las neuronas. Entre otros mecanismos de acción de los FAEs se pueden mencionar la inhibición de la receptación de GABA por las neuronas presinápticas, disminución del catabolismo del GABA por inhibición irreversible de la enzima GABA transaminasa, inhibición de la excitación mediada por receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato, e inhibición de isoformas específicas de la anhidrasa carbónica. En el capítulo IV de la presente tesis se presentan de manera más amplia los aspectos más importantes de los FAEs incluyendo un detalle de su diversidad, mecanismos de acción, y las posibles razones del fracaso de estas terapias.

**2. Cirugía:** Para que un paciente sea considerado un posible candidato para intervenir quirúrgicamente, deben ponerse en consideración un conjunto de variables. Los análisis riesgo-beneficio de la cirugía incluyen no sólo los riesgos, sino también las expectativas reales en cuanto a la posibilidad de eliminar por completo las crisis convulsivas o sólo obtener una reducción de su frecuencia. Por ejemplo, los riesgos asociados a la resección de focos epilépticos del lóbulo temporal son mayores con respecto a la neuro-estimulación, pero si el objetivo es la erradicación de las convulsiones, el análisis es más favorable para la cirugía por sobre la neuro-estimulación (Laxer et al., 2014). A continuación se citan algunos ejemplos de cirugías haciendo una breve reseña de cada uno.

**a) Cirugía Resectiva:** Las resecciones del lóbulo temporal son las más seguras con tasas de complicaciones serias menores al 5% y actualización tecnológica continua (de Tisi et al., 2011). Las resecciones extra temporales sin lesión tienen una tasa mayor de complicaciones y una baja tasa de eliminación de convulsiones. Estas intervenciones muchas veces requieren el uso de electroencefalograma invasivo el cual posee sus propios riesgos (Vale et al., 2013). Los efectos adversos más frecuentes de la cirugía del lóbulo temporal son los defectos visuales del cuadrante visual superior (~8% para las lobectomías temporales y raras para las resecciones selectivas), infección de heridas (~5%) y disminución leve de la memoria verbal (~8%) (Georgiadis et al., 2013). Los mencionados suelen ser considerados riesgos aceptables dada la probabilidad de obtener la erradicación de las crisis convulsivas (Laxer et al., 2014).

**b) Callostomía (Resección del cuerpo calloso):** Esta intervención es paliativa y no apunta a la erradicación de las crisis convulsivas. La misma es practicada para combatir las convulsiones atónicas, convulsiones motoras severas, crisis generalizadas y epilepsia refractaria. Las complicaciones quirúrgicas son raras utilizando el esquema de operación

en dos fases (primero se remueven los dos tercios anteriores y luego el tercio posterior). El control de las crisis atónicas mediante la callostomía disminuye el riesgo de lesiones por impactos al caer, pudiendo incluso salvar vidas. Debido a que estos pacientes presentan serios trastornos neuropsicológicos, las complicaciones cognitivas suelen ser mínimas (Park et al., 2013).

- c) Hemisferectomía (Resección de un hemisferio cerebral completo):** Practicada en pacientes jóvenes con epilepsia severa, generalmente con lesiones y déficits hemisféricos (hemiplejias y alteraciones del campo visual). Pueden aparecer complicaciones quirúrgicas como la hidrocefalia, con lo que es necesaria la realización de una derivación (*shunt*) del líquido cefalorraquídeo mediante una válvula hacia otra parte del cuerpo. Esta técnica tiene una tasa de erradicación de crisis convulsivas del 60-65%, un detalle importante en el análisis riesgo-beneficio (Moosa et al., 2013).

### 3. Neuroestimulación

- a) Estimulación del Nervio Vago:** Disponible en Estados Unidos desde 1997, la estimulación del nervio vago (ENV) es una alternativa terapéutica ejemplo del paradigma “bajo riesgo-bajo costo”. Dado que es un procedimiento extra craneal, la ENV posee riesgos quirúrgicos mínimos y síntomas de tolerabilidad leves, como por ejemplo, tos, ronquera y cambios de voz (Fisher & Handforth, 1999).
- b) Estimulación Cerebral Profunda:** Utiliza electrodos intracraneales para estimular estructuras cerebrales supuestamente responsables de la actividad epiléptica. El primer y único ensayo clínico empleando estimulación de los núcleos anteriores del tálamo (N=110) no reportó muertes relacionadas al dispositivo ni al procedimiento. En cambio, el mismo produjo 5 informes de hemorragias y 14 de infecciones (Fisher et al., 2010).
- c) Neuroestimulación Responsiva:** Esta técnica emplea electrodos subdurales y o intra-parenquimales y representa una terapia de apoyo para el control de crisis convulsivas. El dispositivo detecta el comienzo de la actividad epiléptica en los electrodos implantados y entonces devuelve una estimulación eléctrica al foco epiléptico. En un ensayo clínico (N=119) no se observaron muertes relacionadas al procedimiento ni al dispositivo. El 5% de los pacientes sufrieron hemorragias; ninguno tuvo ningún déficit neurológico permanente. La tasa de infecciones fue del 5% (Morrell, 2011). La neuroestimulación responsiva fue aprobada en el año 2013 por

la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos. La misma posee la capacidad de tratar dos focos epileptogénicos al mismo tiempo y proporciona información diagnóstica de gran utilidad, incluyendo documentación de las convulsiones y sitios de inicio.

Los tratamientos de neuroestimulación limitan la posibilidad de tomar imágenes por resonancia magnética nuclear una vez que los electrodos son implantados, lo cual representa una gran desventaja. Curiosamente no se observan diferencias en la eficacia terapéutica de los tres tratamientos mencionados, pero las complicaciones son mucho más grandes para las dos técnicas intracraneales. Actualmente, la estimulación del nervio vago es la opción preferencial en virtud de la relación riesgo-beneficio (Laxer et al., 2014).

**4. Dieta Cetogénica:** La dieta cetogénica es un régimen alimenticio alto en grasas, moderado en proteínas y bajo en carbohidratos, utilizado para tratar cualquier tipo de convulsión, pero especialmente en epilepsia intratable en pacientes pediátricos. El conocimiento de esta terapia se remonta a tiempos antiguos. Hipócrates provee uno de los primeros registros de la prescripción de ayuno a pacientes epilépticos para purgar el cuerpo de humores polutos (Bailey et al., 2005). El ayuno para combatir la epilepsia también es mencionado en la Biblia cuando Jesús cura a un niño que sufre convulsiones: *“Esta clase de demonios sólo se puede expulsar con oración y ayuno”* (Mateo 17: 14-21), tal como se mencionó en el primer capítulo de esta tesis.

La dieta cetogénica clásica utiliza una proporción 4:1 o 3:1 de grasas con respecto a la suma de proteínas e hidratos de carbono. La misma está individualmente adaptada para proveer del 75 al 80% de las calorías diarias recomendadas y el 80% de la cantidad diaria recomendada de líquidos (Huffman & Kossoff, 2006). Un régimen de estas características obliga al organismo a obtener energía del metabolismo de grasas, con lo que existe formación excesiva de cuerpos cetónicos y una inducción orgánica de un estado de cetosis. Aunque el mecanismo exacto de la eficacia de esta terapia no se conoce, se ha postulado que los cuerpos cetónicos poseen un efecto estabilizante sobre el SNC y que el estado de acidosis y los cambios en el balance electrolítico podrían modificar el umbral convulsivo (Barañano & Hartman, 2008; Newman & Verdin, 2014).

Cuando se utiliza apropiadamente, la dieta cetogénica posee riesgos mínimos. Inicialmente pueden aparecer náuseas, constipación y otros síntomas gastrointestinales. Pueden ocurrir deficiencias nutricionales con lo que es necesario el uso de suplementos vitamínicos, calcio y minerales. La dieta cetogénica es más estricta en niños pequeños. Los riesgos iniciales de deshidratación e hipoglucemia son mitigados mediante la hospitalización al inicio



del tratamiento. Ninguna de las variantes de dieta cetogénica presenta riesgos cardiovasculares a largo plazo; sin embargo, estos regímenes deben ser cuidadosamente supervisados para evitar la aparición de trastornos del desarrollo u otras complicaciones de aparición tardía (Laxer et al., 2014).

## **Epilepsia y Mortalidad**

El riesgo de muerte prematura en personas que sufren epilepsia es mayor que en aquellos que no la padecen por varias razones, incluyendo muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP), accidentes, suicidios, enfermedades vasculares, neumonía, y factores directamente relacionados a causas subyacentes, como por ejemplo tumores cerebrales o enfermedades neurodegenerativas. Dentro de la epilepsia, la mortalidad es mayor en pacientes refractarios. En general, las personas con epilepsia poseen una tasa de mortalidad de 1.6 a 11.4 veces mayor a lo esperado (Trinka et al., 2013; Berg et al., 2013b; Ding et al., 2013; Holst et al., 2013; Nevalainen et al., 2013; Novy et al., 2013; Shorvon & Goodridge, 2013; So, 2013; Hesdorffer, 2013; Fazel et al., 2013).

Un estudio epidemiológico de gran magnitud realizado sobre 69.995 personas con epilepsia en Suecia con seguimiento durante 9 años, permitió obtener las tasas relativas (razón de momios) de la mortalidad en individuos con epilepsia comparado contra una población control y contra hermanos no afectados (Fazel et al., 2013). Los datos se resumen en la Tabla 1. Existen distintas medidas utilizadas para estimar la mortalidad dependiendo del diseño del estudio epidemiológico y de la información disponible de las muertes. Las medidas incluyen la tasa de mortalidad, fatalidad de los casos, tasa de mortalidad estandarizada, entre otras (Thurman et al., 2011). La tasa relativa (razón de momios) es calculada como el riesgo o la prevalencia de la enfermedad en un grupo dividido por el del grupo de referencia. Este método se prefiere sobre otros para retratar el impacto de un factor en un individuo y cuantificar el riesgo del mismo asociado a la enfermedad durante una investigación etiológica, dado que provee información del incremento del grado de riesgo de la enfermedad en grupos que poseen determinado factor, sobre otros que no lo poseen.

|                         | <b>Tasas relativas de muerte comparadas con una población control (95% CI)</b> | <b>Tasas relativas de muerte comparadas con hermanos no afectados (95% CI)</b> |
|-------------------------|--|--|
| <b>Todas las Causas</b> | <b>11.1 (10.6–11.6)</b>  | <b>11.4 (10.4–12.5)</b>  |
| <b>Causas Naturales</b> | <b>15.5 (14.6–16.4)</b>  | <b>16.7 (14.9–18.7)</b>  |
| Neoplasias              | 11.2 (10.3–12.2)   | 11.3 (9.4–13.7)  |
| Sistema Nervioso        | 71.1 (57.3–88.4)   | 86.9 (54.3–139.1)  |
| <b>Causas Externas</b>  | <b>3.6 (3.3–4.0)</b>   | <b>3.2 (2.7–3.7)</b>   |
| Suicidio                | 3.7 (3.3–4.2)  | 2.9 (2.4–3.6)  |
| Accidentes              | 3.6 (3.1–4.1)  | 3.6 (2.9–4.5)  |
| Accidentes de Tránsito  | 1.4 (1.1–1.8)  | 1.5 (1.1–2.2)  |
| <b>Otras</b>            | <b>5.5 (4.7–6.5)</b>   | <b>6.3 (4.6–8.8)</b>   |
| Sobredosis              | 5.1 (3.9–6.5)  | 5.7 (3.3–9.7)  |
| Caídas                  | 8.5 (5.3–13.7)   | 10.0 (2.9–33.8)  |
| Ahogo                   | 7.7 (4.7–12.7)   | 9.5 (3.5–25.7)   |
| Otras sin especificar   | 4.9 (3.6–6.5)  | 5.2 (3.2–8.5)  |
| Asaltos                 | 2.8 (1.6–4.8)  | 1.7 (0.9–3.3)  |

**Tabla 1** | Riesgos de muerte prematura en individuos con epilepsia comparados con una población control y hermanos no afectados.

Otros estudios confirman que la epilepsia se asocia con altas tasas de enfermedades cardiovasculares, cerebro-vasculares, abuso de sustancias, suicidios consumados y accidentes (Hesdorffer, 2013; Berg, 2013a; Sillanpää & Shinnar, 2013; Neligan et al., 2010; Mintzer, 2013; Nilsson et al., 1997; Bell et al., 2009; Kanner, 2013; Shackleton et al., 1999). Un meta-análisis concluye que el ahogo es de 15 a 19 veces más común en personas con epilepsia que en la población general y puede llegar a ser responsable del 5% de las muertes de personas con epilepsia (Bell et al., 2008).

En el capítulo siguiente se hará una extensa discusión sobre la epilepsia intratable o epilepsia refractaria, incluyendo desde aspectos técnicos como las definiciones suministradas por la ILAE orientadas a mejorar la práctica clínica hasta las hipótesis recientemente formuladas para explicar este fenómeno. Asimismo, se

encontrará una breve reseña sobre el impacto que posee una enfermedad incurable sobre un individuo y de las posibles estrategias terapéuticas disponibles para afrontar este problema.

## REFERENCIAS

Achkar C., Olson H., Poduri A., Pearl P. The Genetics of the Epilepsies. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **15**: article 39, 14p. (2015).

Bailey E., Pfeifer H., Thiele E. Historical review: the use of diet in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behavior*, **6**: 4–8. (2005).

Banerjee P., Filippi D., Allen H. The descriptive epidemiology of epilepsy — a review. *Epilepsy Research*, **85**: 31–45. (2009).

Barañano K., Hartman A. The Ketogenic Diet: Uses in Epilepsy and Other Neurologic Illnesses. *Current Treatment Options in Neurology*, **10**(6): 410–419. (2008).

Barkovich A., Kuzniecky R., Jackson G., Guerrini R., Dobyns W. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology*, **65**: 1873–1887. (2005).

Bell G., Gaitatzis A., Bell C., Johnson A., Sander J. Drowning in people with epilepsy: how great is the risk? *Neurology*, **71**: 578–82. (2008).

Bell G., Gaitatzis A., Bell C., Johnson A., Sander J. Suicide in people with epilepsy: how great is the risk? *Epilepsia*, **50**: 1933–1942. (2009).

Berg A., Shinnar S. The risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure: a quantitative review. *Neurology*, **41**: 965–972. (1991).

Berg A., Berkovic S., Brodie M., et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*, **51**: 676–685. (2009).

Berg A., Berkovic S., Brodie M., Buchhalter J., Cross J., Van Emde Boas W., Engel J., French J., Glauser T., Mathern G., Moshé S., Nordli D., Plouin P., Scheffer I. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*, **51**: 676–685. (2010).

Berg A., Scheffer I. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia*, **52**(6): 1058–1062. (2011).

Berg A. Mortality in childhood onset epilepsy. In: Partners Against Mortality in Epilepsy. Conference Summary. *Epilepsy Current*, **13**: 6–7. (2013a).

Berg A., Nickels K., Wirrell E., Geerts A., Callenbach P., Arts W., et al. Mortality risks in new-onset childhood epilepsy. *Pediatrics*, **132**: 124–131. (2013b).

de Tisi J., Bell G., Peacock J., McEvoy A., Harkness W., Sander J., et al. The longterm outcome of adult epilepsy surgery, patterns of seizure remission, and relapse: a cohort study. *Lancet*, **378**: 1388–95. (2011).

Ding D., Wang W., Wu J., Yang H., Li S., Dai X., et al. Premature mortality risk in people with convulsive epilepsy: long follow-up of a cohort in rural China. *Epilepsia*, **54**: 512–517. (2013).

Fazel S., Wolf A., Långström N., Newton C., Lichtenstein P. Premature mortality in epilepsy and the role of psychiatric comorbidity: a total population study. *Lancet*, **382**: 1646–1654. (2013).

Fisher R., Handforth A. Reassessment: vagus nerve stimulation for epilepsy: a report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, **53**: 666–669. (1999).

Fisher R., van Emde Boas W., Blume W., et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, **46**: 470–472. (2005).

Fisher R., Salanova V., Witt T., Worth R., Henry T., Gross R., et al. Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsia*, **51**: 899–908. (2010).

Fisher R., Acevedo C., Arzimanoglou A., Bogacz A., Cross H., Elger C., Engel J., Forsgren L., French J., Glynn M., Hesdorffer D., Lee B., Mathern G., Moshe S., Perucca E., Scheffer I., Tomson T., Watanabe M., Wiebe S. A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, **55**(4): 475–482. (2014).

Forsgren L., Beghi E., Oun A., Sillanpää M. The epidemiology of epilepsy in Europe—a systematic review. *European Journal of Neurology*, **12**: 245–253. (2005).

Georgiadis I., Kapsalaki E., Fountas K. Temporal lobe resective surgery for medically intractable epilepsy: a review of complications and side effects. *Epilepsy Research and Treatment*, **2013**: 752195. (2013).

Hauser W., Rich S., Lee J., et al. Risk of recurrent seizures after two unprovoked seizures. *New England Journal of Medicine*, **338**: 429–434. (1998).

Hesdorffer D., Benn E., Cascino G., et al. Is a first acute symptomatic seizure epilepsy? Mortality and risk for recurrent seizure. *Epilepsia*, **50**: 1102–1108. (2009).

Hesdorffer D. Risk factors for mortality in epilepsy: which ones are correctible? In: Partners Against Mortality in Epilepsy Conference Summary *Epilepsy Current*, **13**: 6 (2013).

Holst A., Winkel B., Risgaard B., Nielsen J., Rasmussen P., Haunsø S., et al. Epilepsy and risk of death and sudden unexpected death in the young: a nationwide study. *Epilepsia*, **54**: 1613–1620. (2013).

Huffman J., Kossoff E. State of the Ketogenic Diet(s) in Epilepsy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **6**: 332–340. (2006).

ILAE. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. *Epilepsia*, **22**: 489–501 (1981).

ILAE. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League against Epilepsy. *Epilepsia*, **30**: 389–399. (1989).

Jette N., Beghi E., Hesdorffer D., Moshe S., Zuberi S., Medina M., Bergen D. ICD coding for epilepsy: Past, present, and future—A report by the International League Against Epilepsy Task Force on ICD codes in epilepsy. *Epilepsia*, **56**(3): 348–355. (2015).

Kanner AM. Suicide in epilepsy: identifying risks and steps to prevention. In: Partners Against Mortality in Epilepsy Conference Summary. *Epilepsy Current*, **13**: 6–7. (2013).

Kwan P., Sander J. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, **75**: 1376–1381. (2004).

Laxer K., Trinkka E., Hirsch L., Cendes F., Langfitt J., Delanty N, Resnick T., Benbadis S. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy & Behavior*, **37**: 59–70. (2014).

Mintzer S. Antiepileptic drugs and cardiovascular disease. In: Partners Against Mortality in Epilepsy Conference Summary. *Epilepsy Current*, **13**: 7–8. (2013).

Moosa A., Gupta A., Jehi L., Marashly A., Cosmo G., Lachhwani D., et al. Longitudinal seizure outcome and prognostic predictors after hemispherectomy in 170 children. *Neurology*, **80**: 253–260. (2013).

Morrell M. RNS System in Epilepsy Study Group. Responsive cortical stimulation for the treatment of medically intractable partial epilepsy. *Neurology*, **77**: 1295–1304. (2011).

Neligan A., Bell G., Johnson A., Goodridge D., Shorvon S., Sander JW. The longterm risk of premature mortality in people with epilepsy. *Brain*, **134**: 388–395. (2011).

Nevalainen O., Raitanen J., Ansakorpi H., Artama M., Isojärvi J., Auvinen A. Long-term mortality risk by cause of death in newly diagnosed patients with epilepsy in Finland: a nationwide register-based study. *Eur J Epidemiol* **28**: 981–90. (2013).

Newman J., Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **25**(1): 42–52. (2014).

Ngugi A., Bottomley C., Kleinschmidt I., Sander J., Newton C. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia*, **51**: 883–890. (2010).

Nilsson L., Tomson T., Farahmand B., Diwan V., Persson P. Cause-specific mortality in epilepsy: a cohort study of more than 9,000 patients once hospitalized for epilepsy. *Epilepsia*, **38**: 1062–1068. (1997).

Novy J., Belluzzo M., Caboclo L., Catarino C., Yogarajah M., Martinian L., et al. The lifelong course of chronic epilepsy: the Chalfont experience. *Brain*, **136**: 3187–3199. (2013).

Organización Mundial de la Salud. Nota Descriptiva N° 999. Mayo 2015. (2015).

Park M., Nakagawa E., Schoenberg M., Benbadis S., Vale F. Outcome of corpus callosotomy in adults. *Epilepsy Behavior*, **28**: 181–184. (2013).

Sander J. The epidemiology of epilepsy revisited. *Current Opinion in Neurology*, **16**: 165–170. (2003).

Scheffer I, Berkovic S. The genetics of human epilepsy. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **24**: 428 – 433. (2003).

Shackleton DP, Westendorp RG, Trenité DG, Vandenbroucke JP. Mortality in patients with epilepsy: 40 years of follow up in a Dutch cohort study. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, **66**: 636–40. (1999).

Shorvon S. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*, **52**(6): 1052–1057. (2011).

Shorvon S., Goodridge D. Longitudinal cohort studies of the prognosis of epilepsy: contribution of the National General Practice Study of Epilepsy and other studies. *Brain*, **136**: 3497–3510. (2013).

Sillanpää M., Shinnar S. SUDEP and other causes of mortality in childhood-onset epilepsy. *Epilepsy Behavior*, **28**: 249–255. (2013).

So E. Summary of Session I: Mortality in Epilepsy. In: Partners Against Mortality in Epilepsy Conference Summary Epilepsy Current, **13**: 6–8. (2013).

Tafakhori A., Aghamollai V., Faghihi-Kashani S., Sarraf P., Habibi L. Epileptic syndromes: From clinic to genetic. *Iranian Journal of Neurology*, **14**(1): 1-7. (2015).

Talevi A., Bruno-Blanch L. On the development of new antiepileptic drugs for the treatment of pharmaco-resistant epilepsy: different approaches to different hypothesis. In: *Pharmacoresistance in Epilepsy. From Genes and Molecules to Promising Therapies*, pp. 207-224. EA, R. L. C., Ed. Springer: New York. (2013).

Taylor J. Selected writings of John Hughlings Jackson, Vol. 1. Hodder and Stoughton, London. pp. 162–172. (1930).

Thurman D., Beghi E., Begley ., Berg, A., Buchhalter J., Ding, D., Hesdorffer D., Hauser W., Kazis L., Kobau R., Kroner B., Labiner D., Liow K., Logroscino G., Medina M., Newton C., Parko K., Paschal A., Preux P., Sander J., Selassie A., Theodore W., Tomson T., Wiebe S., ILAE Commission on Epidemiology. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia*, **52**: 2–26. (2011).

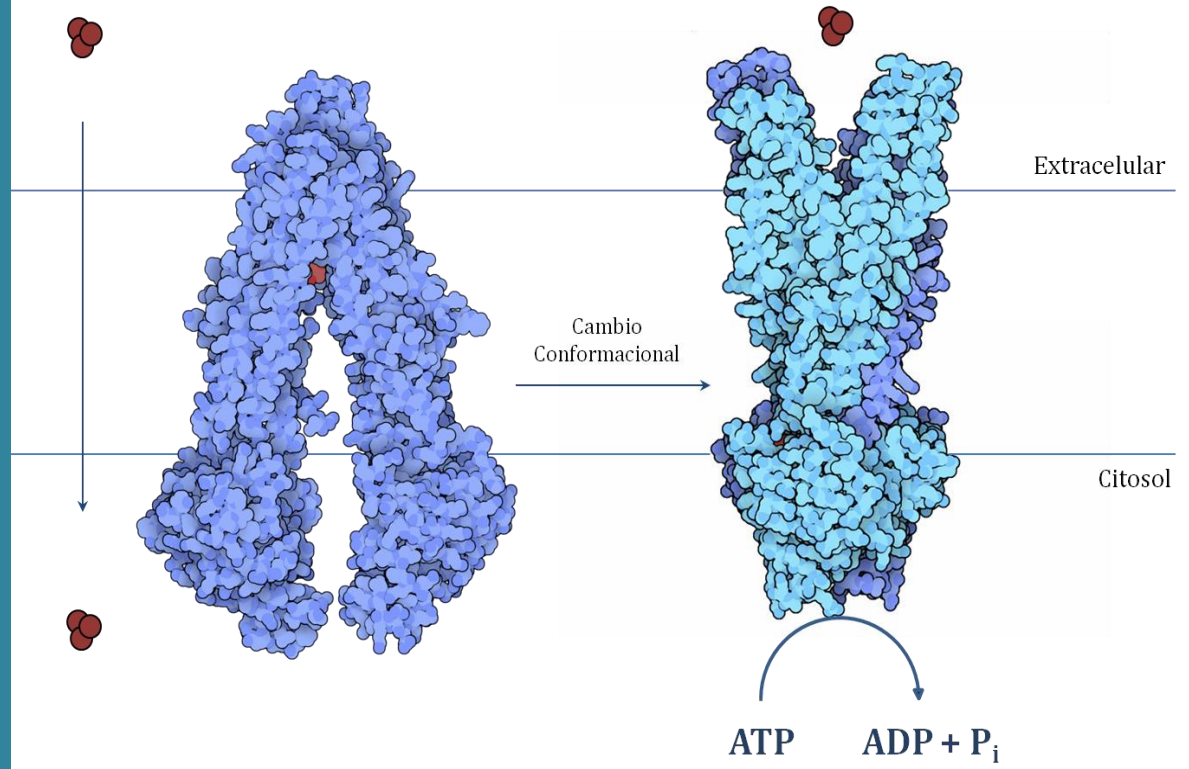
Trinka E., Bauer G., Oberaigner W., Ndayisaba J., Seppi K., Granbichler C. Cause-specific mortality among patients with epilepsy: results from a 30-year cohort study. *Epilepsia*, **54**: 495–501. (2013).

Vale F., Pollock G., Dionisio J., Benbadis S., Tatum W. Outcome and complications of chronically implanted subdural electrodes for the treatment of medically resistant epilepsy. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **115**: 985–990. (2013).

Vezzani A. Anti-inflammatory drugs in epilepsy: does it impact epileptogenesis? *Expert Opinion on Drug Safety*, **14**(4): 583–592. (2015).

Villanueva V., Sanchez-Alvarez J., Pena P., et al. Treatment initiation in epilepsy: an expert consensus in Spain. *Epilepsy Behavior*, **19**: 332–342. (2010).





“La ignorancia afirma o niega rotundamente;  
la ciencia duda”. Voltaire



## EPILEPSIA REFRACTARIA

En el año 2010, la ILAE publicó una definición consensuada de epilepsia farmacorresistente, orientada a mejorar la asistencia a los pacientes epilépticos promoviendo una identificación temprana y un mejor delineamiento de los síndromes asociados a farmacorresistencia y facilitando la investigación clínica de los casos de refractoriedad (Laxer et al., 2014). La definición de epilepsia farmacorresistente engloba dos niveles jerárquicos. El nivel 1 provee un esquema general para categorizar la respuesta a intervenciones médicas sobre cuadros epilépticos en: libre de convulsiones, tratamiento fallido o, indeterminado, sobre la base de criterios estandarizados para cada categoría. El nivel 1 provee la base para las determinaciones del nivel 2, las cuales forman la definición central de epilepsia farmacorresistente:

*“Se considera epilepsia farmacorresistente cuando al menos dos regímenes de fármacos antiepilépticos correctamente seleccionados, bien tolerados y de uso habitual, no logran una supresión sostenida en el tiempo de las convulsiones”* (Kwan et al., 2010).

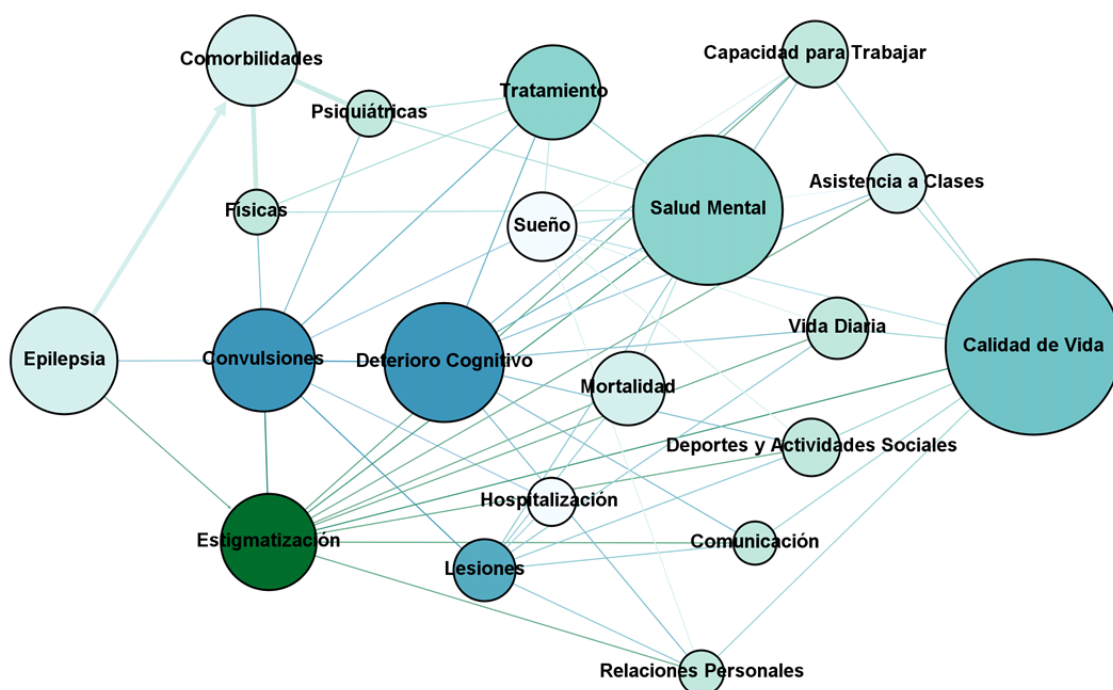
De acuerdo con la “regla de tres” para calcular el intervalo de confianza de eventos nulos (Hanley & Lippmann-Hand, 1983), “ausencia sostenida de crisis” requiere que un paciente permanezca libre de convulsiones por al menos un lapso de tiempo mayor a tres veces al mayor intervalo entre convulsiones antes del tratamiento o durante al menos 12 meses (Kwan et al., 2010). Esta definición establece que la farmacorresistencia es un fenómeno dinámico, proponiendo que puede remitir con el tiempo (Ehling et al., 2011), lo que puede observarse en adultos con una tasa del 4% y en niños con una tasa todavía mayor (Berg et al., 2009; Sillanpää & Schmidt, 2012; Schiller, 2009).

Además del número de FAEs fallidos (criterio por definición), los predictores más consistentes de epilepsia refractaria son la alta frecuencia de convulsiones en la etapa temprana de la enfermedad, un déficit neurológico al inicio de la enfermedad, y una causa estructural de la epilepsia evidenciada por imágenes por resonancia magnética (MRI) (Sillanpää & Schmidt, 2012; Semah et al., 1998; Trinka et al., 2001; Kwan & Brodie, 2000).

Debe destacarse que algunos cuadros de epilepsia aparentemente intratable no corresponden a una auténtica epilepsia farmacorresistente (Hao et al., 2013): existen fenómenos de pseudo-resistencia debidos a factores tales como un diagnóstico incorrecto, elección de un fármaco anti-epiléptico o dosis inapropiados. Estos factores deben ser descartados antes de declarar al paciente

fármaco-resistente (Chadwick & Smith, 2002; Thomas et al., 2006; Kanner, 2008; Larch et al., 2009; Leach et al., 2005).

Como ya se ha insinuado antes, el impacto de la epilepsia es de largo alcance ya que no sólo afecta al individuo que padece la condición, sino también a su familia y a la sociedad en general. Para la persona con epilepsia los daños de la enfermedad no están confinados a los riesgos físicos de las convulsiones y del tratamiento, sino que tiene repercusiones mucho más amplias a través de la estigmatización social a la que aún siguen sujetos los pacientes epilépticos (Figura 1) (Kerr, 2012). Esta problemática frecuentemente resulta en la exclusión social y el aislamiento del individuo epiléptico, así como también dificulta el acceso a la educación y al empleo (De Boer et al., 2008). Junto con el deterioro neurológico subyacente a la enfermedad, la epilepsia es altamente comórbida con otros desórdenes cognitivos, físicos y psiquiátricos, los cuales, en ocasiones, son los que limitan la capacidad funcional y las perspectivas de inserción social de las personas con epilepsia (Kessler et al., 2012).



**Figura 1** | El impacto de la epilepsia en la vida de los pacientes. Adaptada de Kerr, 2012.

Quedan expuestas entonces, las razones por las cuales es de extrema importancia determinar cuáles son las causas por las que los FAEs fallan en el control y supresión sostenida de las convulsiones, para así poder abordar un proyecto de investigación que culmine en el hallazgo de una nueva terapia o estrategia terapéutica capaz de superar el obstáculo de la refractariedad a fármacos en epilepsia.

## Mecanismos de Resistencia a Fármacos

Las convulsiones pueden ser exitosamente controladas con algún FAE actualmente disponible en el mercado en aproximadamente dos tercios de las personas con epilepsia, quedando un tercio de la población de epilépticos con un cuadro no controlado (Kwan & Sander, 2004). La resistencia a fármacos puede existir desde el momento de la primera convulsión o puede ser desarrollada posteriormente como resultado del proceso de la enfermedad. En tal caso, se estaría planteando que existen alteraciones orgánicas que pueden ser constitutivas (intrínsecas), y por lo tanto subyacentes a los fenómenos de farmacorresistencia observados, o inducidas, como por ejemplo como consecuencia de convulsiones recurrentes (Löscher, 2005a). Los mecanismos moleculares y celulares subyacentes parecen ser múltiples, y pueden incluir alteraciones en la captación cerebral o en los blancos moleculares de las drogas antiepilépticas. El estudio de tejido cerebral epileptogénico tanto de pacientes epilépticos como de roedores utilizados en modelos de epilepsia demostró la existencia de alteraciones en los transportadores de eflujo de múltiples drogas, y en blancos de fármacos como los canales de sodio operados por voltaje (Löscher et al., 2005b).

El transportador de eflujo de fármacos más estudiado es la glicoproteína-P (P-gp) (que se describe en detalle más adelante en este mismo capítulo) razón por la cual, hoy se están realizando ensayos clínicos de inhibidores de este transportador para ser utilizados en oncología como agentes destinados a revertir la resistencia a la quimioterapia; el resultado de estos ensayos permitirá vislumbrar si dichos inhibidores poseerían también la capacidad de prevenir o revertir la farmacorresistencia en epilepsia (Callahan et al., 2014; Römermann et al., 2015).

El conjunto de observaciones realizadas sobre este tópico ha generado un gran volumen de evidencia y ha sido condensada en dos hipótesis que explicarían a nivel molecular el fenómeno de resistencia a fármacos en epilepsia: **(1)** La Hipótesis del *Transportador* y; **(2)** La Hipótesis del *Blanco Molecular*. La primera propone que el fenómeno de refractariedad estaría asociado a la regulación hacia arriba (intrínseca o inducida) de uno o varios transportadores de eflujo; la segunda sugiere que la refractariedad estaría vinculada a una modificación constitutiva o inducida de los blancos moleculares de drogas antiepilépticas.

Una tercera hipótesis surgida de estudios epidemiológicos pero por el momento sin base biológica definida se denomina “Hipótesis de la Severidad Intrínseca” y postula que la frecuencia de las convulsiones al manifestarse inicialmente la enfermedad está asociada a la refractoriedad, proponiendo que si las convulsiones se desencadenan fácilmente, entonces, serán difíciles de suprimir, y la dosis habitual de una droga determinada no será suficiente para controlar la sintomatología (Rogawski & Johnson, 2008).

Por último, muy recientemente se ha propuesto la cuarta hipótesis denominada “Hipótesis de las Redes Neuronales” que apunta a que la remodelación adaptativa de los circuitos neuronales, que se produce como consecuencia a la neurodegeneración por convulsiones, puede contribuir al desarrollo de epilepsia refractaria (Fang et al., 2011; Talevi et al., 2013).

Se han sugerido limitaciones para cada una de las hipótesis como, por ejemplo, que la hipótesis del transportador sólo explica la epilepsia refractaria en aquellos casos en los que se haya intentado abordar el tratamiento de la epilepsia con principios activos sustrato de uno o más transportadores de eflujo (Löscher et al., 2009). Entendiendo que la condición de refractariedad es un fenómeno complejo y multifactorial, y considerando que en algunos pacientes pueden presentarse varios factores de manera simultánea, o bien las distintas hipótesis podrían aplicarse de manera separada a distintos subgrupos de pacientes, o dos o más hipótesis podrían ser integradas para explicar el fenómeno de manera holística (Schmidt & Löscher, 2009).

En este capítulo se desarrollará con especial énfasis la hipótesis del transportador, que es el punto de partida de este trabajo de tesis para arribar a una solución terapéutica para el problema de la epilepsia resistente a fármacos.

## **La Hipótesis del Transportador**

El rol de los transportadores de eflujo poliespecíficos, como la glicoproteína-P (P-gp) ha sido intensamente investigado durante las últimas dos décadas en relación a los procesos patológicos y sus tratamientos (Lee & Bendayan, 2004; Löscher et al., 2005c). Estas macromoléculas poseen un gran impacto sobre el comportamiento biofarmacéutico de muchos de los fármacos utilizados en clínica, afectando de manera crítica la absorción, distribución, y eliminación de tales drogas en el organismo (Schinkel et al., 2003).

En su conjunto, se encuentran entre los principales responsables de la aparición de resistencia múltiple a fármacos (MDR, por las siglas en inglés para *Multi Drug Resistance*), jugando un papel esencial en el fracaso terapéutico de tratamientos farmacológicos de diversos trastornos del sistema nervioso central como tumores, infecciones y epilepsia (Lee & Bendayan, 2004; Löscher et al., 2005c).

Estos transportadores componen una súper-familia de más de 100 transportadores y canales transmembrana denominada “transportadores-ABC” (*ATP Binding Cassette*) capaces de unirse e hidrolizar ATP. Los transportadores ABC están involucrados en una gran cantidad de procesos que van desde la eliminación de compuestos xenobióticos y potencialmente nocivos para el organismo, hasta la

captación de nutrientes, transporte de iones y péptidos y cascadas de señalización (Hennessy & Spiers, 2007). Los mismos funcionan como una bomba de eflujo que trasloca sus sustratos desde su dominio intracelular hacia su dominio extracelular (o, en ciertos casos, desde el interior de una organela hacia el citosol).

La característica más notable y por lo tanto, la que le confiere una enorme relevancia clínica a estas proteínas, es su amplia especificidad de sustrato<sup>12</sup>, es decir, reconocen una gran variedad de fármacos estructural y funcionalmente diversos (Fromm, 2004).

Los transportadores ABC se expresan universalmente a través de géneros que van desde bacterias y plantas hasta mamíferos (Higgins, 1997; Doige et al., 1993). En humanos, se han identificado 48 transportadores ABC los cuales fueron clasificados sobre la base de un análisis filogenético en 7 sub-familias: ABCA (12 miembros, anteriormente llamada ABC1), ABCB (11 miembros, previamente identificada como MDR/TAP), ABCC (12 miembros, inicialmente conocida como MRP/CFTR), ABCD (4 miembros, previamente ALD), ABCE (1 miembro, identificada como OABP), ABCF (3 miembros, previamente GCN20) y ABCG (5 miembros, inicialmente denominado Blanco (White)) (Dean et al., 2001).

### **Glicoproteína-P**

El gen *ABCB1*<sup>13</sup> localizado en el cromosoma 7 de humanos, consiste en 28 exones que codifican para los 1280 aminoácidos que forman al transportador ABC de la subfamilia ABCB, *ABCB1*, también conocido como glicoproteína-P o P-gp (Fromm, 2004). Estructuralmente, la P-gp, es un único polipéptido de aproximadamente 170kDa, conformado por dos mitades homólogas, consistiendo cada una en un dominio transmembrana (DTM) y un dominio de unión de nucleótidos (DUN). Las dos partes homólogas están separadas por una región conectora intracelular de aproximadamente 60 aminoácidos. Cada dominio transmembrana consiste en 6 hélices que atraviesan la membrana plasmática con un patrón específico (Figura 2).

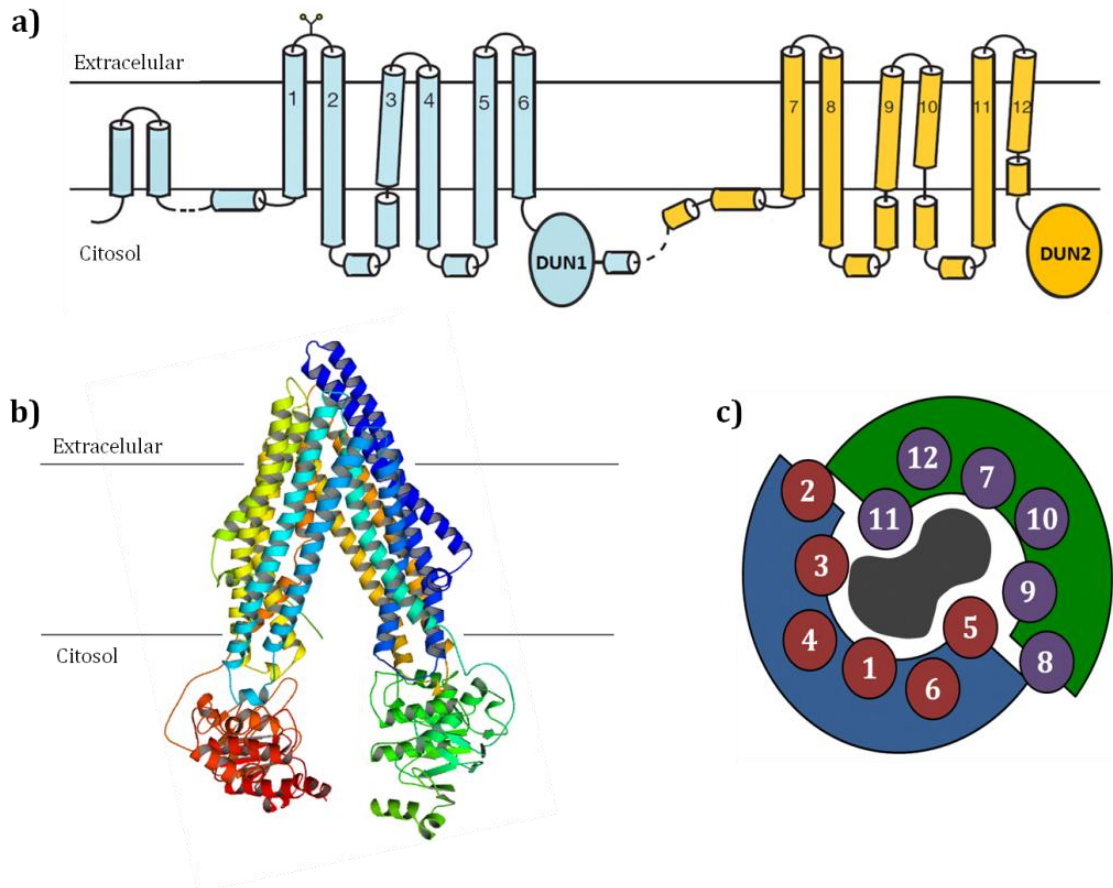
Los DTM están dispuestos juntos formando una cavidad hidrofóbica, la cual puede albergar una gran diversidad de sustratos. Los DUN, son regiones altamente conservadas en la superfamilia (confiriéndole nombre a la misma) ya que son los sitios de unión e hidrólisis de ATP (Prajapati & Sangamwar, 2014).

---

<sup>12</sup> A veces denominada de manera informal “promiscuidad” o, más acertadamente “promiscuidad selectiva”.

<sup>13</sup> También denominado gen *MDR1* (Multi Drug Resistance 1).

Desde el hallazgo de Juliano & Ling en 1976, quienes determinaron que la P-gp era la responsable del bombeo de múltiples drogas hacia el exterior de células tumorales (Juliano et al., 1976), esta macromolécula ha sido extensamente estudiada. A la fecha, la P-gp de varios organismos ha sido cristalizada en diferentes estados catalíticos. Sin embargo, la estructura cristalina de la P-gp humana todavía no está disponible. Muy recientemente, se ha obtenido el cristal de la P-gp mitocondrial humana en complejo con análogos de nucleótidos, así como también su forma libre, sin ligando (Shintre et al., 2013).

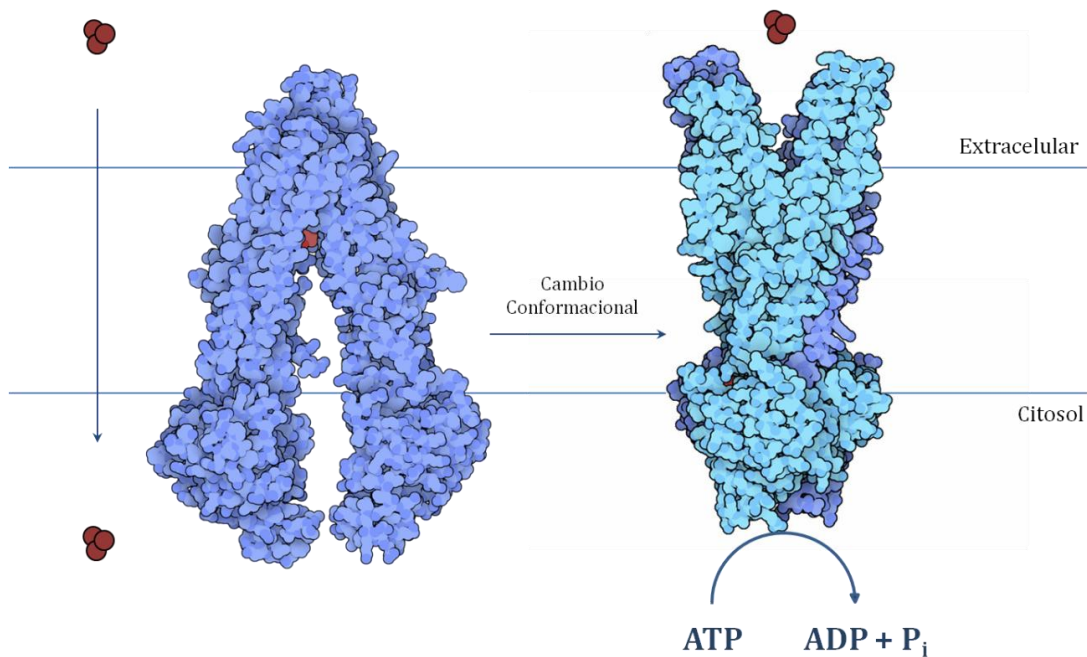


**Figura 2|** Arquitectura molecular de la P-gp. a) Estructura secundaria de la P-gp. b) Modelo tridimensional de P-gp. c) Representación esquemática de P-gp observada desde el espacio extracelular.

El mecanismo propuesto para explicar el funcionamiento de este transportador implica la alternancia entre dos conformaciones diferentes, en cuyo pasaje de una a otra se encuentra involucrada la utilización de ATP. Este proceso supone una gran flexibilidad estructural (van Wonderen et al., 2014). La interacción de una droga con la P-gp, ocurre cuando ésta se encuentra en una conformación “orientada hacia el interior celular” (en forma de  $\Lambda$ ) (Aller et al., 2009; Jin et al., 2012). Cuando la droga permea libremente a través de la membrana plasmática o, se introduce activamente en la célula por medio de otro transportador, la P-gp en la conformación antes mencionada reconoce y capta la sustancia. Como consecuencia



de esto, la P-gp sufre un cambio conformacional para adoptar la forma “orientada hacia el exterior celular” (en forma de **V**), llevándose a cabo la devolución del fármaco hacia el espacio extracelular (Dawson & Locher, 2006). Se cree, que la hidrólisis de ATP reinicia el ciclo retornando la P-gp a la conformación inicial orientada hacia el interior celular (Figura 3) (Callaghan et al., 2006).



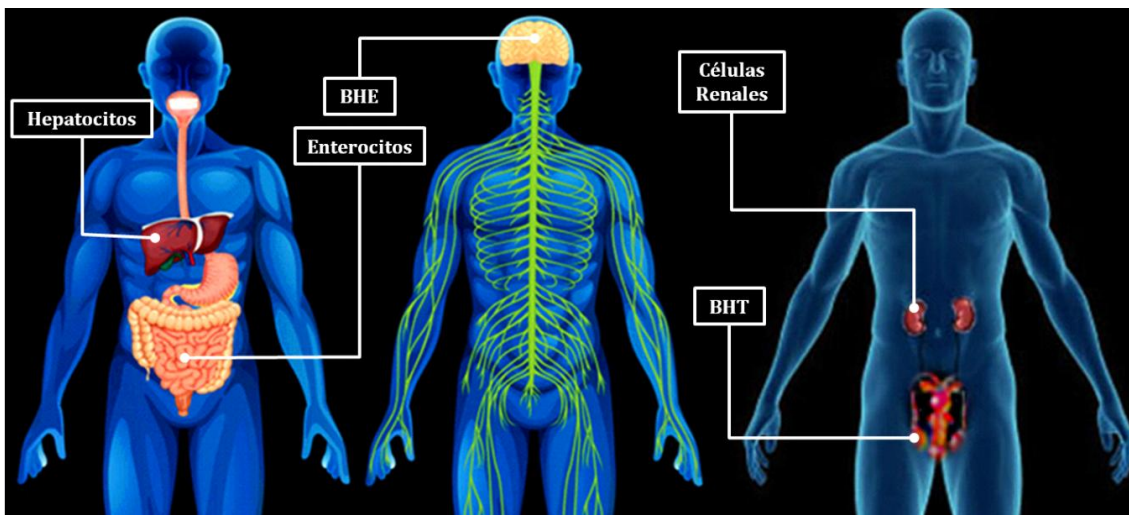
**Figura 3** | Mecanismo de acción propuesto para P-gp.

Anatómicamente, la P-gp además de encontrarse en células tumorales, se expresa constitutivamente en muchos tejidos normales que poseen una función excretora o que actúan como barrera, como ser, intestino delgado, hígado, riñones, barrera hemato-encefálica (BHE), barrera hemato-testicular (BHT) y placenta, entre otros. En conjunto con las enzimas responsables de metabolizar compuestos xenobióticos, la P-gp constitutiva cumple una importante función protectora contra sustancias exógenas sin rol fisiológico y potencialmente nocivas (Fromm, 2004). Además, P-gp juega un rol importante en el transporte de sustancias endógenas y sus metabolitos, incluyendo fosfolípidos, glucolípidos, factores activadores plaquetarios, interleucinas, hormonas como la aldosterona y la progesterona, entre muchos otros (Eckford & Sharom, 2009).

Por último, Liu & Liu en 2001, demostraron que la P-gp regula el transporte de glutamato a nivel de la BHE (Liu & Liu, 2001; Avemary et al., 2013) en condiciones normales. Este hallazgo complejiza aun más el esquema de posibles acciones para regular la función de esta proteína, ya que se podría plantear por un lado, que es muy probable que la P-gp, pudiendo regular el transporte de glutamato, pueda regular el de otros neurotransmisores como GABA o dopamina u otros. Dado que como se dijo muchos de sus sustratos son de carácter endógeno y tienen un rol

fisiológico, la estrategia de inhibición concomitante, es decir la administración de por ejemplo un fármaco antiepiléptico junto con un inhibidor de la P-gp para tratar la epilepsia refractaria, estaría quedando descartada por los potenciales efectos perjudiciales de inhibir un sistema de regulación fisiológico a largo plazo. El escenario podría ser distinto en el caso de tratamientos de corta duración de cuadros patológicos farmacorresistentes (Callahan et al., 2014).

Como resultado de su localización anatómica (Figura 4), la P-gp opera principalmente de tres formas: **1)** limitando la entrada del fármaco en el cuerpo luego de la administración oral, como consecuencia de su expresión en la membrana luminal (apical) de los enterocitos; **2)** una vez que la droga ha accedido al torrente sanguíneo, la P-gp promueve su eliminación hacia la bilis y la orina a través de su presencia en la membrana canalicular de los hepatocitos y en la membrana luminal de las células de los túbulos proximales en riñones, respectivamente, y por último; **3)** una vez que el xenobiótico se incorpora a la circulación sistémica, la P-gp limita su penetración en los tejidos sensibles (cerebro, testículos, linfocitos, placenta).



**Figura 4 |** Disposición anatómica de la P-gp.

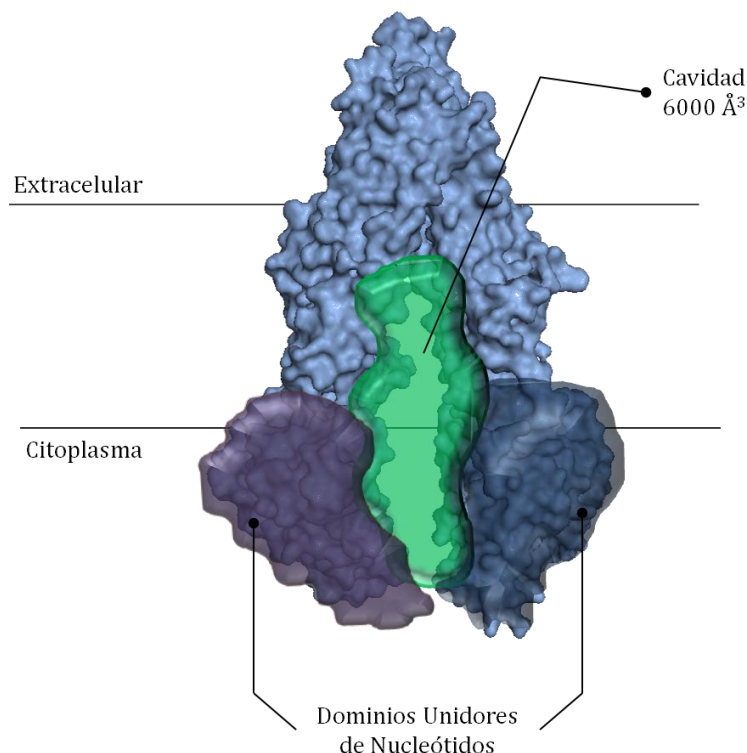
Este último mecanismo sería el principal determinante del grado de éxito de una terapia farmacológica contra la epilepsia, ya que la presencia del transportador atendería contra la consecución de concentraciones efectivas en las inmediaciones del blanco molecular de la terapia (Fromm, 2004).

## Base Molecular de la Poliespecificidad

Como se mencionó anteriormente, la poliespecificidad de sustrato es la característica más peculiar presentada por la P-gp. La base molecular de esta propiedad inusual aun permanece sin comprenderse de manera acabada y sigue siendo materia de debates intensos (Chufan et al., 2015).

En el año 2009, Aller y colaboradores (Aller et al., 2009) fueron los primeros en reportar una estructura cristalográfica de rayos-X de un transportador ABC de mamíferos. Ellos resolvieron la estructura de la P-gp de ratón con una resolución de 3.8 – 4.4 Å, en ausencia de nucleótido, con y sin inhibidores unidos. Se observó, que en ausencia de nucleótido y de sustrato, la P-gp de ratón (código PDB: 3G5U) adopta la forma orientada hacia adentro, la cual presenta una gran cavidad de alrededor de 6000 Å<sup>3</sup> que se abre hacia el interior de la membrana plasmática, continuando hacia el citoplasma y dejando una separación de aproximadamente 44 Å entre los dominios unidores de nucleótidos (DUNs) (Figura 5) (Li et al., 2014; Chufan et al., 2015). Estudios funcionales y de unión de radioligandos, indican que la P-gp, posee en algún lugar de esta gran cavidad transmembrana, por lo menos entre dos y cuatro sitios de unión de sustratos (Hennessy & Spiers, 2007; Martin et al., 2000).

Más aún, diversos grupos de investigación observaron que es posible que la P-gp, transporte dos sustratos distintos al mismo tiempo (Loo et al., 2003; Lugo et al., 2005). Otras investigaciones sugieren que los sitios activos pueden superponerse o estar acoplados alostéricamente, insinuando que existe un único sitio activo común (Lugo et al., 2005). Más interesante todavía es el hecho de que estos múltiples sitios activos pueden ser clasificados en sitios de transporte y sitios moduladores (Martin et al., 2000), y que poseen la habilidad de alternar entre estados de alta y baja afinidad para acomodar sustratos e inhibidores (Wang et al., 2003).

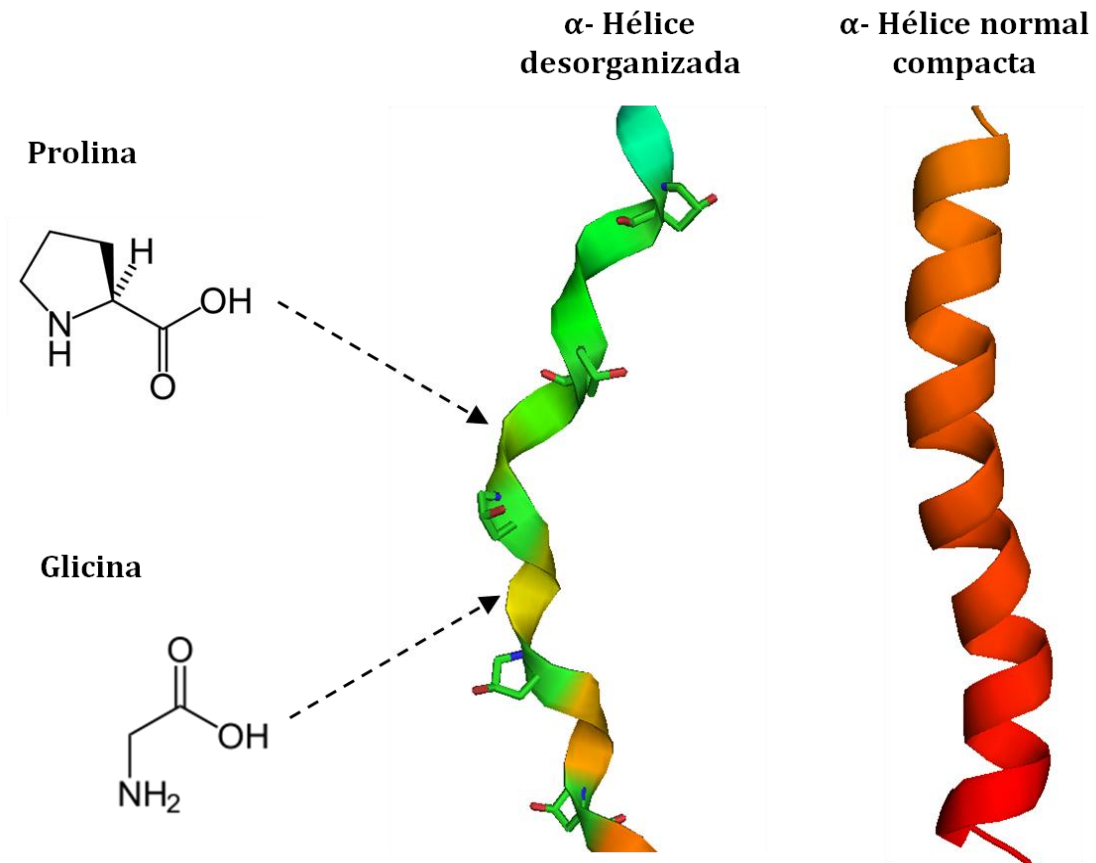


**Figura 5|** Cavidad poli-específica de la P-gp y disposición de los DUNs.

Con el objetivo de estudiar cuáles son los residuos aminoacídicos de la P-gp que están involucrados en la funcionalidad de este transportador, se han realizado numerosos estudios que involucran el uso de marcadores fotométricos y compuestos capaces de formar entrecruzamientos de enlaces disulfuro (Ecker et al., 2002; Loo et al., 1997), los cuales concuerdan en que el sitio de unión a sustrato está estrechamente asociado a los dominios 1, 4, 5, 6, 9, 10, 11 y 12. Efectivamente, mediante estudios de mutagénesis dirigida se comprobó que alterando la estructura de estos dominios, se observaban cambios en los fenómenos de resistencia a fármacos (Hennsessy & Spiers, 2007; Kajiji et al., 1993). Mediante la técnica biofísica denominada resonancia electrónica paramagnética (Electron Paramagnetic Resonance, EPR), Wen et al. sugirieron en 2013 que los dominios transmembrana en la P-gp de ratón podrían ser más flexibles que en otros transportadores ABC o en homólogos bacterianos. La explicación que aportan para esta aseveración estructural consiste en que la P-gp de este organismo posee un mayor número de residuos interruptores del patrón helicoidal de las hélices- $\alpha$  tales como los residuos glicina y prolina, los cuales contribuirían con la flexibilidad extra necesaria para acomodar sustratos de diferentes formas y tamaños. Sorprende el hecho de que el contenido de glicina de la P-gp es significativamente mayor al de cualquier otro transportador ABC (Wen et al., 2013).

Como es bien conocido, la glicina desorganiza los motivos  $\alpha$ -helicoidales adoptados localmente por las proteínas debido a su gran libertad rotacional o flexibilidad conformacional; mantener fijo este residuo implicaría un alto costo entrópico para

el sistema, derivando así en la relajación y flexibilización de la hélice cada vez que se presenta un residuo de glicina. Por el contrario, la prolina es incapaz de donar los puentes de hidrógenos necesarios para organizar la hélice, básicamente porque no posee hidrógenos ácidos en su estructura y, además, su cadena lateral interfiere estéricamente con el patrón helicoidal adoptado por los demás residuos que forman puentes de hidrógenos entre ellos. Estos dos factores, hacen que la prolina interrumpa la hélice y la desvíe de su eje en 30° (Figura 6) (Richardson, 1981).



**Figura 6** | Diagramas Richardson (Ribbon) de una α- hélice normal (Derecha) y una desorganizada (Izquierda) por la presencia de residuos de glicina y prolina.

### Poliespecificidad de Sustrato

Definiremos como sustrato de la P-gp a una molécula capaz de unirse a la proteína y ser transportada hacia el exterior celular. El transporte mediado por P-gp es saturable, osmóticamente sensible y dependiente de la hidrólisis de ATP para generar un gradiente de concentración de sustrato (Hennesy & Spiers, 2007). Numerosos artículos de revisión se han abocado a construir listas exhaustivas de sustratos de la P-gp (Kapor et al., 2013; Eckford & Sharom, 2009). En términos generales, los sustratos de este transportador son compuestos hidrofóbicos y anfipáticos. En conjunto, comprenden una gran variedad de sustancias que

incluyen fármacos antineoplásicos, inhibidores de la tirosina quinasa, bloqueantes de canales de calcio, antibióticos, inhibidores de la proteasa del HIV, colorantes fluorescentes y antiepilépticos, entre muchísimos otros. Resulta desconcertante la capacidad que posee este transportador para reconocer sustancias químicas pertenecientes a muy diversas familias, con pesos moleculares muy variados, conteniendo grupos funcionales de los más diversos y distintas topologías, reconociendo tanto compuestos orgánicos pequeños como péptidos lineales, cíclicos o estructuras conjugadas.

Básicamente, éstos son los motivos que dificultan la dilucidación de las propiedades que debe reunir un determinado compuesto para ser sustrato de la P-gp. En otras palabras, predecir si una sustancia será sustrato o no del transportador, únicamente en base a sus características estructurales, parece ser una tarea engorrosa y difícil. No obstante, se han realizado numerosos intentos para resolver esta incógnita, de los cuales se hará un repaso en el próximo capítulo. Estas investigaciones han tratado también, de dilucidar el mecanismo por el cual una sustancia es capaz de inhibir o modular la actividad de la P-gp.

### **Inhibidores del transporte mediado por P-gp**

La relevancia clínica que posee la resistencia a fármacos mediada por la P-gp ha dado lugar a numerosos esfuerzos por desarrollar sustancias capaces de inhibir o modular la resistencia múltiple a drogas.

La primera generación de inhibidores de la P-gp fueron compuestos desarrollados para otras indicaciones como por ejemplo el verapamil (bloqueante de canales de Calcio) y la ciclosporina (inmunosupresor). Sin embargo, el uso de estas sustancias en concentraciones inhibitorias de P-gp fue asociado a eventos de toxicidad graves (Varma et al., 2003), posiblemente vinculados a su baja especificidad/capacidad de inhibir otros transportadores de la superfamilia ABC y a su actividad farmacológica original.

La segunda generación de inhibidores como el dexverapamil (isómero R del verapamil), y el valsopodar (PSC833, análogo de ciclosporina D), fueron diseñados para retener la capacidad inhibitoria de P-gp pero con una reducción de la actividad farmacológica de manera de limitar o eliminar su toxicidad. Las dos primeras generaciones de inhibidores carecían sin embargo de especificidad, de manera que son capaces de inhibir dos o más transportadores ABC al mismo tiempo (Callahan et al., 2014).

Por otra parte, cabe señalar que la especificidad de sustrato de P-gp se superpone con la de los citocromos P450 de la sub-familia 3A (CYP3A), con lo que existen

interacciones droga-droga al administrar un inhibidor de P-gp con otra droga metabolizada por CYP3A4; se puede citar por ejemplo el caso de la co-administración de valsopodar con paclitaxel para el tratamiento de cánceres resistentes, donde el aclaramiento de paclitaxel se ve disminuido en un 50% a causa de la interacción mencionada (Callahan et al., 2014; Chico et al., 2001).

Por último, la tercera generación de inhibidores de la P-gp como el zosuquidar (LY335979), tariquidar (XR9576) y el OC144-09, han demostrado una mayor potencia inhibiendo P-gp a concentraciones nanomolares y un aumento notable en la especificidad, con respecto a las sustancias de primera y segunda generación (Mistry et al., 2001; Newman et al., 2000). Efectivamente, zosuquidar no afecta ABCC1 (MRP-1), ABCC3 (MRP-3) ni ABCG2 (BCRP) a concentraciones de 5  $\mu$ M, y muestra una selectividad 60 veces mayor por P-gp que por CYP3A4 (Dantzig et al., 1999; Shepard et al., 2003).

### **¿Cómo abordar clínicamente el problema de la farmacorresistencia mediada por P-gp?**

Con respecto al tratamiento de patologías, la utilidad clínica de la inhibición de P-gp concomitante a regímenes quimioterapéuticos estándar está aún en discusión, incluso cuando se observa una clara correlación entre la actividad de P-gp, la respuesta al tratamiento y la supervivencia del paciente (Lazarowsky et al., 2007; Munguia et al., 2011). Por otro lado, estudios clínicos han fracasado por exacerbar los efectos antiproliferativos de drogas citostáticas dado que al utilizar inhibidores de P-gp, se promueve la llegada del fármaco a tejidos sensibles y células de distintas naturalezas (Fox & Bates, 2007).

Considerando un tratamiento adicional a largo plazo con inhibidores de la P-gp en pacientes con epilepsia farmacorresistente, se debe tener en cuenta, como ya se ha mencionado antes, que la función endógena protectora de la P-gp y el resto de sus funciones fisiológicas se verían gravemente limitadas a través de todo el organismo. Por lo tanto, dado que el cerebro epiléptico presenta una sobre-expresión de la P-gp (van Vliet et al., 2010), se podría hipotetizar un tratamiento a intervalos, con una administración transitoria de un inhibidor/modulador de P-gp junto con el fármaco antiepiléptico (FAE) administrado de manera crónica, hasta que los niveles del transportador vuelvan al estado basal y el FAE vuelva a ser efectivo cuando se lo administra solo (Potschka, 2013). A la fecha, se ha obtenido evidencia experimental de que el tariquidar puede ayudar a superar la resistencia a fármacos en modelos de epilepsia del lóbulo temporal en ratas farmacorresistentes (Brandt et al., 2006). Se han reportado casos anecdóticos de pacientes farmacorresistentes que han mostrado una mejora al recibir verapamil

junto con un FAE (Summers et al. 2004; Iannetti et al. 2005, 2009). Sin embargo, se desconoce aún si los resultados obtenidos tienen que ver con la actividad inhibidora de la P-gp del verpamil o con su actividad anticonvulsiva intrínseca (por ejemplo por medio de la modulación del influjo de calcio hacia las neuronas) o con algún efecto sobre la farmacocinética de los FAEs.

En definitiva, en el caso de epilepsia refractaria, el escenario para la administración concomitante de un inhibidor/modulador de P-gp y un FAE a largo plazo parece ser confuso y más cercano al fracaso que al éxito. Sin embargo, se han planteado otras alternativas prometedoras como la encapsulación de FAE en sistemas nanoparticulados, o hallar sustancias anticonvulsivas que no sean reconocidas y transportadas por P-gp y capaces por lo tanto de eludir al transportador; la administración local de FAEs, suele descartarse por el carácter invasivo de la técnica (Potschka, 2010a; Potschka & Luna-Munguia, 2014). Otras investigaciones se orientan a identificar blancos moleculares en las cascadas de señalización que conllevan una regulación hacia arriba de la expresión de P-gp en el cerebro epiléptico, que una vez más, llevarían a una posible terapia concomitante a fármacos antiepilépticos orientadas a prevenir la sobre-expresión de P-gp (Potschka, 2010b).

### **Regulación de la expresión de la P-gp**

Con el objetivo de plantear estrategias para abordar la regulación de la sobre-expresión de P-gp como resultado de la actividad epiléptica, resulta fundamental identificar los factores claves involucrados durante este proceso.

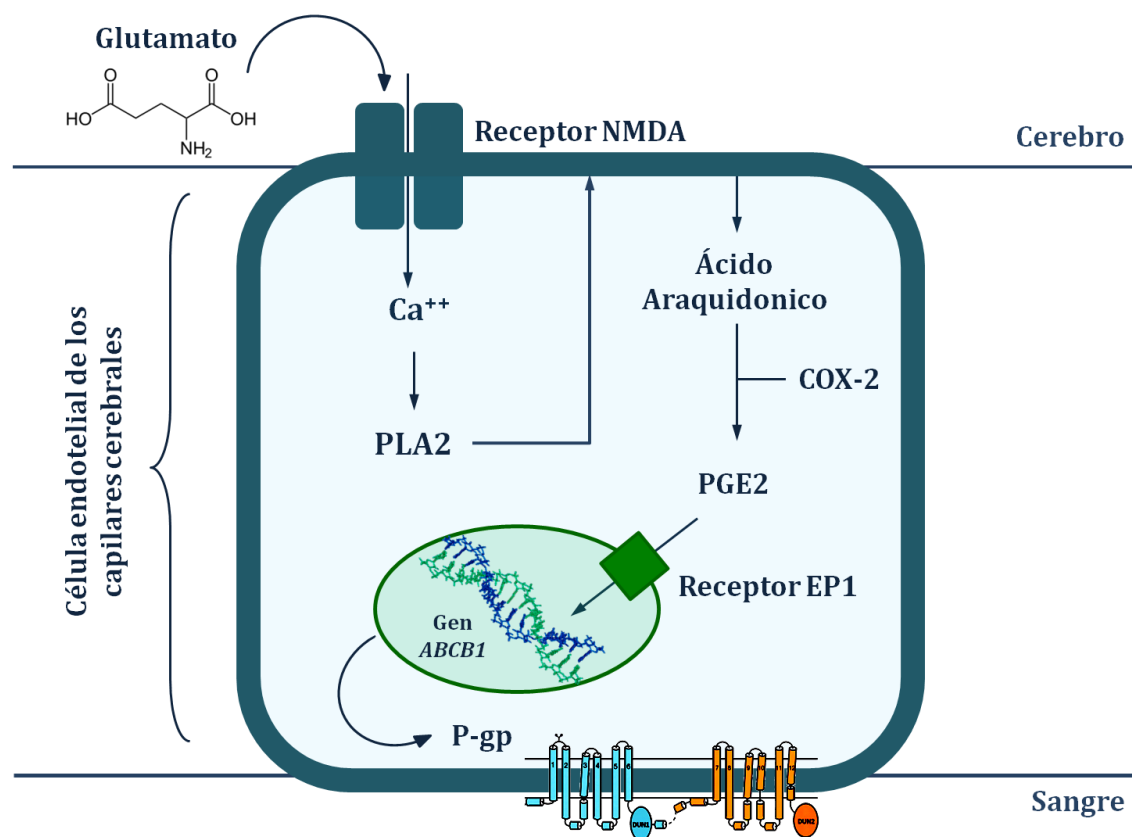
El primer y más obvio candidato a explorar fue el glutamato, el cual es liberado en altas concentraciones durante las crisis epilépticas y cuya influencia sobre la expresión de P-gp ha sido demostrada utilizando capilares cerebrales de ratones incubados con glutamato. Se observó que este neurotransmisor activa la transcripción del gen que codifica a P-gp resultando en un aumento de la expresión del transportador (Bauer et al., 2008). Por otro lado, el mismo efecto *in vivo* fue demostrado inyectando glutamato en el hipocampo derecho de ratas en concentraciones incapaces de inducir actividad epiléptica conductual o electroencefalográfica y observando una clara inducción local de la regulación hacia arriba de la expresión de P-gp en los capilares cerebrales.

Asimismo, se ha probado que el efecto del neurotransmisor es mediado por señalización a través de receptores NMDA ya que, al administrar un antagonista de los mismos, se previene el impacto del glutamato sobre la expresión de la P-gp (Bauer et al., 2008). Estudios posteriores sugieren que los receptores NMDA intervienen en la activación transcripcional de P-gp vía señalización por ácido



araquidónico (Potschka, 2010b). En este contexto, se confirmó el rol que cumple la actividad de la enzima inflamatoria ciclooxigenasa-2 (COX-2) en el fenómeno antes mencionado, por medio de ensayos de inhibición farmacológica, así como también por medio de ratones genéticamente deficientes en COX-2. En contraste, la modulación farmacológica de COX-1 no surte efecto sobre el incremento de la expresión de P-gp mediada por glutamato (Bauer et al., 2008).

Entre los productos derivados del ácido araquidónico, la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) producida por la activación de COX-2, fue identificada como otro elemento clave en los mecanismos reguladores de la expresión de P-gp. Este prostanoides ejercería este efecto a través de su receptor EP1 (Pekcec, 2009).



**Figura 7** | Mecanismos desencadenantes de la sobre-expresión de P-gp como consecuencia a las crisis epilépticas.

La figura 7 resume los eventos que conducirían a la sobre-expresión de la P-gp en respuesta a la actividad epiléptica, según las investigaciones realizadas a la fecha (Pekcec et al., 2009; Zibell et al., 2009; van Vliet et al., 2010).

En conclusión, la dilucidación completa de los mecanismos que conducen a la sobre expresión de la P-gp en el cerebro epiléptico abrirá la posibilidad de abordar nuevos blancos moleculares que ayuden a superar la epilepsia farmacorresistente. Mientras tanto, el desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos que no sean

reconocidos por la P-gp, o el encapsulamiento de fármacos sustrato de P-gp en nanovehículos y otros vectores de última generación parecen ser las alternativas más viables para brindar una solución al fenómeno de epilepsia intratable mediada por este transportador.

## REFERENCIAS

Aller S., Yu G., J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, **323**: 1718–1722. (2009).

Avemary J., Salvamoser J., Peraud A., Rémi I., Noachtar S., Fricker G., Potschka H. Dynamic Regulation of P-glycoprotein in Human Brain Capillaries. *Molecular Pharmaceutics*, **10**: 3333–3341. (2013).

Bauer B., Hartz A., Pekcec A., Toellner K., Miller D., Potschka H. Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood–brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Molecular Pharmacology*, **73**: 1444–1453. (2008).

Berg A., Levy S., Testa F., D'Souza R. Remission of epilepsy after two drug failures in children: a prospective study. *Annals of Neurology*, **65**: 510–519. (2009).

Brandt C., Bethmann K., Gastens A., Loscher W. The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiological Disorders*, **24**: 202–211. (2006).

Callaghan R., Ford R., Kerr I. The translocation mechanism of P-glycoprotein. *FEBS Letters*, **580**: 1056–1063. (2006).

Callahan R., Luk F., Bebawy M. Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy? *Drug Metabolism and Disposition*, **42**: 623–631. (2014).

Chadwick D., Smith D. The misdiagnosis of epilepsy. *British Medical Journal*, **324**: 495–496. (2002).

Chico I., Kang M., Bergan R., Abraham J., Bakke S., Meadows B., et al. Phase I study of infusional paclitaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist PSC 833. *Journal of Clinical Oncology*, **19**: 832–42. (2001).

Chufan E., Sim H., Ambudkar S. Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies. *Advanced Cancer Research*, **125**: 71–96. (2015).

Dantzig A., Shepard R., Law K., Tabas L., Pratt S., Gillespie J., et al. Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for Pglycoprotein and effect on cytochrome P450 activities. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **290**: 854–890. (1999).

Dawson R., Locher K. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature*, **443**: 180–185. (2006).

De Boer H., Mula M., Sander J. The global burden and stigma of epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, **12**: 540–546. (2008).

Dean M., Hamon Y., Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, **42**: 1007–1017. (2001).

Doige C., Ames G. ATP-dependent transport systems in bacteogryia and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annual Reviews on Microbiology*, **47**: 291–319. (1993).

Ecker G., Csaszar E., Kopp S., Plagens B., Holzer W., Ernst W., et al. Identification of ligand-binding regions of P-glycoprotein by activated-pharmacophore photoaffinity labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Molecular Pharmacology*, **61**: 637–648. (2002).

Eckford P., Sharom F. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chemical Reviews*, **109**: 2989–3011. (2009).

Ehling R., Dobesberger J., Unterberger I., Benke T., Gotwald T., Ortler M., et al. Selective amygdalo-hippocampectomy as a potential trigger for disease progression in multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, **113**: 136–138. (2011).

Fang M., Xi Z., Wu Y., Wang X. A new hypothesis of drug refractory epilepsy: neural network hypothesis. *Medical Hypotheses*, **76**: 871–876. (2011).

Fox E., Bates SE Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Reviews of Anticancer Therapy*, **7**: 447–459. (2007).

Fromm M. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences*, **25**: 423–429. (2004).

Hanley J., Lippman-Hand A. If nothing goes wrong, is everything all right? Interpreting zero numerators. *Journal of the American Medical Association*, **249**: 1743–1745. (1983).

Hao X., Goldberg D., Kelly K., Stephen L., Kwan P., Brodie M. Uncontrolled epilepsy is not necessarily the same as drug-resistant epilepsy: differences between populations with newly diagnosed epilepsy and chronic epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, **29**: 4–6. (2013).

Hennessy M., Spiers J. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacological Research*, **55**: 1–15. (2007).

Higgins C. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Reviews on Cell Biology*, **8**: 67–113. (1997).

Iannetti P., Spalice A., Parisi P. Calcium-channel blocker verapamil administration in prolonged and refractory status epilepticus. *Epilepsia*, **46**: 967–969. (2005).

Iannetti P., Parisi P., Spalice A., Ruggieri M., Zara F. Addition of verapamil in the treatment of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsy Research*, **85**: 89–95. (2009).

Jambroszyk M., Tipold A., Potschka H. Add-on treatment with verapamil in pharmaco-resistant canine epilepsy. *Epilepsia*, **52**: 284–291. (2011).

Jin M., Oldham M., Zhang Q., Chen, J. Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **490**: 566–570. (2012).

Jones P., George A. Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. *FEMS Microbiology Letters*, **179**: 187–202. (1999).

Juliano R., Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **455**: 152–162. (1976).

Kajiji S., Talbot F., Grizzuti K., Van Dyke-Phillips V., Agresti M., Safa A., et al. Functional analysis of P-glycoprotein mutants identifies predicted transmembrane domain 11 as a putative drug binding site. *Biochemistry*, **32**: 4185–4194. (1993).

Kanner A. Common errors made in the diagnosis and treatment of epilepsy. *Seminars in Neurology*, **28**: 364–78. (2008).

Kapoor K., Sim H., Ambudkar S. Multidrug resistance in cancer: A tale of ABC drug transporters. En *Molecular mechanisms of tumor cell resistance to chemotherapy*: **1**: 1–34. New York: Springer. (2013).

Kerr M. The impact of epilepsy on patients' lives. *Acta Neurologica Scandinavica*, **126**: (194): 1–9. (2012).

Kessler R., Lane M., Shahly V., Stang P. Accounting for comorbidity in assessing the burden of epilepsy among US adults: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Molecular Psychiatry*, **17**: 748–758. (2012).

Kwan P., Arzimanoglou A., Berg A., Brodie M., Allen Hauser W., Mathern G., Moshé S., Perucca E., Wiebe S., French J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, **51**: 1069 – 1077. (2010). [Erratum in: *Epilepsia*, **51**: 1922. (2010)].

Kwan P., Brodie M. Early identification of refractory epilepsy. *New England Journal of Medicine*, **342**: 314–319. (2000).

Kwan P., Sander J. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, **75**: 1376–1381. (2004).

Larch J., Unterberger I., Bauer G., Reichsoellner J., Kuchukhidze G., Trinka E. Myoclonic status epilepticus in juvenilemyoclonic epilepsy. *Epileptic Disorders*, **11**: 309–314. (2009).

Laxer K., Trinka E., Hirsch L., Cendes F., Langfitt J., Delanty N, Resnick T., Benbadis S. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy & Behavior*, **37**: 59–70. (2014).

Lazarowsky A., Czornyj L., Lubienieki F., Girardi E., Vazquez S., D'Giano C. ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy. *Epilepsia*, **48**(5): 140–149. (2007).

Leach J., Lauder R., Nicolson A., Smith D. Epilepsy in the UK: misdiagnosis, mistreatment, and undertreatment? The Wrexham area epilepsy project. *Seizure*, **14**: 514–20. (2005).

Lee G, Bendayan R. Functional expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders. *Pharmaceutical Research*, **21**: 1313–1330. (2004).

Li J., Jaimes K., Aller S. Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Science*, **23**: 34–46. (2014).

Liu X., Liu, G. P-glycoprotein regulated transport of glutamate at blood-brain barrier *Acta Pharmacologica Sinica*, **22**(2): 111-116. (2001).

Loo T., Bartlett M., Clarke D. Methanethiosulphonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 50136–50141. (2003).

Loo T., Clarke D. Identification of residues in the drug-binding site of human P-glycoprotein using a thiol-reactive substrate. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 31945–31948. (1997).

Loo T., Clarke D. The transmembrane domains of the human multidrug resistance P-glycoprotein are sufficient to mediate drug binding and trafficking to the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, **274**: 24759–24765. (1999).

Löscher W. Mechanisms of drug resistance. *Epileptic Disorders*, **7**: S3–S9. (2005a).

Löscher W., Schmidt D. Drug resistance in Epilepsy, *Epilepsia*, **46**: 858–77. (2005b).

Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette (ABC) gene family. *NeuroRx*, **2**: 86–98. (2005c).

Löscher W., Delanty N. MDR1/ABCB1 polymorphisms and multidrug resistance in epilepsy: in and out of fashion. *Pharmacogenomics*, **10**: 711–713. (2009).

Lugo M., Sharom F. Interaction of LDS-751 and rhodamine 123 with P-glycoprotein: evidence for simultaneous binding of both drugs. *Biochemistry*, **44**: 14020–14029. (2005).

Martin C., Berridge G., Higgins C., Mistry P., Charlton P., Callaghan R. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Molecular Pharmacology*, **58**: 624–632. (2000).

Martin C., Berridge G., Higgins C., Mistry P., Charlton P., Callaghan R. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Molecular Pharmacology*, **58**: 624–632. (2000).

Mistry P., Stewart A., Dangerfield W., Okiji S., Liddle C., Bootle D., et al. In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Research*, **61**: 749–758. (2001).

Munguia H., Orozco-Suarez S., Rocha L. Effects of high frequency electrical stimulation and R-verapamil on seizure susceptibility and glutamate and GABA release in a model of phenytoin-resistant seizures. *Neuropharmacology*, **61**: 807–814. (2011).

Newman M., Rodart J., Benbatoul K., Romano S., Zhang C., Krane S., et al. Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Research*, **60**: 2964–2972. (2000).

Pekcec A., Unkruer B., Schlichtiger J., Soerensen J., Hartz A., Bauer B., et al. Targeting prostaglandin E2 EP1 receptors prevents seizure-associated P-glycoprotein up-regulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **330**: 939–947. (2009).

Potschka H. Targeting regulation of ABC efflux transporters in brain diseases: a novel therapeutic approach. *Pharmacological Therapy*, **125**: 118–127. (2010b).

Potschka H. Targeting the brain – surmounting or bypassing the blood–brain barrier. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **197**: 411–431. (2010a)

Potschka H. Modulating P-glycoprotein Regulation as a Therapeutic Strategy for Pharmaco-resistant Epilepsy. In: *Pharmacoresistance in Epilepsy. From Genes and Molecules to Promising Therapies*, pp. 225-232. EA, R. L. C., Ed. Springer: New York. (2013).

Potschka H., Luna-Munguia H. CNS transporters and drug delivery in epilepsy. *Current Pharmaceutical Design*, **20**: 1435–1542. (2014).

Prajapati R., Sangamwar A. Translocation mechanism of P-glycoprotein and conformational changes occurring at drug-binding site: Insights from multi-targeted molecular dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1838**: 2882–2898. (2014).

Richardson J. "The Anatomy and Taxonomy of Proteins". *Advances in Protein Chemistry*, **34**: 167–339. (1981).

Rogawski M., Johnson M. Intrinsic severity as a determinant of antiepileptic drug refractoriness. *Epilepsy Currents*, **8**(5): 127–130. (2008).

Römermann K., Helmer R., Löscher W. The antiepileptic drug lamotrigine is a substrate of mouse and human breast cancer resistance protein (ABCG2) *Neuropharmacology*, **93**: 7–14. (2015).

Schiller Y. Seizure relapse and development of drug resistance following long-term seizure remission. *Archives of Neurology*, **66**: 1233–1239. (2009).

Schinkel A., Jonker J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**: 3-29. (2003).

Schmidt D, Löscher W. New developments in antiepileptic drug resistance: and integrative view. *Epilepsy Currents*, **9**: 47–52. (2009).

Semah F., Picot M., Adam C., Broglin D., Arzimanoglou A., Bazin B., et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology*, **51**: 1256–1262. (1998).

Shepard R., Cao J., Starling J., Dantzig A. Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *International Journal of Cancer*, **103**: 121–125. (2003).

Shintre C., Pike A., Li Q., Kim J., Barr A., Goubin S., Shrestha L., Yang J., Berridge G., Ross J., Stansfeld P., Sansom M., et al. Structures of ABCB10, a human ATP-binding cassette transporter in apo- and nucleotide-bound states, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**: 9710–9715. (2013).

Sillanpää M., Schmidt D. Is incident drug-resistance of childhood-onset epilepsy reversible? A long-term follow-up study. *Brain*, **135**: 2256–2262. (2012).

Summers MA, Moore JL, McAuley JW. Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy. *Annals of Pharmacotherapy*, **38**:1631–1634. (2004).

Talevi A., Bruno-Blanch L. On the development of new antiepileptic drugs for the treatment of pharmacoresistant epilepsy: different approaches to different hypothesis. In: *Pharmacoresistance in Epilepsy. From Genes and Molecules to Promising Therapies*, pp. 207-224. EA, R. L. C., Ed. Springer: New York. (2013).

Thomas P., Valton L., Genton P. Absence and myoclonic status epilepticus precipitated by antiepileptic drugs in idiopathic generalized epilepsy. *Brain*, **129**: 1281–1292 (2006).

Trinka E., Martin F., Luef G., Unterberger I., Bauer G. Chronic epilepsy with complex partial seizures is not always medically intractable — a long-term observational study. *Acta Neurologica Scandinavica*, **103**: 219–225. (2001).



van Vliet E., Zibell G., Pekcec A., Schlichtiger J., Edelbroek P., Holtman L., et al. COX-2 inhibition controls P-glycoprotein expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats. *Neuropharmacology*, **58**:404–412. (2010).

van Wonderen J., McMahon R., O'Mara M., McDevitt C., Thomson, A. J., Kerr I., et al. The central cavity of ABCB1 undergoes alternating access during ATP hydrolysis. *The FEBS Journal*, **281**: 2190–2201. (2014).

Varma M., Ashokraj Y., Dey C., Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacological Research*, **48**: 347–359. (2003).

Wang R., Kuo C., Lien L., Lien E. Structure–activity relationship: analysis of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **28**: 203–28. (2003).

Wen P., Verhalen B., Wilkens S., Mchaourab H., Tajkhorshid E. On the origin of large flexibility of P-glycoprotein in the inward-facing state. *Journal of Biological Chemistry*, **288**: 19211–19220. (2013).

Zibell G., Unkrueer B., Pekcec A., Hartz A., Bauer B., Miller D., et al. Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by COX-2 inhibition. *Neuropharmacology*, **56**: 849–855. (2009).







## FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS

Los fármacos antiepilepticos (FAEs) proveen un control satisfactorio de las convulsiones para la mayoría de los pacientes con epilepsia. Estas sustancias tienen la habilidad de proteger contra las convulsiones mientras permiten el normal funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) (Rogawski & Löscher 2004a). Durante las últimas tres décadas, la introducción de más de 15 FAEs de tercera generación ha suministrado a médicos y pacientes diversas opciones para tratar diversos tipos de crisis epilépticas (Löscher & Schmidt, 2011). Sin embargo, aunque aproximadamente el 70–80% de los nuevos pacientes epilépticos eventualmente entran en remisión utilizando alguno de los FAEs actuales, estos medicamentos fallan en el control de las convulsiones en el 20–30% de los casos de epilepsia (Sillanpää & Schmidt, 2006; Brodie et al., 2012). Además, ningún FAE ha demostrado aún ser capaz de prevenir el desarrollo de epilepsia en pacientes antes de la primera convulsión; por el contrario, estas drogas parecen actuar únicamente a nivel sintomático, suprimiendo las convulsiones una vez que éstas aparecen (Temkin, 2009; Schmidt, 2012).

La actividad anti-epileptogénica de algunos FAEs ha sido sugerida en ciertos ensayos preclínicos (Blumenfeld et al, 2008; Russo et al., 2010) pero esto aún no ha sido corroborado en humanos. De hecho, excepto en casos de lesión cerebral traumática (Temkin, 2009), ninguna de las terapias prometedoras en ensayos preclínicos ha sido ensayada en un estudio clínico diseñado apropiadamente para pacientes epilépticos (Löscher et al., 2013a). Los FAEs tampoco son capaces de prevenir o revertir el desarrollo de epilepsia farmacorresistente, para tratar comorbilidades o para reducir el daño de la enfermedad de manera global (Löscher & Schmidt, 2011). Como excepción, carbamazepina, valproato, oxcarbazepina y lamotrigina, han sido aprobados por la FDA para ser utilizados como estabilizadores del ánimo en desorden bipolar, por lo que podrían ayudar a paliar los trastornos depresivos asociados a epilepsia (Rapoport et al., 2009; Kerr et al., 2011). Un aspecto particularmente inquietante de los tratamientos farmacológicos actuales para la epilepsia es que no se ha realizado un progreso sustancial en los últimos 40–50 años desde la introducción de carbamazepina o ácido valproico al mercado<sup>14</sup> (Löscher & Schmidt, 2011; Beyenburg et al., 2010).

Varias son las consecuencias de esta paralización en el desarrollo de drogas superadoras para el tratamiento de la epilepsia. Los pacientes y los médicos se decepcionan cada día más y por ende muestran menos interés en utilizar FAEs más caros recientemente desarrollados. Así, ni los pacientes, ni los responsables de los

---

<sup>14</sup> Una de las excepciones a esto es por ejemplo el caso del levetiracetam, que además de presentar un mecanismo de acción novedoso, ha mostrado eficacia para tratar algunos tipos de epilepsia.

centros de salud acceden a invertir en drogas que no prometen superar en nada a los medicamentos de bajo costo actualmente disponibles. Por último, la industria farmacéutica ha perdido interés en el desarrollo de nuevos compuestos para la terapéutica de la epilepsia (Löscher et al., 2013a).

Se han atribuido dos causales a la falla en el desarrollo y descubrimiento de nuevos FAEs que presenten una mayor eficacia. Una de ellas es el hecho de que, salvo unas pocas excepciones, todos los FAEs fueron descubiertos por los mismos modelos preclínicos, mayormente a través de los modelos de crisis epiléptica inducida por electroshock máximo (Maximal Electroshock Seizure Test o simplemente MES Test) en ratones, el cual hay que destacar que ha tenido y tiene una utilidad invaluable como criterio selectivo. Estos ensayos han conducido al desarrollo de nuevos FAEs pero obviamente no han ayudado a identificar sustancias con mayor eficacia capaces de controlar, por ejemplo, los casos de epilepsia refractaria. Esta preocupación no es nueva, pero sorprendentemente ha sido poco considerada a lo largo de varias décadas. La segunda causa es especulativa y establece que hasta que no se descubran las causas subyacentes de la epilepsia refractaria y por ende se desarrollen fármacos que ataquen a este nivel, no se avanzará en mejorar la farmacoterapia de este trastorno (Löscher & Schmidt, 2011).

El desarrollo de nuevos FAEs más efectivos permitirá un recambio en los ensayos clínicos éticamente cuestionables como los tratamientos con placebo, dosis bajas y diseños de no inferioridad para poder entrar en la era de los ensayos de efectividad comparativa (Chadwick & Privitera, 1999; Garattini & Bertele, 2007; Perucca, 2008; French & England, 2010). De la misma manera, se ha propuesto avanzar con el desarrollo de modelos animales de epilepsia refractaria para potenciar la identificación de sustancias más eficaces. A la fecha, el ensayo 6Hz es el único modelo de farmacoresistencia aceptado por el National Health Institute (NIH) capaz de aplicarse en cribado de relativamente alto rendimiento de nuevos compuestos; sin embargo, la validación de este modelo para tal fin es aún un tema sin resolver (Löscher et al., 2013a). Por otro lado, es un hecho inminente la posibilidad de identificar drogas anti-epileptogénicas en ensayos preclínicos (Löscher & Brandt, 2010).

En el presente capítulo se hará un recorrido sobre la temática de los fármacos antiepilépticos incluyendo una breve discusión sobre la meseta que actualmente atraviesa la investigación y las perspectivas de desarrollo de nuevas sustancias superadoras capaces de suministrar una solución integral a los pacientes epilépticos.

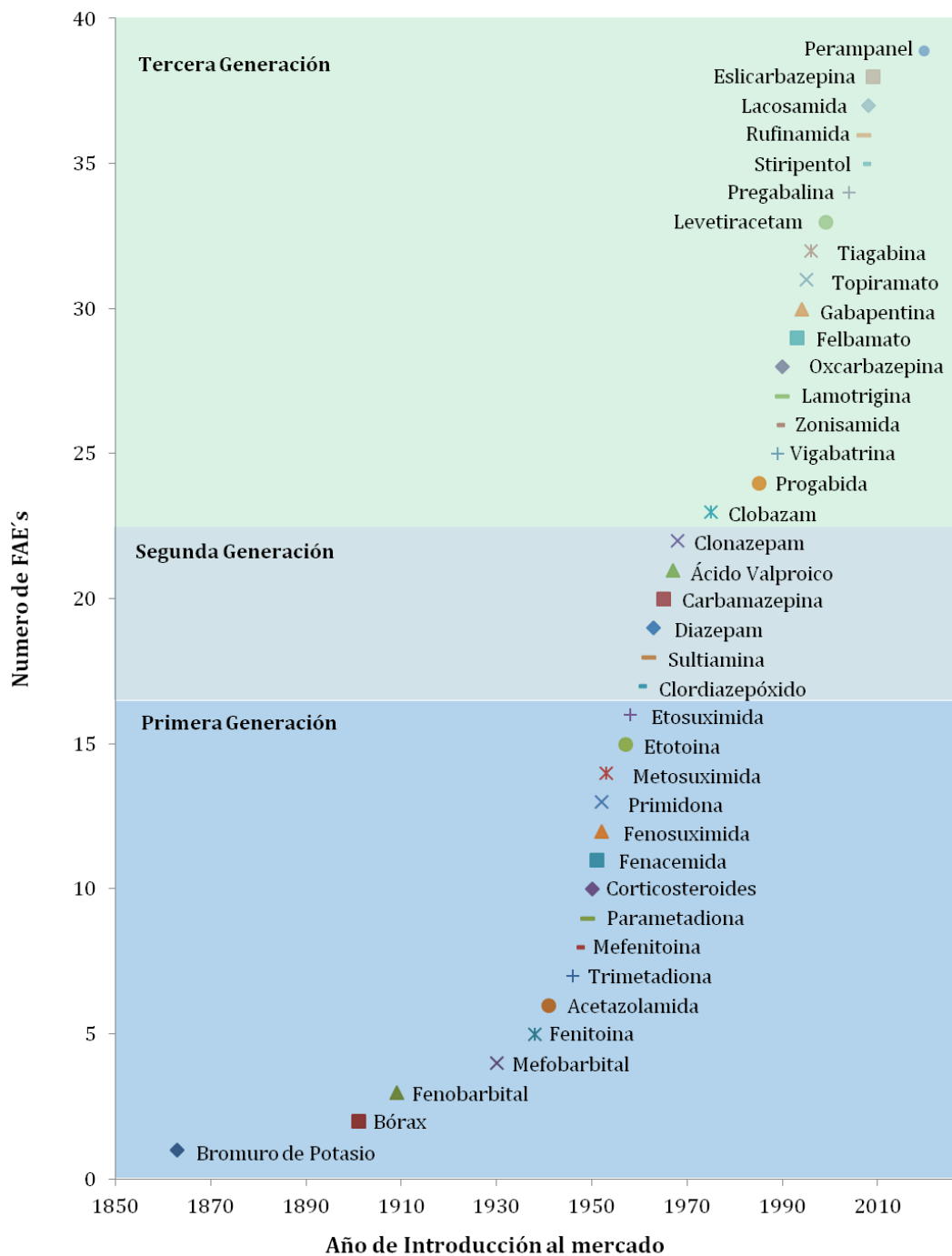
## Diversidad y Clasificación

Los FAEs han sido históricamente clasificados en tres generaciones. La primera generación se introdujo en el mercado desde 1857 a 1958, incluyendo al bromuro de potasio, fenobarbital, y una variedad de drogas cuya estructura deriva del ácido barbitúrico, como la fenitoína, primidona, trimetadiona y etosuximida (Krall et al., 1978; Shorvon, 2009a).

La segunda generación de FAEs está comprendida por carbamazepina, ácido valproico y las benzodiazepinas. La misma fue introducida entre 1960 y 1975 y se diferenció estructuralmente de los congéneres del fenobarbital (Shorvon, 2009b). A pesar de los bien conocidos efectos adversos dosis dependientes sobre el SNC de fenitoína y fenobarbital, estos dos fármacos poseen la misma eficacia que carbamazepina para tratar convulsiones focales y consecuentemente siguen siendo ampliamente utilizados en muchas partes del mundo principalmente por su bajo costo (Mattson et al., 1985; Löscher & Schmidt, 2011).

Carbamazepina, fenitoína, fenobarbital y primidona (la cual es metabolizada a fenobarbital), poseen dos importantes desventajas clínicas. Por un lado son potentes inductores enzimáticos, lo que conduce a interacciones medicamentosas clínicamente relevantes y, por otro, causan diversas reacciones de hipersensibilidad (Schmidt & Beyenburg, 2009). El ácido valproico, a pesar de haber demostrado un buen control de epilepsias focales, generalizadas e idiopáticas (Löscher, 1999), resultó ser menos eficaz que carbamazepina en el control de convulsiones parciales complejas (Mattson et al., 1992) y además posee tres grandes desventajas desde el punto de vista clínico: (1) está involucrado en interacciones medicamentosas por ser inhibidor enzimático; (2) causa falla hepática en individuos predispuestos y; (3) es la sustancia más teratogénica entre todos los FAEs conocidos actualmente en el mercado (Schmidt & Beyenburg, 2009).

Después de la introducción de este último en los años 1960s, ningún nuevo FAE ingresó al mercado por al menos dos décadas, a excepción de algunas benzodiazepinas, tal y como lo muestra la Figura 1, por lo que tanto médicos como pacientes depositaron grandes expectativas de mejoras terapéuticas en la nueva y tercera generación de FAEs. La misma comenzó en 1980 con el desarrollo racional de drogas como la progabida, vigabatrina y tiagabina, las cuales fueron concebidas para abordar selectivamente blancos moleculares que se sabía tenían una participación crítica en el desarrollo de convulsiones epilépticas, en este caso, el metabolismo y recaptación del neurotransmisor inhibitorio GABA (Löscher & Schmidt, 1994).



**Figura 1|** Dinámica temporal de la introducción de FAEs al mercado. Adaptado de Löscher & Schmidt, 2011.

A pesar de haber expandido las opciones terapéuticas, en particular en aquellos pacientes en los que es estrictamente necesario un cambio de régimen medicamentoso, la tercera generación de FAEs igualó pero no superó la eficacia de los primeras generaciones en el tratamiento de nuevos casos de epilepsia (Kwan & Brodie, 2000; Brodie et al., 2007; Marson et al., 2007; Glauser et al., 2010).

Cabe destacar que el tratamiento con alguno de los FAEs de tercera generación evita la aparición de interacciones medicamentosas y reacciones de hipersensibilidad (Elger & Schmidt, 2008), y varios de ellos han demostrado ser



útiles en el tratamiento de enfermedades distintas a la epilepsia, como por ejemplo la lamotrigina en el tratamiento del desorden bipolar (Rogawski & Löscher, 2004b).

### **Neurobiología y actividad antiepiléptica de los FAEs**

La actividad antiepiléptica de los FAEs depende de que éstos sean capaces de interactuar con uno o más blancos moleculares a nivel cerebral. Estos blancos moleculares incluyen a dos grandes grupos de macromoléculas: a) canales iónicos y b) transportadores y enzimas metabolizadoras de neurotransmisores (Figura 2). El efecto final de estas interacciones es la alteración en las propiedades de las descargas neuronales y la reducción de la sincronización de grupos de neuronas localizados. Adicionalmente, los FAEs inhiben la propagación de las descargas anormales hacia sitios distantes, evitando así la expresión conductual de la actividad epiléptica. Dependiendo del mecanismo en los que se encuentran involucrados, los FAEs pueden ser categorizados en (1) moduladores de canales iónicos operados por voltaje, (2) potenciadores de la inhibición sináptica y (3) atenuadores de la excitación sináptica (Rogawski & Löscher, 2004a).

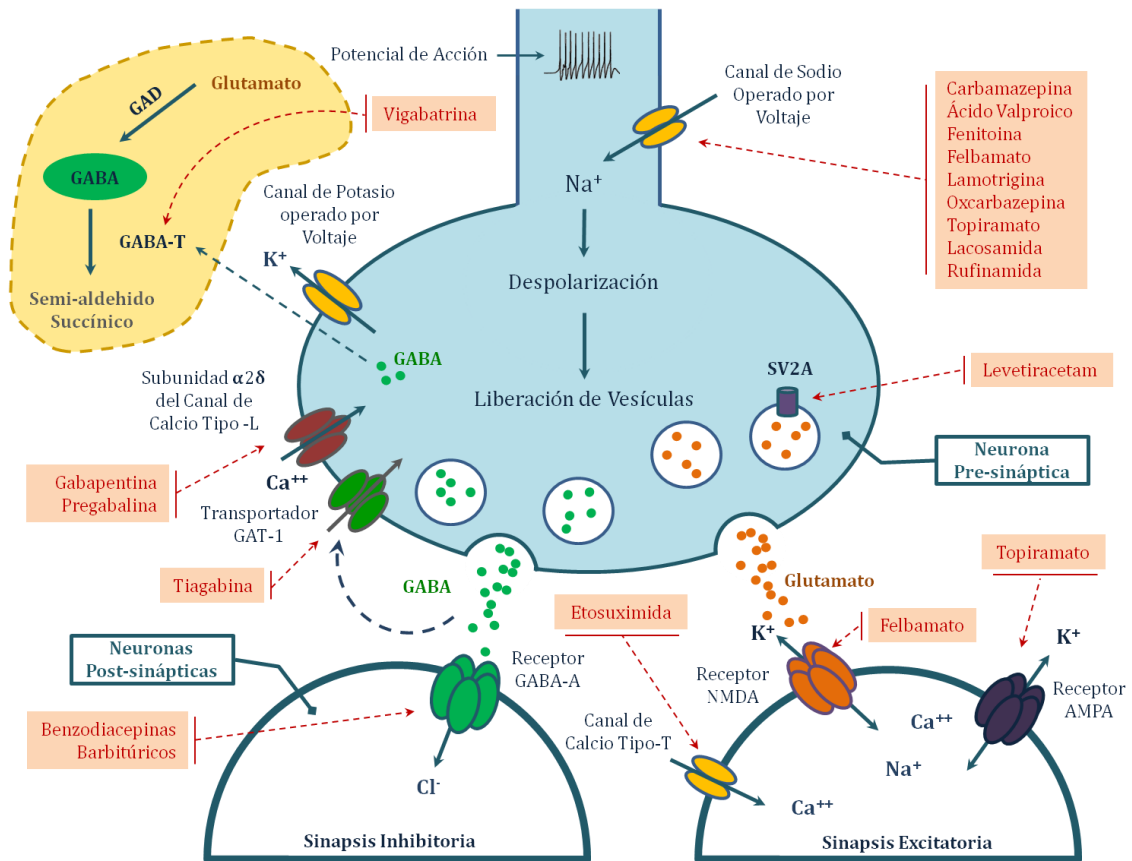
Los canales iónicos operados por voltaje (incluyendo canales de sodio, calcio y potasio) gobiernan el comportamiento eléctrico de las neuronas determinando el umbral de disparo de los potenciales de acción de las mismas, regulando la capacidad de respuesta a señales sinápticas, contribuyendo a los cambios paroxísticos despolarizantes y finalmente participando activamente en la generación de descargas epilépticas (Rogawski & Löscher, 2004a).

Uno de los blancos farmacológicos compartido por varios FAEs son los canales de sodio operados por voltaje. Estas macromoléculas son las responsables de la fase ascendente (o de despolarización) de los potenciales de acción neuronales. Cuando el potencial de membrana de las neuronas alcanza el umbral de despolarización, los canales de sodio lo sensan y en cuestión de unos pocos micro-segundos sufren un cambio conformacional mediante el cual pasan del estado cerrado de no conducción de reposo al estado conductivo abierto que permite el influjo de iones  $\text{Na}^+$  hacia el interior de la neurona. Los canales deben entonces re-polarizarse antes de que puedan ser activados nuevamente por una despolarización subsecuente, por lo que atraviesan un período refractario durante el cual es imposible evocar otro potencial de acción. A través de este corto proceso, los canales permanecen mayormente en estado inactivado. Los canales de sodio cerebrales pueden recorrer rápidamente los estados de reposo (cerrado), inactivado y abierto, permitiendo a las neuronas disparar trenes de potenciales de acción de alta frecuencia los cuales se requieren tanto para el normal

funcionamiento del cerebro como para la expresión de la actividad epiléptica. La capacidad de varios FAEs para proteger contra convulsiones generalizadas tónico-clónicas y contra convulsiones parciales, se atribuye en parte a la habilidad de los mismos para modular la apertura de los canales de sodio operados por voltaje. Tales drogas bloquearían los disparos neuronales repetitivos de alta frecuencia que ocurren durante la propagación de la actividad epiléptica, sin afectar la actividad neuronal basal (Rogawski & Löscher, 2004a).

La explicación a este fenómeno consiste en que los FAEs presentan una alta afinidad por la conformación inactiva del canal de sodio y una baja afinidad por la conformación en reposo lo que resulta en una prolongación del estado refractario y un impedimento en los disparos repetitivos de potenciales de acción de las neuronas (Remy et al., 2003; Willow et al., 1985; Matsuki et al., 1984; Ragsdale et al., 1991; Xie et al., 1995; Rogawski & Löscher, 2004a). Los canales de calcio operados por voltaje, siendo elementos cruciales en el proceso de liberación de neurotransmisores y por consiguiente fundamentales para la transmisión sináptica, también son importantes blancos terapéuticos para los FAEs, actuando los mismos sobre la aparición, sincronización y propagación de las crisis epilépticas (Catterall, 2000; Turner 1998).

La inhibición y excitación sináptica son reguladas por canales iónicos regulados por neurotransmisores (receptores GABA<sub>A</sub>, NMDA, AMPA entre otros); estos canales también participan en los fenómenos de sincronización de conjuntos neuronales y propagación de descargas anormales hacia sitios distantes, razón por la cual constituyen otro gran conjunto de blancos terapéuticos para los FAEs (Rogawski & Löscher, 2004a). Los mecanismos involucrados abarcan la potenciación de la inhibición sináptica mediada por receptores de ácido  $\gamma$ -amino butírico tipo A (GABA<sub>A</sub>) o sistemas de glicina, o interferencia en la neurotransmisión mediada por catecolaminas, serotonina, histamina, neuropéptidos, o el neuromodulador inhibitorio adenosina. Adicionalmente, el bloqueo de los receptores de glutamato, incluyendo tanto a los NMDA (N-Methyl-D-Aspartate), AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-Hidroxy-5-Methyl-4-Isoxazole Propionic Acid), Kainato, y a los metabotrópicos del grupo 1 subtipos mGluR1 y mGluR5, también proporciona protección contra convulsiones en modelos animales (Rogawski, 1996).



**Figura 2|** Mecanismos de acción de los FAEs. Los FAEs actualmente disponibles en el mercado ejercen sus efectos a través de la interacción con diversos blancos moleculares tanto a nivel pre-sináptico como post-sináptico. Estos blancos incluyen canales de sodio operados por voltaje, la glicoproteína 2A de las vesículas sinápticas (SV2A), la subunidad  $\alpha 2\delta$  de los canales de calcio voltaje operados, receptores de glutamato AMPA y NMDA, el transportador de ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) GAT-1, la enzima metabolizadora de GABA, GABA-Transaminasa (GABA-T) y el receptor GABA-A. Los FAEs que actúan sobre canales iónicos aumentan o disminuyen la corriente de iones a través de los mismos de manera de potenciar la inhibición o atenuar la excitación. El aumento del influjo de calcio, por ejemplo, promueve la liberación vesicular de neurotransmisores por lo que el bloqueo de éste podría disminuir la concentración de glutamato en el espacio inter-sináptico y por ende la neurotransmisión excitatoria. Asimismo, algunos FAEs pueden bloquear la captación de glutamato por receptores AMPA y NMDA y de esta manera interferir en la excitación post-sináptica. Un mecanismo alternativo implica el bloqueo de la recaptación de GABA por las neuronas pre-sinápticas a través de los transportadores GAT-1 de manera de aumentar la disponibilidad de GABA en el espacio inter-sináptico potenciando así la inhibición por aumento de la corriente de iones cloruro a través del receptor GABA-A. El mismo efecto puede obtenerse por medio del bloqueo de la enzima metabolizadora de GABA, GABA Transaminasa. Por último, ciertos FAEs como los barbitúricos y las benzodiacepinas potencian la neurotransmisión inhibitoria por medio de la modulación alostérica de los receptores GABA-A. GAD = decarboxilasa del ácido glutámico.

En principio, es posible prevenir las convulsiones abordando cualquiera de los sistemas mencionados o una combinación de los mismos. El descubrimiento de FAEs a través de modelos animales no sesgados con respecto al mecanismo de acción ha permitido identificar drogas que actúan por mecanismos completamente novedosos (Rogawski & Löscher, 2004a).

En definitiva los FAEs actualmente disponibles en el mercado presentan una notable diversidad de acciones y ninguno de ellos actúa exactamente de la misma manera, por ejemplo, carbamazepina y fenitoína actúan sobre canales de sodio operados por voltaje, bloqueando el influjo rápido de iones sodio, pero la segunda puede además inhibir las corrientes persistentes de sodio. En la tabla 1 se resumen los aspectos principales de dicha diversidad incluidos los principales efectos colaterales de cada FAEs (Löscher et al., 2013a).

| <b>FAE</b>                | <b>Año</b>  | <b>Mecanismo de Acción Propuesto</b>   | <b>Indicaciones Aprobadas</b>   | <b>Principal Uso</b>                               | <b>Principales Limitaciones</b>  |
|---------------------------|-------------|--|---|--|--|
| <b>Primera Generación</b> |             |  |   |  |  |
| Bromuro de Potasio        | <b>1857</b> | Potenciación inhibitoria por GABA      | Crisis convulsivas Tónico-clónicas, mioclónicas   | Amplio uso en convulsiones focales y generalizadas | Neurotoxicidad severa (Bromismo)   |
| Fenobarbital              | <b>1912</b> | Potenciación inhibitoria por GABA      | Crisis convulsivas parciales y generalizadas, sedante, trastornos de ansiedad y del sueño | Amplio uso en convulsiones focales y generalizadas | Inductor enzimático, reacciones de hipersensibilidad dérmicas, sedación, hipnosis                            |
| Fenitoína                 | <b>1938</b> | Bloqueante de canales de Sodio         | Crisis convulsivas parciales y generalizadas  | FAE de primera línea, uso intravenoso              | Inductor enzimático, reacciones de hipersensibilidad dérmicas, farmacocinética no lineal                     |
| Trimetadiona              | <b>1946</b> | Bloqueante de canales de Calcio tipo T | Crisis de ausencia  | Uso poco habitual en crisis de ausencia            | Teratogénico   |
| Primidona                 | <b>1954</b> | Potenciación inhibitoria por GABA      | Crisis convulsivas parciales y generalizadas  | Amplio uso en convulsiones focales y generalizadas | Inductor enzimático, reacciones de hipersensibilidad dérmicas, sedación, hipnosis                            |
| Etosuximida               | <b>1958</b> | Bloqueante de canales de Calcio tipo T | Crisis de ausencia  | FAE de primera línea                               | Somnolencia, pérdida de apetito, náuseas, vómitos, hipo, depresión, psicosis, insomnio, anemia aplásica rara |

---

**Segunda Generación**

---

|               |             |   |  |  |   |
|---------------|-------------|---|--|--|---|
| Diazepam      | <b>1963</b> | Potenciación inhibitoria por GABA   | Desordenes convulsivos, estado epiléptico, ansiedad. Deshabitación alcohólica                                | Amplio uso en convulsiones focales y generalizada, uso intravenoso                       | Sedación, tolerancia, sólo usado como adyuvante                     |
| Carbamazepina | <b>1964</b> | Bloqueante de canales de Sodio  | Crisis convulsivas parciales y generalizadas, dolor trigeminal, desorden bipolar                             | FAE de primera línea   | Inductor enzimático, reacciones de hipersensibilidad dérmicas       |
| Valproato     | <b>1967</b> | Múltiple (potenciación GABA, inhibición glutamatergic a NMDA ,Bloqueo de canales de Sodio y de Calcio tipo T) | Crisis convulsivas parciales y generalizadas, crisis de ausencia, profilaxis de la migraña, desorden bipolar | FAE de primera línea. Amplio uso en convulsiones focales y generalizada, uso intravenoso | Inductor enzimático, ganancia de peso, teratogenicidad considerable |
| Clonazepam    | <b>1968</b> | Potenciación inhibitoria por GABA   | Síndrome de Lennox-Gastaut, convulsiones mioclónicas, pánico   | Amplio uso en convulsiones focales y generalizada, uso intravenoso                       | Sedación, tolerancia, solo utilizado como adyuvante                 |
| Clobazam      | <b>1975</b> | Potenciación inhibitoria por GABA   | Síndrome de Lennox-Gastaut, desorden de ansiedad   | Amplio uso en convulsiones focales y generalizada, uso intravenoso                       | Sedación, tolerancia, solo utilizado como adyuvante                 |

---

**Tercera Generación**

---

|             |             |                                   |  |  |  |
|-------------|-------------|-----------------------------------|--|--|--|
| Progabida   | <b>1985</b> | Potenciación inhibitoria por GABA | Crisis convulsivas parciales y generalizadas y mioclónicas Síndrome de Lennox-Gastaut, hipertonía muscular | Uso poco habitual en convulsiones focales        | Hepatotoxicidad clínica, fuera de uso                |
| Vigabatrin  | <b>1989</b> | Potenciación inhibitoria por GABA | Espasmos infantiles, convulsiones parciales complejas  | Espasmos Infantiles                              | Perdida de la visión, ganancia de peso               |
| Lamotrigina | <b>1990</b> | Bloqueante de canales de Sodio    | Crisis convulsivas parciales y generalizadas, Síndrome de  | FAE de primera línea. Amplio uso en convulsiones | Inductor enzimático, reacciones de hipersensibilidad |

|               |      |  |   |  |   |
|---------------|------|--|---|--|---|
|               |      |  | Lennox-Gastaut, desorden bipolar  | focales y generalizadas  | dérmicas  |
| Oxcarbazepina | 1990 | Bloqueante de canales de Sodio   | Convulsiones parciales  | FAE de primera línea   | Inductor enzimático, reacciones de hipersensibilidad dérmicas   |
| Felbamato     | 1993 | Múltiple (potenciación GABA, inhibición glutamatérgica a NMDA, Bloqueo de canales de Sodio y de Calcio tipo T) | Crisis convulsivas parciales y generalizadas, Síndrome de Lennox-Gastaut  | Amplio uso en convulsiones focales y generalizadas                       | Sólo utilizado como adyuvante, anemia aplásica, hepatotoxicidad clínica, reacciones de hipersensibilidad dérmicas |
| Gabapentina   | 1993 | Bloqueante de Canales de Calcio (subunidad $\alpha 2\delta$ )  | Crisis convulsivas parciales y generalizadas, neuralgia diabética y post-herpética, síndrome de piernas inquietas | Síndrome de piernas inquietas, dolor neuropático                         | Sólo utilizado como adyuvante, ganancia de peso   |
| Topiramato    | 1995 | Múltiple (potenciación GABA, inhibición glutamatérgica a AMPA, Bloqueo de canales de Sodio y de Calcio tipo T) | Crisis convulsivas parciales y generalizadas, Síndrome de Lennox-Gastaut, profilaxis de la migraña                | FAE de primera línea. Amplio uso en convulsiones focales y generalizadas | Somnolencia, mareos, vértigo, deterioro cognitivo, trastornos del habla cálculos renales, pérdida de peso         |
| Tiagabina     | 1996 | Potenciación inhibitoria por GABA  | Convulsiones Parciales  | Convulsiones Parciales   | Confusión, dificultad para hablar con claridad tartamudeo, sedación leve, parestesia                              |
| Levetiracetam | 2000 | Modulación SV2A (Glicoproteína 2A de las vesículas sinápticas)   | Crisis convulsivas parciales, generalizadas, tónico-clónicas, Epilepsia Mioclónica Juvenil                        | FAE de primera línea   | Somnolencia, astenia, cefalea, vértigo ataxia   |
| Zonisamida    | 2000 | Bloqueante de canales de Sodio   | Convulsiones Parciales  | Amplio uso en convulsiones focales y                                     | Solo utilizado como adyuvante, sedante  |

|                 |      | generalizadas  |   |  |  |
|-----------------|------|--|---|--|--|
| Stiripentol     | 2002 | Potenciación inhibitoria por GABA, Bloqueo de canales de Sodio | Síndrome de Dravet  | Síndrome de Dravet                                 | Solo utilizado como adyuvante  |
| Pregabalina     | 2004 | Bloqueante de Canales de Calcio (subunidad $\alpha 2\delta$ )  | Convulsiones Parciales, Dolor Neuropático, Trastornos de ansiedad generalizados, Fibromialgia | Dolor neuropático                                  | Solo utilizado como adyuvante, aumento de peso   |
| Rufinamida      | 2004 | Bloqueante de canales de Sodio                                 | Síndrome de Lennox-Gastaut  | Síndrome de Lennox-Gastaut                         | Solo utilizado como adyuvante, somnolencia, vértigo, fatiga, cefalea, náuseas                                    |
| Lacosamida      | 2008 | Mejora la inactivación lenta de canales de Sodio               | Convulsiones Parciales  | Convulsiones Parciales                             | Solo utilizado como adyuvante  |
| Eslicarbazepina | 2009 | Bloqueante de canales de Sodio                                 | Convulsiones Parciales  | Convulsiones parciales                             | Inductor enzimático, somnolencia mareos, hiponatremia, ataxia  |
| Retigabina      | 2011 | Activador de canales de Potasio                                | Convulsiones Parciales  | Droga adyuvante para tratar convulsiones parciales | Coloración azul de labios y uñas, trastornos oculares, poco uso  |
| Perampanel      | 2012 | Agonista de Receptores de Glutamato AMPA                       | Convulsiones Parciales  | Droga adyuvante para tratar convulsiones parciales | Reacciones adversas conductuales y psiquiátricas graves, agresividad, irritabilidad, ira, pensamientos homicidas |

**Tabla 1** | Diversidad y Características de los FAEs utilizados en clínica en la actualidad o en el pasado.

Actualmente, el 20–30% de los pacientes epilépticos presentan convulsiones farmacorresistentes (Löscher et al., 2013a). Reportes de ensayos clínicos de FAEs del año 1971 ya informaban que un 33–38% de los pacientes no presentaban

cambios en la ocurrencia de convulsiones focales e incluso algunos empeoraban (Coatsworth, 1971). Este panorama aparentemente no cambió demasiado desde 1881 cuando se reportaba que el 36-50% de los pacientes epilépticos no conseguían librarse de las convulsiones con el uso de bromuro de potasio (Gowers, 1881), lo que demuestra que el inconveniente de intratabilidad no es un fenómeno novedoso.

Como ya se expuso en el capítulo II, existen varias hipótesis que podrían explicar el fenómeno de refractariedad a fármacos. La que concentra nuestra atención es la denominada *Hipótesis del Transportador*, la cual sugiere que el fenómeno de refractariedad estaría asociado a la regulación hacia arriba (intrínseca o inducida) de uno o varios transportadores de eflujo, entre ellos la glicoproteína-P (P-gp). A continuación se presentarán algunos datos sobre la relación entre los FAEs y este transportador.

### **El transporte de FAEs por la P-gp**

En términos generales, las sustancias lipofílicas son las que presentan una mayor llegada al SNC. Sin embargo, existen muchas drogas liposolubles que presentan una baja permeabilidad a través de la barrera hemato-encefálica (BHE). Muchos de los FAEs presentan alta lipofilidad y, como se discutió en la sección anterior, mecanismos de acción dispares; sin embargo, alrededor de un tercio de los pacientes epilépticos no responden a ellos. Una de las posibles explicaciones que le cabe a este fenómeno es justamente que los transportadores de eflujo como la P-gp expresados a nivel de la BHE bombean los fármacos fuera del cerebro, razón por la cual se observa un decremento de la concentración de la droga en el SNC y su consecuente pérdida de eficacia (Schmidt & Löscher, 2004). Para que esta hipótesis se pueda sustentar deben satisfacerse tres condiciones: (1) los FAEs administrados deben ser sustratos de P-gp; (2) el nivel de expresión de P-gp debe ser mayor en pacientes farmacorresistentes que en pacientes responsivos y; (3) la concentración del FAE en el cerebro debe ser menor en pacientes farmacorresistentes que en pacientes responsivos (Chunbo et al., 2012).

Con respecto a la condición 2, se ha planteado que la existencia de variantes polimórficas del gen ABCB1 resulta en variantes de P-gp de mayor actividad y por ende una asociación directa entre la presencia de estos polimorfos con la epilepsia refractaria (Löscher & Delanty, 2009). A pesar de que un meta-análisis realizado en 2011 no logró demostrar esta asociación (Haerian et al., 2011), otros recientemente publicados confirman una correlación significativa entre la presencia de las variantes C3435T y G2677T/A, en poblaciones caucásica y asiática respectivamente, y la epilepsia refractaria (Li et al., 2015; Lu et al., 2015). Sin embargo, para confirmar definitivamente esta hipótesis, estos resultados deben



ser verificados con estudios de casos y controles utilizando muestras de mayor tamaño.

La evidencia extraída tanto de pacientes como de modelos animales indica que la epilepsia refractaria está asociada a la sobre-expresión de la P-gp y a una baja concentración del FAE en el cerebro (Kimura et al., 2007). De hecho, la presencia de mayores concentraciones de P-gp y de otros transportadores de eflujo en muestras de tejidos cerebrales resecados quirúrgicamente de pacientes epilépticos ha sido demostrada con reproducibilidad (Kwan et al., 2011). Asimismo, estudios *in vivo* e *in vitro* indican que varios FAEs actúan como sustratos de P-gp; sin embargo, hay varias inconsistencias al respecto (Löscher & Potschka, 2005; Kwan & Brodie, 2005). Si observamos los datos disponibles a la fecha (Tabla 2) se puede establecer cuál FAE actúa realmente como sustrato de P-gp. Lamotrigina, oxcarbazepina, fenobarbital y fenitoína son definitivamente sustratos de P-gp dado que exhiben resultados consistentes tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Levetiracetam, acetazolamida, s-licarbazepina, carbamazepina-10,11-epóxido y eslicarbazepina acetato son sustratos probables de P-gp dado que son transportados en modelos celulares (Zhang et al., 2011; Crowe & Teoh, 2006). Provisto que levetiracetam fue encontrado sustrato de P-gp en modelos celulares y en pacientes pero no en modelos animales es difícil juzgar si este es sustrato o no ya que en los estudios en humanos en los que se utilizaron técnicas de microdiálisis intraoperatoria, la expresión de P-gp no fue cuantificada ni se utilizaron inhibidores conocidos del transportador. Por otra parte la variabilidad inter-especie puede contribuir en parte a la obtención de resultados conflictivos (Rambeck et al., 2006).

Carbamazepina, topiramato y felbamato presentan evidencia positiva en ensayos *in vivo* mientras que resultan no transportados por P-gp en modelos *in vitro*, por lo que serían posibles sustratos de P-gp. Los datos extraídos de pacientes epilépticos indican que carbamazepina es sustrato de P-gp; sin embargo, estudios realizados en ratas y la mayoría de los modelos celulares concuerdan en que esta droga no es sustrato de P-gp. Nuevamente, en los estudios realizados en humanos no fueron utilizados inhibidores de P-gp ni tejido control además de ignorarse el nivel de expresión cuantitativo de P-gp (Rambeck et al., 2006). Los datos experimentales de ácido valproico y gabapentina también son conflictivos, en tanto que parece improbable que vigabatrina, zonisamida y etosuximida sean sustratos de P-gp por ser la totalidad de los datos disponibles a la fecha negativos (Chunbo et al., 2012).

| Evidencia de Transporte del FAE por P-gp |           |          |         |                   |
|--|-----------|----------|---------|-------------------|
| FAE                                      | Pacientes | Animales | Células | Categoría         |
| Fenitoina                                | nr        | +        | +       | Sustrato          |
| Fenobarbital                             | nr        | +        | +       | Sustrato          |
| Lamotrigina                              | +         | +        | +       | Sustrato          |
| Oxcarbazepina                            | +         | nr       | +       | Sustrato          |
| Levetiracetam                            | +         | -        | +       | Probable Sustrato |
| Acetazolamida                            | nr        | nr       | +       | Probable Sustrato |
| S-licarbazepina                          | nr        | nr       | +       | Probable Sustrato |
| Carbamazepina-10,11-epóxido              | nr        | nr       | +       | Probable Sustrato |
| Eslicarbazepina acetato                  | nr        | nr       | +       | Probable Sustrato |
| Carbamazepina                            | +         | ?        | -       | Posible Sustrato  |
| Topiramato                               | nr        | nr       | ?       | Posible Sustrato  |
| Felbamato                                | nr        | +        | -       | Posible Sustrato  |
| Valproato                                | nr        | nr       | ?       | Posible Sustrato  |
| Gabapentina                              | nr        | nr       | ?       | Posible Sustrato  |
| Etosuximida                              | nr        | nr       | -       | No sustrato       |
| Vigabatrina                              | nr        | nr       | -       | No sustrato       |
| Zonizamida                               | nr        | nr       | -       | No sustrato       |

**Tabla 2|** FAEs como sustratos de P-gp. +: transportado por P-gp, -:no transportado por P-gp, nr: no reportado, ?: evidencia conflictiva.

Ya en 2008 un trabajo de Luna-Tortós y Löscher sugiere que el uso de ensayos de transporte con concentraciones en equilibrio (CETA) presentan mayor sensibilidad para detectar sustratos de P-gp que los ensayos convencionales dado que evitan el ruido que genera el proceso de difusión (Luna-Tortós et al., 2008). La idea fundamental subyacente a la propuesta de estos autores es que la incidencia del transporte mediado por P-gp podría ser despreciable en ensayos *in vitro* convencionales si el principio activo fuera altamente permeable y un sustrato débil del transportador, mientras *in vivo* los altos niveles de transportador en el foco epiléptico y/o la BHE podrían influir aún en la biodisponibilidad de un sustrato débil. El CETA sería un ensayo más adecuado para detectar sustratos débiles.

Se ha demostrado que la P-gp no es el único transportador involucrado en el flujo de FAEs, identificándose a las sub-familias ABCC (MRP1 y MRP2) y ABCG2 (BCRP) como transportadores alternativos de estos fármacos (Löscher & Potschka, 2005; Luna-Tortós et al., 2008; Kwan & Brodie, 2005; Hoffmann & Löscher, 2007; Römermann et al., 2015), razón por la cual son necesarios más estudios para determinar con precisión cuál FAE es sustrato de P-gp y cuál de otro transportador y si el fenómeno de refractariedad responde a la sobre-expresión de una u otra proteína o a una combinación de las mismas. Al mismo tiempo, a la luz de los resultados ya descritos de los últimos meta-análisis en relación a una posible conexión entre la refractariedad y variantes polimórficos de P-gp (Li et al., 2015; Lu et al., 2015), la determinación de la afinidad de los FAEs por las distintas

variantes polimórficas de P-gp asociadas a epilepsia refractaria aparece como un experimento que vale la pena realizar.

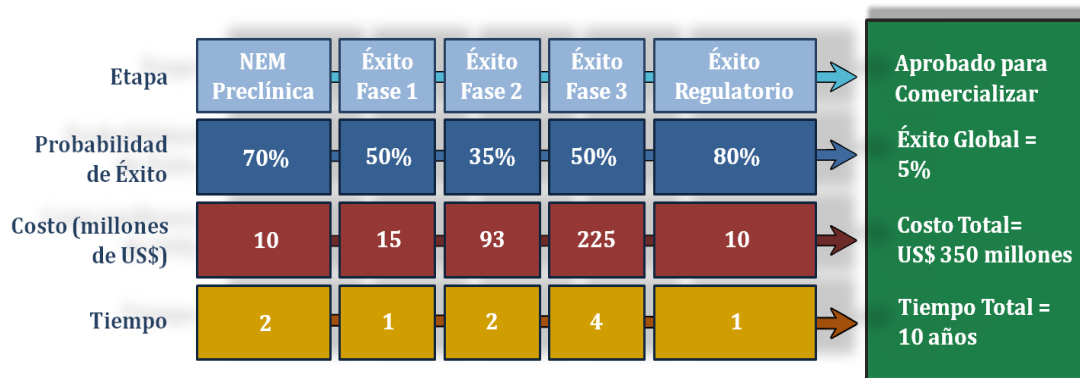
En principio, bajo la hipótesis del transportador, aquellos FAEs que no sean sustratos de P-gp deberían funcionar en caso de epilepsia refractaria mediada por la misma. En el capítulo II se mencionó que las definiciones traen aparejadas consecuencias:

*“Se considera epilepsia fármaco – resistente cuando al menos dos regímenes de fármacos antiepilépticos correctamente seleccionados, bien tolerados y de uso habitual, no logran una supresión sostenida en el tiempo de las convulsiones”* (Kwan et al., 2010).

Claramente la definición anterior no implica que se testeen absolutamente todos los FAEs de uso habitual disponibles en el mercado, un hecho clínicamente impracticable que deja inhabilitada la posibilidad de determinar paciente a paciente cuál de los FAEs presenta utilidad en casos de epilepsia refractaria. Por el contrario, esta variable queda librada a la suerte que pueda tener el paciente bajo tratamiento farmacológico de recibir la droga más adecuada para su situación. Actualmente, en ausencia de una prueba definitiva de la validez, a nivel clínico, de la hipótesis de los transportadores, los lineamientos para el abordaje terapéutico de la epilepsia refractaria no contemplan que al menos una de las dos intervenciones farmacoterapéuticas mencionadas en la definición sea un no sustrato de P-gp.

### **Perspectiva sobre el desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivos**

Desde su descubrimiento, la nueva entidad molecular (NEM) atraviesa una serie de etapas que van desde el escalado de la producción de la sustancia química y estudios preclínicos y toxicológicos hasta los ensayos clínicos de la molécula devenida en fármaco. Se estima que el costo de la etapa temprana de este proceso ronda los 10 millones de dólares con una tasa de éxito del 70%. La NEM logra superar todas las fases del desarrollo con una tasa de éxito total del 5% y a un costo de bolsillo de 350 millones de dólares (Löscher et al., 2013a). La figura 3 muestra esta transición con las respectivas tasas de éxito y costos asociados a cada etapa.



**Figura 3** | Proceso de introducción de un fármaco al mercado.

Los requerimientos legales para demostrar la eficacia de la mono-terapia con FAEs novedosos son diferentes dependiendo de la región de que se trate. Por ejemplo, la regulación europea requiere una comparación con un FAE en uso actual, cuya dosis óptima sea conocida para lo que generalmente se utilizan diseños experimentales de no inferioridad (Greene et al., 2008). En cambio, la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) exige demostración de superioridad con respecto a un FAE de uso habitual determinado. Debido a que no es posible utilizar placebo y al hecho de que no es realista esperar que un nuevo FAE sea más efectivo que un agente ya establecido y funcionando de manera óptima (Perucca, 2010), los ensayos de superioridad de una determinada nueva mono-terapia han dependido tradicionalmente del uso de dosis sub-óptimas (bajas dosis) del fármaco conocido. El diseño más común en estos ensayos consiste en aleatorizar a los pacientes refractarios para asignarle o bien el tratamiento experimental, o una dosis sub-óptima del agente conocido; si los episodios convulsivos empeoran, el paciente es retirado del ensayo. De esta manera, la eficacia se demuestra cuando la tasa de retirados es menor en el grupo experimental que en el control (Perucca, 2008). Aunque este diseño es muy útil para demostrar superioridad, el uso de dosis sub-óptimas ha sido fuertemente criticado desde el punto de vista ético (Perucca & Tomson, 1999).

Este contexto legal y metodológico pone claramente al descubierto que el desarrollo de FAEs ha llegado a una encrucijada. Por un lado existe una actualización constante de nuevas entidades moleculares candidatos a ser evaluadas en ensayos clínicos (Bialer et al., 2015), pero el cauce que toma esta sustancia novedosa desde el momento en que es concebida parece desembocar inequívocamente en la ausencia total de innovación, en gran parte como consecuencia de la falta de nuevos modelos pre-clínicos de identificación de FAEs y del uso de ensayos clínicos inapropiadamente diseñados (Löscher & Schmidt, 2011).

Teniendo en consideración los costos y el tiempo que se invierte en introducir un nuevo fármaco al mercado, el impacto del fracaso se multiplica, activándose una

espiral de (relativo) desinterés en la patología desde la perspectiva comercial de los laboratorios farmacéuticos privados.

Por fortuna, existen agrupaciones internacionales que se encargan de apadrinar a ciertas patologías (para el caso de la epilepsia, las más grandes agrupaciones son la Liga Internacional Contra la Epilepsia, ILAE y la Oficina Internacional de la Epilepsia, IBE, entre otras). Mediante campañas de actualización científica a través de congresos, simposios, etc., estas organizaciones sin fines de lucro logran mantener a flote el entusiasmo por parte de los sectores académicos en desarrollar nuevas terapias e innovar en el área. La posibilidad real de desarrollar un producto novedoso potencialmente patentable y redituable económicamente incentiva a los académicos a reactivar la cooperación con la industria a través de convenios en los cuales el científico se beneficia al obtener financiamiento para su línea de investigación disputándose el prestigio de ser el descubridor de una terapia prometedora y, la industria se beneficia de la potencial rentabilidad de un fármaco novedoso líder del mercado.

### **Desarrollo de nuevos FAEs con menos efectos adversos**

Los efectos adversos de los FAEs son muy frecuentes y representan un impacto considerable en la calidad de vida de los pacientes epilépticos contribuyendo al fracaso terapéutico en más del 40% de los mismos (Perucca & Meador, 2005). Entre los efectos adversos ya mencionados anteriormente, destacan como una constante los relacionados con la tolerabilidad por parte del SNC (Schmidt, 2009), probablemente, como consecuencia de que todos los FAEs han sido desarrollados para contrarrestar la hiper-excitabilidad neuronal abordando mecanismos que también controlan la neurotransmisión normal, hecho que explica a su vez el comportamiento dosis dependiente de estos efectos colaterales (Löscher & Schmidt, 2011; Schmidt, 2009). Además, con la única excepción del levetiracetam (Klitgaard & Verdru, 2008), los modelos de selección de FAEs preclínicos clásicos como los ensayos MES y PTZ han seleccionado de manera consistente sustancias con efectos significativos sobre el SNC, aparentemente como consecuencia de que estos modelos identifican drogas con blancos moleculares específicos. En tal sentido se ha sugerido, por ejemplo, que los efectos adversos asociados a las sustancias identificadas a través del ensayo MES son una consecuencia directa de su acción sobre los canales de sodio operados por voltaje (Meldrum, 2002).

Con el objetivo de subsanar lo arriba mencionado, se ha propuesto aplicar la reciente disciplina denominada biología de sistemas a la farmacoterapia, lo que resultó en la creación del término *farmacología de redes* (*Network Pharmacology*) para referirse a los tratamientos orientados a abordar múltiples blancos

moleculares<sup>15</sup> (Hopkins, 2008; Ainsworth, 2011). El principio fundamental de este nuevo enfoque consiste en desarrollar combinaciones de drogas nuevas o conocidas capaces de modular diversos mecanismos y regular la actividad biológica a través de diferentes blancos moleculares inmersos en una red biológica con el objetivo de controlar patologías que no responden a la mono-terapia o para aquellas que aun no poseen tratamiento alguno, al mismo tiempo que se controlan los fenómenos moleculares responsables de los efectos colaterales (Löscher et al., 2013a). Alternativamente, puede considerarse la aplicación de esta misma estrategia el diseño de agentes terapéuticos multi-objetivo o multi-blanco (Talevi, 2015).

Este novedoso abordaje ha sido considerado para el desarrollo de de tratamientos antiepilépticos que sean al mismo tiempo anti-epileptogénicos (Margineanu, 2012; Löscher & Brandt, 2010), demostrándose un sinergismo sustancial utilizando ciertas combinaciones de drogas las cuales mostraron una sorprendente eficacia utilizadas en conjunto con respecto a la que la que presentan cada una por separado (Brandt et al., 2010; Löscher et al., 1993; Löscher & Ebert, 1996; Kwon, et al., 2013).

Es preciso destacar que esta interesante aproximación también goza de beneficios en lo respectivo a tiempos y costos invertidos en el proceso de desarrollo, siendo los mismos considerablemente menores ya que se trataría en la mayor parte de los casos de fármacos ya conocidos e insertos en el mercado y por ende reposicionados (Löscher et al., 2013a). Pero el escenario adquiere una gran complejidad cuando se habla de emprender proyectos de desarrollo de nuevas entidades químicas capaces de modular múltiples mecanismos involucrados en la epilepsia y sus comorbilidades (Margineanu, 2014).

El desarrollo de nuevas drogas basado en farmacología de sistemas representa un cambio radical con respecto al paradigma actual centrado en blancos moleculares, de manera que su implementación requiere de inversiones sustanciales, principalmente en recursos humanos altamente capacitados y en desarrollo de tecnologías computacionales de punta. Por lo tanto, son lógicos los cuestionamientos a la hora de decidir sobre la consumación del proyecto. En el caso particular del desarrollo de nuevos fármacos para el SNC, se asumen importantes riesgos económicos ya que la tasa de aprobación de estas drogas es apenas la mitad en comparación con otros tipos de drogas y su desarrollo conlleva tiempos superiores (Miller, 2010). Además, la industria farmacéutica encuentra una justificación para dudar si invertir o no en proyectos de desarrollo de nuevos FAEs: el mercado de FAEs es poco atractivo al estar saturado de medicamentos de

---

<sup>15</sup> El término “escopeta mágica” fue creado para referirse también a esta estrategia, pero a su vez, para marcar un cambio de paradigma en la terapéutica en contraposición al concepto de “balas mágicas” del gran Paul Ehrlich.

segunda generación genéricos de bajo costo que además ya están siendo utilizados en otras condiciones del SNC (Bialer, 2012; Mackey, 2010).

Análisis econométricos exhaustivos indican, por otro lado, que la industria farmacéutica no puede mantener la innovación suficiente para reemplazar la pérdida de ingresos debida a la expiración de patentes, sin un fuerte incremento en la productividad de la inversión I+D que conduzca a medicamentos innovadores (Paul et al., 2010).

La implementación de metodologías computacionales para la búsqueda virtual de fármacos (cribado virtual, materia del próximo capítulo) implica una reforma estructural significativa al modelo tradicional de descubrimiento de drogas, adjudicando un rol mucho más importante al sector académico. Se prevé que la industria relegue cada vez más las etapas tempranas del proceso a los académicos y a pequeños grupos especializados (Cressey, 2011).

La introducción de enfoques de descubrimiento de fármacos basados en biología de sistemas tiene horizontes mega-científicos<sup>16</sup> e intenciones de generar redes de colaboración entre actores de diversas motivaciones e intereses avocados a aportar soluciones económicamente más eficientes a patologías de alta complejidad como el cáncer, alzheimer o enfermedades neurodegenerativas que aún se enfrentan a limitaciones para disponer de un tratamiento efectivo, razón por la cual absorben un gran volumen de la inversión I+D aumentando los costos de accesibilidad a los tratamientos. (Margineanu, 2014; Kitano et al., 2011).

### **Nuevos horizontes en el campo de la investigación y desarrollo de nuevos FAEs**

El nuevo paradigma en el tratamiento de enfermedades del SNC mencionado en el inciso anterior es practicable y los avances realizados a la fecha sustentan esta premisa. Dentro de los nuevos blancos (y anti-blancos, *anti-targets*) farmacológicos reportados para la epilepsia potencialmente modulables mediante drogas (*druggable targets*) se pueden mencionar:

**Blancos o anti-blancos vinculados a mecanismos de farmacorresistencia:** extensamente discutidos en el capítulo III de la presente tesis.

---

<sup>16</sup> Entendido por tal al conjunto de esfuerzos científicos, económicos y políticos de carácter internacional orientados a afrontar una problemática puntual o desarrollar una determinada tecnología.

**Mecanismos neuroinflamatorios:** el volumen de información con respecto al papel de los mediadores de la inflamación neuronal en los procesos de ictogénesis y epileptogénesis está creciendo muy rápidamente. La evidencia clínica en niños indica que los esteroides y otros tratamientos anti-inflamatorios muestran actividad anticonvulsiva en algunas formas de epilepsia farmacorresistente (Vezzani et al., 2008; 2011a; 2013). Como ejemplo, el péptido liberador de esteroides endógenos ACTH (hormona adrenocorticotropa) y la prednisolona, están siendo utilizados para el tratamiento a corto plazo de espasmos infantiles aprobados como tratamientos experimentales alternativos a la vigabatrina (Go et al., 2012). Entre los posibles blancos moleculares pro-inflamatorios a abordar se encuentra la enzima convertidora de interleucinas IL-1 $\beta$  (Caspasa 1) la cual participa en la biosíntesis de IL-1 $\beta$ , citocina inductora aguda de convulsiones, y en la activación de sus receptores (receptores IL-1), responsables del mismo efecto. Otro blanco interesante es el receptor tipo Toll 4 (TLR4), un receptor clave de la inmunidad innata (Maroso et al., 2010). Los TLRs, son proteínas transmembrana que se encuentran expresados en células inmunocompetentes y que comparten dominios citoplasmáticos con los receptores de interleucinas, por lo que existe un solapamiento en la utilización de moléculas señalizadoras (Vezzani et al., 2011b). Se ha demostrado que el uso de antagonistas de TLR4 retrasa la aparición de convulsiones y disminuye la recurrencia aguda y crónica de convulsiones en ratones (Maroso et al., 2010).

**El blanco de la rapamicina en células de mamíferos (mTOR):** la señalización por mTOR regula el crecimiento, diferenciación, proliferación y metabolismo celular en el cerebro (Inoki et al., 2005; Vezzani, 2012). La desregulación y pérdida de función de la cascada mTOR ha sido observada tanto en trastornos neurodegenerativos como la esclerosis tuberosa como en formas de epilepsia adquiridas como la epilepsia del lóbulo temporal (Vezzani, 2012; Ryther & Wong, 2012). Actualmente, el uso clínico de rapamicina y de su análogo everolimus para prevenir epilepsia en pacientes con esclerosis tuberosa está siendo evaluado por un consorcio financiado por el NIH para tal fin y a la fecha se disponen de resultados preliminares prometedores<sup>17</sup> (Ryther & Wong, 2012).

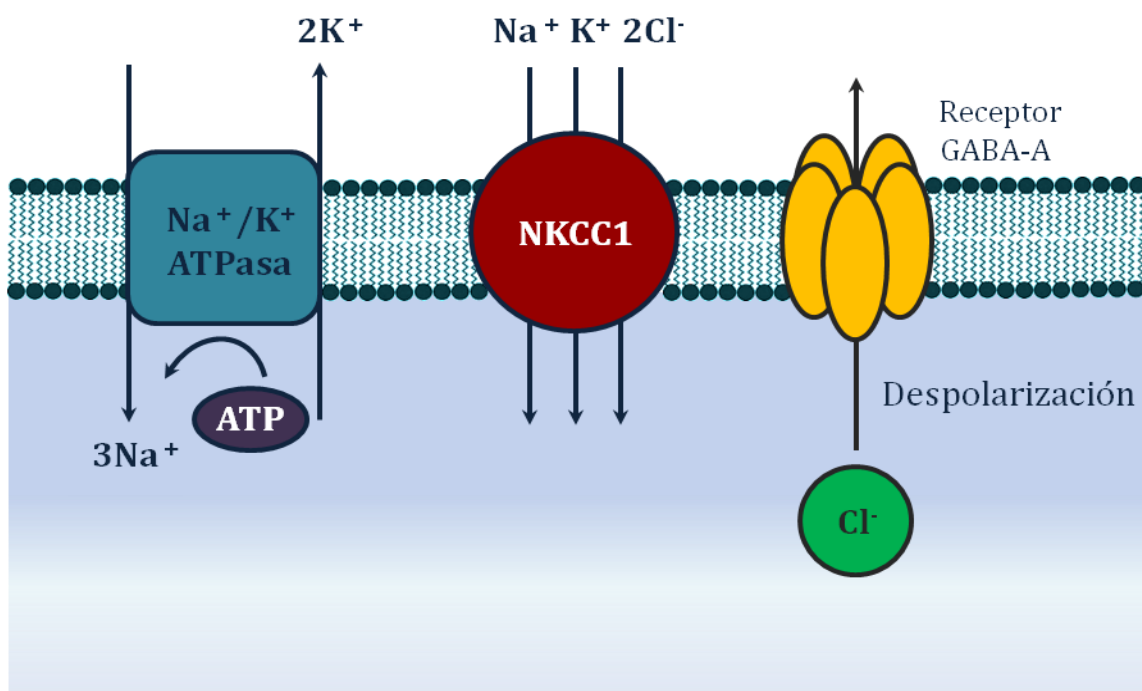
**Co-transportadores catión-cloruro:** Se ha observado que en ocasiones los daños cerebrales epileptogénicos conducen a un reinicio de los procesos de desarrollo resultando en un retorno a los estadios primitivos (inmaduros) de transmisión nerviosa y funcionamiento de los canales iónicos en aquellos núcleos afectados por el daño y por ende envueltos en la ictogénesis. Un ejemplo de esto se reporta en el trabajo de Cohen et al., quienes encontraron en cortes hipocámpales de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal que la actividad paroxística interictal se debía a la despolarización de receptores GABA-A en una sub-población de neuronas

---

<sup>17</sup> ClinicalTrials.gov | ID: NCT01070316



principales (Cohen et al., 2002). Este cambio de transmisión inhibitoria a excitatoria mediada por GABA fue posteriormente atribuido a cambios en la concentración intracelular de cloruros a causa de una expresión alterada de co-transportadores catión-cloruro (Figura 4) KCC2 (co-transportador electroneutro de potasio y cloruro) y NKCC1 (co-transportador sodio-potasio-cloruro sensible a bumetanida), los cuales podrían jugar un papel crucial en la hiper-excitabilidad crónica de neuronas epilépticas (Löscher et al., 2013b). Esto permitió explicar por qué ciertas convulsiones neonatales son resistentes a la potenciación del receptor GABA-A por fenobarbital o diazepam (Dzhala et al., 2005).



**Figura 4** | Co-transportador sodio-potasio-cloruro sensible a bumetanida NKCC1.

En base a lo anterior, se están desarrollando extensos ensayos clínicos en torno al fármaco bumetanida, un bloqueante específico de estos transportadores<sup>18</sup>. Sin embargo, la bumetanida posee la desventaja de una altísima potencia diurética que podría complicar el uso crónico del fármaco con la aparición de alcalosis hipopotasémica y la consecuente predisposición a la aparición de convulsiones, sumada a una muy baja penetración en SNC, con lo que la clave estaría en el diseño racional de derivados de este fármaco (Löscher et al., 2013b).

**Disrupción de la barrera hemato-encefálica (BHE):** el daño en la microvasculatura de la BHE producido por las lesiones cerebrales conduce a la extravasación de albúmina sérica dentro del microambiente de la corteza cerebral con lo que se activa la cascada de señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ R) en las células astrocíticas llevando a la

<sup>18</sup> ClinicalTrials.gov | ID: NCT00830531

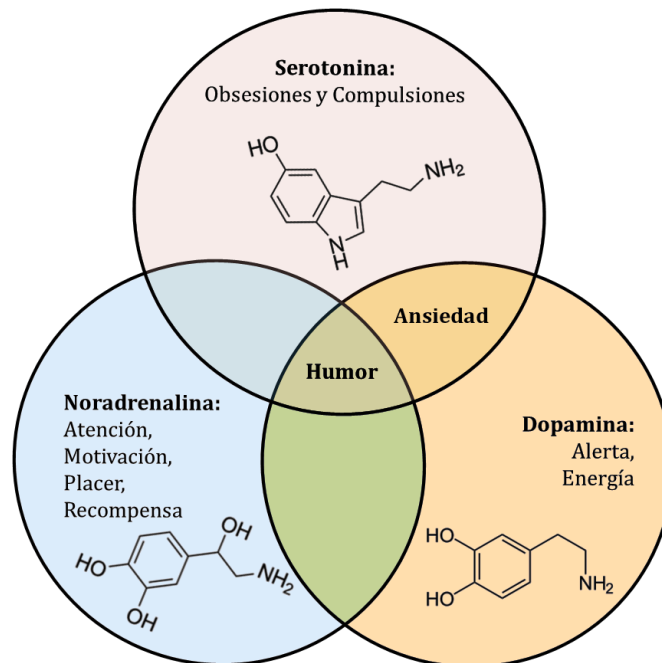
neuroinflamación (Frigerio et al., 2012; Vezzani et al., 2013). La disfunción astrocítica compromete la homeostasis del entorno extracelular cerebral y aumenta la excitabilidad cerebral. El bloqueo de la cascada de señalización del TGF $\beta$  en el modelo de epileptogénesis por albúmina revierte la inflamación y previene el desarrollo de actividad epileptiforme (Cacheaux et al., 2009) lo que indica que el TGF $\beta$  es otro interesante y novedoso blanco molecular que podría interferir con el proceso de epileptogénesis.

**Blancos genéticos y epigenéticos:** publicaciones recientes han reportado que el abordaje de factores de transcripción específicos resulta en oportunidades terapéuticas novedosas para la epilepsia (Mc Clelland et al., 2011; Jimenez-Mateos et al., 2012; Kobow & Blumcke, 2012). Por ejemplo, un aumento considerable en la expresión del factor nuclear 2 (derivado de eritroides 2) (NFE2L2), el cual es un importante factor de transcripción involucrado en la sincronización de la respuesta celular al estrés oxidativo, fue observado en tejido hipocampal de ratones y pacientes con epilepsia del lóbulo temporal. El potencial terapéutico de este blanco fue demostrado induciendo la sobre-expresión del mismo mediante un adenovirus luego de la administración de pilocarpina en ratones y observando una reducción significativa de la aparición de convulsiones recurrentes, activación de la microglía y pérdida de neuronas hipocampales (Mazzuferi et al., 2013).

Siguiendo esta línea de razonamiento se ha sugerido la utilidad en epilepsia del dimetil-fumarato (BG-12), el cual regula hacia arriba la expresión de NFE2L2, basándose en la capacidad neuroprotectora que ha demostrado en esclerosis múltiple (Scannevin et al., 2012).

**Sistemas monoaminérgicos:** independientemente del control de las convulsiones, los pacientes epilépticos sufren un deterioro cognitivo sustancial y co-morbilidades psiquiátricas asociadas con un incremento significativo de la mortalidad (Tellez-Zenteno et al., 2007). Aunque alguno de los FAEs actualmente en el mercado como la lamotrigina han demostrado ser de utilidad en la profilaxis del desorden bipolar (Bowden & Singh, 2012), ninguno de ellos ha mostrado reducir efectivamente la incidencia de depresión o ansiedad asociada a la epilepsia y en contraste algunos FAEs predisponen a trastornos psiquiátricos e intentos de suicidio (Mula et al., 2013).

Por lo tanto, un enfoque prometedor para el desarrollo de nuevos FAEs es el abordaje de mecanismos que conduzcan tanto a la supresión de convulsiones como a la disminución de co-morbilidades asociadas a la epilepsia (Rogawski & Löscher, 2004b). Un ejemplo de esto lo constituyen los sistemas monoaminérgicos (Figura 5). Éstos poseen un rol dominante en los trastornos psiquiátricos, incluyendo desórdenes del humor, ansiedad y psicosis, pero también están involucrados en la regulación del umbral convulsivo (Löscher et al., 2013a).



**Figura 5** | Abordaje de sistemas monoaminérgicos para paliar co-morbilidades de la epilepsia.

Para poner en práctica esta estrategia se ha introducido el naluzotan<sup>19</sup>, actualmente en fase 2 de ensayos clínicos, el cual es un agonista selectivo de los receptores de serotonina 1A (5-HT<sub>1A</sub>). El mismo ha demostrado un gran potencial para suprimir convulsiones e impartir efectos antidepresivos (Kanner, 2012; Rocha et al., 2012; Szot, 2012).

El avance científico en torno a la epilepsia es evidente y se están realizando apreciables esfuerzos intelectuales para quebrar el viejo paradigma de la monoterapia de la enfermedad y explorar blancos moleculares novedosos, persiguiendo hoy día el objetivo de un abordaje global de la patología. Uno de los principales frenos de este flujo de conocimiento es el mercado farmacéutico que define el interés en un tratamiento en función del alcance económico potencial del mismo. En respuesta a esto, la estrategia de reposicionamiento (Ainsworth, 2011; Löscher et al., 2013a) se impone con solidez incluso para entidades moleculares nuevas, pudiéndose por ejemplo apuntarse a la aprobación de la sustancia para el tratamiento del desorden bipolar o dolor neuropático, más atractivas comercialmente, y luego obtener la aprobación para su uso en epilepsia, sorteando así, las “modas” o tendencias impuestas por el propio mercado.

<sup>19</sup> ClinicalTrials.gov | ID: NCT01281956

## REFERENCIAS

- Ainsworth C. Networking for new drugs. *Nature Medicine*, **17**: 1166–1168. (2011).
- Barton M., Klein B., Wolf H., White H. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Research*, **47**: 217–228. (2001).
- Beyenburg S., Stavem K., Schmidt D. Placebo-corrected efficacy of modern antiepileptic drugs for refractory epilepsy: systematic review and meta-analysis. *Epilepsia*, **51**: 7–26. (2010).
- Bialer M. Why are antiepileptic drugs used for nonepileptic conditions? *Epilepsia*, **53**(7): 26–33. (2012).
- Bialer M., Johannessenb S., Levyd R., Perucca E., Tomson T., White S. Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Twelfth Eilat Conference (EILAT XII). *Epilepsy Research*, **111**: 85–141. (2015).
- Blumenfeld H., *et al.* Early treatment suppresses the development of spike-wave epilepsy in a rat model. *Epilepsia*, **49**: 400–409. (2008).
- Bowden C. & Singh V. Lamotrigine (Lamictal IR) for the treatment of bipolar disorder. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **13**: 2565–2571. (2012).
- Brandt C., Nozadze M., Heuchert N., Rattka M. & Löscher W. Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurosciences*, **30**: 8602–8612. (2010).
- Brodie M., Barry S., Bamagous G., Norrie J., Kwan P. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*, **78**: 1548–1554. (2012).
- Brodie M., Perucca E., Ryvlin P., Ben Menachem E., Meencke H. Comparison of levetiracetam and controlled-release carbamazepine in newly diagnosed epilepsy. *Neurology*, **68**: 402–408. (2007).
- Cacheaux L., *et al.* Transcriptome profiling reveals TGF- $\beta$  signaling involvement in epileptogenesis. *Journal of Neurosciences*, **29**: 8927–8935 (2009).
- Catterall W. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual Reviews on Cell and Developmental Biology*, **16**: 521–555. (2000).

Chadwick D. & Privitera M. Placebo-controlled studies in neurology: where do they stop? *Neurology*, **52**: 682–685. (1999).

Chunbo Z., Kwan P., Zuo Z., Baum L. The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**: 930–942. (2012).

Coatsworth J. Studies on the clinical effect of marketed antiepileptic drugs. NINDS Monograph 12. US Department of Health and Education, Bethesda, MD. (1971).

Cohen I., Navarro V., Clemenceau S., Baulac M. & Miles R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy *in vitro*. *Science*, **298**: 1418–1421. (2002).

Cressey D. Traditional drug-discovery model ripe for reform. *Nature*, **471**:17–18. (2011).

Crowe A., Teoh Y., Limited P-glycoprotein mediated efflux for anti-epileptic drugs. *Journal of Drug Target*, **14**: 291–300. (2006).

Dzhala V., *et al.* NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nature Medicine*, **11**:1205–1213. (2005).

Elger C., Schmidt D. Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy Behavior*, **12**: 501–539. (2008).

French J., England J. Invited article: comparative effectiveness research, evidence-based medicine, and the AAN. *Neurology*, **75**: 562–567. (2010).

Frigerio F. *et al.* Long-lasting pro-ictogenic effects induced *in vivo* by rat brain exposure to serum albumin in the absence of concomitant pathology. *Epilepsia*, **53**: 1887–1897 (2012).

Garattini S. & Bertele V. Non-inferiority trials are unethical because they disregard patients' interests. *Lancet*, **370**: 1875–1877. (2007).

Glauser T., Cnaan A., Shinnar S., Hirtz D., Dlugos D., Masur D., Clark P., Capparelli E., Adamson P. Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy. *New England Journal of Medicine*, **362**: 790– 799. (2010).

Gowers W. Epilepsy and other chronic convulsive diseases: their causes, symptoms, and treatment. Churchill, London. (1881).

Go C., Mackay M., Weiss S., Stephens D., Adams-Webber T., Ashwal S., Snead O. Evidence-based guideline update: Medical treatment of infantile spasms: Report of

the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, **78**(24): 1974–1980. (2012).

Greene C., Morland L., Durkalski V., Frueh B. Noninferiority and Equivalence Designs: Issues and Implications for Mental Health Research. *Journal of traumatic stress*, **21**(5): 433-439. (2008).

Hoffmann K. & Löscher W. Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR(-) rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats. *Epilepsia*, **48**: 631–645. (2007).

Hopkins A. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature Chemical Biology*, **4**: 682–690. (2008).

Inoki K., Corradetti M., & Guan K. Dysregulation of the TSC–mTOR pathway in human disease. *Nature Genetics*, **37**: 19–24. (2005).

Jimenez-Mateos E., *et al.* Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure suppressive effects. *Nature Medicine*, **18**: 1087–1094. (2012).

Kanner A. Can neurobiological pathogenic mechanisms of depression facilitate the development of seizure disorders? *Lancet Neurology*, **11**: 1093–1102. (2012).

Kerr M., Mensah S., Besag F., de Toffol B., Ettinger A., Kanemoto K., Kanner A., Kemp S., Krishnamoorthy E., LaFrance Jr W., Mula M., Schmitz B., van Elst L., Trollor J., Wilson S. International consensus clinical practice statements for the treatment of neuropsychiatric conditions associated with epilepsy. *Epilepsia*, **52**: 2133–2138. (2011).

Kimura Y., Morita S., Matsuo M., Ueda K., Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1, *Cancer Sciences*, **98**: 1303–1310. (2007).

Kitano H, Ghosh S, Matsuoka Y. Social engineering for virtual ‘big science’ in systems biology. *Nature Chemical Biology*, **7**: 323–326. (2011).

Klitgaard H. & Verdru P. Levetiracetam — the first SV2A ligand for the treatment of epilepsy. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2**: 1537–1545 (2008).

Kobow K. & Blumcke I. The emerging role of DNA methylation in epileptogenesis. *Epilepsia*, **53**: 11–20. (2012).

Krall R., Penry J., Kupferberg H., Swinyard E. Antiepileptic drug development: I. History and a program for progress. *Epilepsia*, **19**: 393–408. (1978).

Kwan P., Arzimanoglou A., Berg A., Brodie M., Allen Hauser W., Mathern G., Moshé S., Perucca E., Wiebe S., French J. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, **51**: 1069 – 1077. (2010). [Erratum in: *Epilepsia*, **51**: 1922. (2010)].

Kwan P. & Brodie M. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia*, **46**: 224–235. (2005).

Kwan P., Brodie M. Early identification of refractory epilepsy. *New England Journal of Medicine*, **342**: 314–319. (2000).

Kwan P., Schachter S., Brodie M. Drug-resistant epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, **365**(10): 919–926. (2011).

Kwon Y., *et al.* Neuroprotective and antiepileptogenic effects of combination of anti-inflammatory drugs in the immature brain. *Journal of Neuroinflammation*, **10**: 30 (2013).

Li S., Liu Y., & Wang, Q. ABCB1 Gene C3435T Polymorphism and Drug Resistance in Epilepsy: Evidence Based on 8604 Subjects. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, **21**: 861–868. (2015).

Löscher W. & Brandt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacology Reviews*, **62**: 668–700. (2010).

Löscher W. & Delanty N. MDR1/ABCB1 polymorphisms and multidrug resistance in epilepsy: In and out of fashion. *Pharmacogenomics*, **10**(5): 711–713. (2009).

Löscher W. & Ebert U. Basic mechanisms of seizure propagation: targets for rational drug design and rational polypharmacy. *Epilepsy Research*, **11**: 17–44 (1996).

Löscher W. & Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews of Neurosciences*, **6**: 591–602. (2005).

Löscher W. & Schmidt D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia*, **52**: 657–678. (2011).

Löscher W. & Schmidt D. Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random screening and structural variation? *Epilepsy Research*, **17**: 95–134. (1994).

Löscher W. Valproate. Birkhäuser, Basel. (1999).

Löscher W., Klitgaard H., Twyman R., Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, **12**: 757–776. (2013a).

Löscher W., Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews in Neuroscience*, **6**: 591–602. (2005).

Löscher W., Puskarjov M. & Kaila K. Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. *Neuropharmacology*, **69**: 62–74. (2013b).

Löscher W., Rundfeldt C. & Hönack D. Low doses of NMDA receptor antagonists synergistically increase the anticonvulsant effect of the AMPA receptor antagonist NBQX in the kindling model of epilepsy. *European Journal of Neurosciences*, **5**: 1545–1550. (1993).

Lu Y., Wei-Ping L., Yong-Hong Y., Guozhen Q. ABCB1 G2677T/A polymorphism is associated with the risk of drug-resistant epilepsy in Asians. *Epilepsy Research*, **115**: 100–108. (2015).

Luna-Tortos C., Fedrowitz M., Löscher W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology*, **55**: 1364–1375. (2008).

Mackey C. The anticonvulsants market. *Nature Review on Drug Discovery*, **9**: 265–266. (2010).

Margineanu D. Systems biology impact on antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Research*, **98**: 104–115. (2012).

Margineanu D. Systems biology, complexity, and the impact on antiepileptic drug discovery. *Epilepsy & Behavior*, **38**: 131–142. (2014).

Maroso M. *et al.* Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nature Medicine*, **16**: 413–419. (2010).



Marson A., Appleton R., Baker G., Chadwick D., Doughty J., Eaton B., Gamble C., Jacoby A., Shackley P., Smith D., Tudur-Smith C., Vanoli A., Williamson P. A randomised controlled trial examining the longer-term outcomes of standard versus new antiepileptic drugs. The SANAD trial. *Health Technology Assessment*, **11**: 1–134. (2007).

Matsuki N., Quandt F., Ten Eick R. & Yeh J. Characterization of the block of sodium channels by phenytoin in mouse neuroblastoma cells. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, **228**: 523–530 (1984).

Mattson R., Cramer J., Collins J. A comparison of valproate with carbamazepine for the treatment of complex partial seizures and secondarily generalized tonic-clonic seizures in adults. The Department of Veterans Affairs Epilepsy Cooperative Study No. 264 Group. *New England Journal of Medicine*, **327**: 765–771. (1992).

Mattson R., Cramer J., Collins J., Smith D., Delgado-Escueta A., Browne T., Williamson P., Treiman D., McNamara J., McCutchen C. Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures. *New England Journal of Medicine*, **313**: 145–151. (1985).

Mazuferi M. *et al.* Nrf2 defense pathway: experimental evidence for its protective role in epilepsy. *Annals of Neurology*. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.23940> (2013).

Mc Clelland S. *et al.* Neuron-restrictive silencer factor mediated hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channelopathy in experimental temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, **70**: 454–464. (2011).

Meldrum B. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Research*, **50**: 33–40 (2002).

Miller G. Is Pharma running out of brainy ideas? *Science*, **329**: 502–504. (2010).

Mohanraj R. & Brodie M. Outcomes in newly diagnosed localization-related epilepsies. *Seizure*, **14**: 318–323. (2005).

Mula M., Kanner A., Schmitz B. & Schachter S. Antiepileptic drugs and suicidality: an expert consensus statement from the Task Force on Therapeutic Strategies of the ILAE Commission on Neuropsychobiology. *Epilepsia* **54**, 199–203. (2013).

Paul S., Mytelka D., Dunwiddie C., Persinger C., Munos B., Lindborg S., et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews on Drug Discovery*, **9**: 203–214. (2010).

Perucca E. & Meador K. Adverse effects of antiepileptic drugs. *Acta Neurologica Scandinavica*, **181**: 30–35. (2005).

Perucca E. & Tomson T. Monotherapy trials with the new antiepileptic drugs: study designs, practical relevance and ethical implications. *Epilepsy Research*, **33**: 247–262. (1999).

Perucca E. Designing clinical trials to assess antiepileptic drugs as monotherapy : difficulties and solutions. *CNS Drugs*, **22**: 917– 938. (2008).

Perucca E. When clinical trials make history: demonstrating efficacy of new antiepileptic drugs as monotherapy. *Epilepsia*, **51**: 1933–1935. (2010).

Ragsdale D., Scheuer T., & Catterall W. Frequency and voltage-dependent inhibition of type IIA Na<sup>+</sup> channels, expressed in mammalian cell line, by local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant drugs. *Molecular Pharmacology*, **40**: 756–765. (1991).

Rambeck B., Jurgens U., May T., Pannek H., Behne F., Ebner A., Gorji A., Straub H., Speckmann E., Pohlmann-Eden B., Löscher W. Comparison of brain extracellular fluid, brain tissue, cerebrospinal fluid, and serum concentrations of antiepileptic drugs measured intraoperatively in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia*, **47**: 681–694. (2006).

Rapoport S., Basselin M., Kim H., Rao J. Bipolar disorder and mechanisms of action of mood stabilizers, *Brain Research Reviews*, **61**(2), 185–209. (2009).

Remy S., Urban B., Elger C., & Beck H. Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *European Journal of Neurosciences*, **17**: 2648–2658 (2003).

Rocha L. *et al.* Dopamine abnormalities in the neocortex of patients with temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of Disease*, **45**: 499–507. (2012).

Rogawski M. & Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*, **5**: 553–564. (2004a).

Rogawski M. & Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nature Medicine*, **10**: 685– 692. (2004b).

Rogawski, M. En *Neurotherapeutics: Emerging Strategies* (eds. Pullan, L. & Patel, J.) pp. 193–273. Humana, Totowa, New Jersey. (1996).

Römermann K., Helmer R., Löscher W. The antiepileptic drug lamotrigine is a substrate of mouse and human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Neuropharmacology*, **93**: 7–14. (2015).

Russo E., *et al.* Comparison of the antiepileptogenic effects of an early long-term treatment with ethosuximide or levetiracetam in a genetic animal model of absence epilepsy. *Epilepsia*, **51**: 1560–1569 (2010).

Ryther R. & Wong M. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition: potential for antiseizure, antiepileptogenic, and epileptostatic therapy. *Current Neurology and Neuroscience Report*, **12**: 410–418 (2012).

Scannevin R. *et al.* Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **341**: 274–284 (2012).

Schmidt D. Drug treatment of epilepsy: options and limitations. *Epilepsy Behavior*, **15**: 56–65 (2009).

Schmidt D. Is antiepileptogenesis a realistic goal in clinical trials? Concerns and new horizons. *Epileptic Disorders*, **14**: 105–113. (2012).

Schmidt D. & Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms, *Epilepsia*, **46**: 858–877. (2005) / Begley D. ABC transporters and the blood–brain barrier. *Current Pharmaceutical Design*, **10**: 1295–1312. (2004).

Schmidt D., Beyenburg S. Antiepileptic drugs. In Aronson J., (Ed.) Side effects of drugs. Annual 31. Elsevier, Amsterdam, pp. 105– 148. (2009).

Shorvon S. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the first 50 years, 1909–1958. *Epilepsia*, **50**(3): 69–92. (2009a).

Shorvon S. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the second 50 years, 1959–2009. *Epilepsia*, **50**(3): 93–130. (2009b).

Sillanpää M. & Schmidt D. Natural history of treated childhood-onset epilepsy: prospective, long-term population-based study. *Brain*, **129**: 617–624. (2006).

- Szot P. Common factors among Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and epilepsy: possible role of the noradrenergic nervous system. *Epilepsia*, **53**: 61–66. (2012).
- Talevi A. Multi-target pharmacology: possibilities and limitations of the “skeleton key approach” from a medicinal chemist perspective. *Frontiers in Pharmacology*, **6**: 205. (2015).
- Tellez-Zenteno J., Patten S., Jette N., Williams J. & Wiebe S. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia*, **48**: 2336–2344. (2007).
- Temkin N. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia*, **50**(2): 10–13. (2009).
- Turner T. Calcium channels coupled to glutamate release. *Progress in Brain Research*, **116**: 3–14 (1998).
- Vezzani A. Before epilepsy unfolds: finding the epileptogenesis switch. *Nature Medicine*, **18**: 1626–1627 (2012).
- Vezzani A., Balosso S. & Ravizza T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain, Behavior, and Immunity*, **22**: 797–803. (2008).
- Vezzani A., French J., Bartfai T. & Baram T. The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews in Neurology*, **7**: 31–40. (2011a).
- Vezzani A., Maroso M., Balosso S., Sanchez M., & Bartfai. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain, Behavior, and Immunity*, **25**: 1281–1289. (2011b).
- Vezzani A., Friedman A. & Dingledine R. The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* **69**: 16–24 (2013).
- Willow M., Gono T. & Catterall W. Voltage clamp analysis of the inhibitory actions of diphenylhydantoin and carbamazepine on voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells. *Molecular Pharmacology*, **27**: 549–558. (1985).
- Xie X., Lancaster B., Peakman T., & Garthwaite J. Interaction of the antiepileptic drug lamotrigine with recombinant rat brain type IIA Na<sup>+</sup> channels and with native Na<sup>+</sup> channels in rat hippocampal neurones. *Pflügers Archiv*, **430**: 437–446. (1995).

Zhang C., Zuo Z., Kwan P., Baum L. In vitro transport profile of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate, and their active metabolites by human P-glycoprotein. *Epilepsia*, **52**: 1894–1904. (2011).





**Uróboros**, la serpiente que engulle su propia cola, simboliza el ciclo eterno de las cosas, también el esfuerzo eterno, la lucha eterna o bien el esfuerzo inútil, ya que el ciclo vuelve a comenzar a pesar de las acciones para impedirlo. En la práctica de la alquimia, expresa la unidad de todas las cosas, las materiales y las espirituales, que nunca desaparecen sino que cambian de forma en un ciclo eterno de destrucción y nueva creación, al mismo tiempo representa la infinitud. El color verde se asocia con el principio mientras que el rojo simboliza la consumación del objetivo del *Magnum Opus* (la Gran Obra). (*Mysterium Coniunctionis*. Collected Works of Carl Gustav Jung. Vol.14).

“No hay proyecto que en un principio no parezca insensato”. Fausto. Johann Wolfgang von Goethe. 1832.





## QUÍMICA MEDICINAL

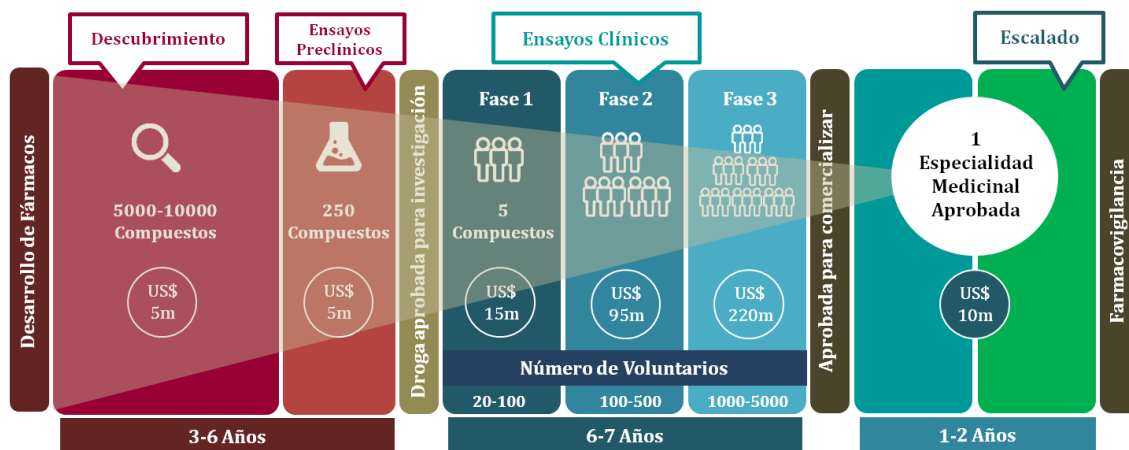
La química medicinal es una disciplina que surge de la intersección entre la química y la farmacología y cuyo objetivo fundamental es la identificación, síntesis y desarrollo de nuevas entidades químicas adecuadas para uso farmacéutico. Se trata de una ciencia interdisciplinaria que combina una variedad de temas de áreas diversas tales como la química orgánica, la fitoquímica, la farmacología, la toxicología, la biología molecular, la bioquímica, la química física, la informática y las matemáticas. Asimismo, incluye el estudio de drogas existentes, sus propiedades farmacológicas, efectos tóxicos y las relaciones existentes entre la estructura química y la actividad biológica (QSAR) (Wermuth et al., 1998).

El proceso de diseño y desarrollo de drogas postulado por la química medicinal posee tres etapas fundamentales (Alagarsamy, 2010):

**Descubrimiento:** es el paso inicial o fase cero del proceso. Comprende la identificación de nuevas sustancias, denominadas *hits*, *prototipos activos* o *cabezas de serie*, que manifiesten una actividad biológica determinada. Estos compuestos pueden ser obtenidos, entre otros métodos, por cribado sistemático de una gran cantidad de sustancias de origen sintético o de fuentes naturales como plantas, animales o microorganismos (Walker et al., 2004).

**Optimización:** esta etapa busca mejorar la estructura cabeza de serie. El proceso de optimización apunta principalmente al aumento de la potencia y selectividad, y a la disminución de la toxicidad del compuesto. Es característico de este paso el establecimiento y análisis de las relaciones entre la estructura química y la actividad biológica (SARs, del inglés *Structure Activity Relationships*) de una serie de análogos, relaciones que son la base de las modificaciones estructurales racionales que conducirán a la optimización de la estructura. La prueba y error es la otra cara de la moneda, filosóficamente opuesta a la anterior pero históricamente utilizada como método para alcanzar la optimización de un prototipo activo (Walker et al., 2004).

**Desarrollo:** tras lograr el éxito en el paso anterior, la nueva entidad molecular (NEM) entra en un largo y costoso periodo (Figura 1) que abarca desde el escalado de la producción de la sustancia y por ende la puesta a punto de su método de obtención, hasta las pruebas y validaciones biológicas preclínicas y clínicas que terminarán de otorgarle a la droga el carácter de medicamento con su correspondiente garantía de seguridad y efectividad para el uso medicinal propuesto.



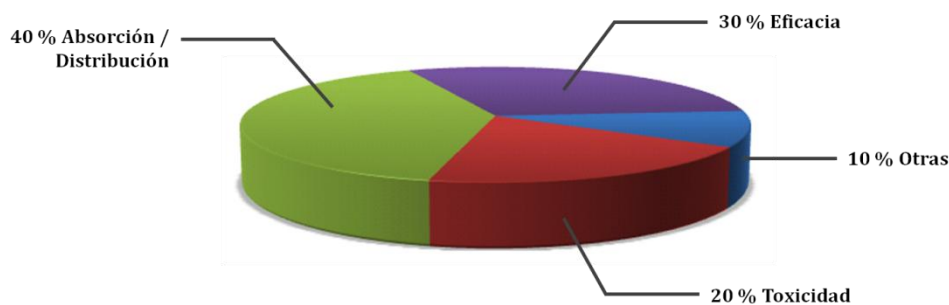
**Figura 1** | Esquema general del proceso de descubrimiento y desarrollo de un fármaco. Adaptado de Trac Services Regulatory Blog. The Drug Development Process ([www.tracservices.co.uk](http://www.tracservices.co.uk)).

Los gran evolución que experimentó la química medicinal a través de la historia como disciplina (Walker et al., 2004; Kell, 2013; Tropsha et al., 2014), fue lograda gracias a dos tipos distintos de investigadores: aquellos que con la genialidad de la lógica profética abren nuevos campos por medio de la correcta interpretación de unos pocos experimentos exitosos, y aquellos que analizan con paciencia y de manera rigurosa la naturaleza hasta comprender la manera de incidir en ella y concebir sustancias útiles en el campo de la medicina (Burguer, 1970).

Este capítulo concluye con el bloque introductorio del trabajo de tesis. Aquí se hará la presentación del enfoque utilizado para darle una posible solución farmacoterapéutica al problema de la epilepsia refractaria basada en la *hipótesis del transportador* ya explicada en detalle en el capítulo III. Se incluye una descripción de las técnicas utilizadas y una breve reseña sobre los esfuerzos realizados a la fecha para abordar la temática desde la óptica químico-medicinal.

### Lineamientos del enfoque / Argumentos

El paradigma clásico de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos se basaba en la introducción de modificaciones químicas en la estructura molecular de un prototipo activo con el objeto de mejorar la potencia del fármaco (su capacidad de interactuar con el blanco molecular), sin prestar suficiente atención a otros aspectos importantes del fármaco tales como su toxicidad y su biodisponibilidad. Como consecuencia de este esquema, alrededor del 40% de los proyectos de desarrollo de nuevos fármacos fracasaban (finalizaban sin lograr el objetivo de introducir el nuevo fármaco, como medicamento innovador, al mercado farmacéutico) debido a problemas en la absorción y distribución del fármaco en el organismo, y un 20% debido a problemas de toxicidad detectados en las etapas preclínica o clínica (Figura 2) (Schuster et al., 2005).



**Figura 2|** Distribución de las causas del fracaso de los proyectos de desarrollo de nuevos fármacos en el período 1992–2002.

La incorporación de filtros ADME (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) *in vitro* e *in silico* en las etapas iniciales del proceso de desarrollo de nuevos fármacos ha logrado reducir el porcentaje de proyectos que naufragan debido a dificultades de índole farmacocinética a alrededor del 10% (Kola & Landis, 2004; Hop et al., 2008; Ferri et al., 2013). Es decir, de acuerdo a los resultados en modelos *in vitro* y modelos teóricos computacionales se descartan las estructuras que potencialmente podrían presentar características ADME/Tox desfavorables en fases tempranas del proyecto de investigación de nuevos agentes quimioterapéuticos.

La *hipótesis del transportador* propuesta para explicar el fenómeno de epilepsia refractaria (Löscher, 2005a; Löscher & Schmidt, 2005b), establece que la afinidad de los fármacos antiepilépticos (FAEs) por transportadores de eflujo como la glicoproteína-P (P-gp) es una de las posibles causas del fracaso terapéutico de estas drogas. Como se explicó en el capítulo III, este tipo de transportadores logra evitar que los fármacos surtan efecto a través de varios mecanismos directamente relacionados con los procesos ADME (Fromm, 2004), por lo que es de gran importancia conocer de manera temprana si una sustancia será transportada por transportadores ABC o no, ya que de ignorar este aspecto durante una campaña de desarrollo de nuevos fármacos, se estaría corriendo un gran riesgo de fracaso del proyecto en etapas avanzadas del mismo teniendo que asumir importantes pérdidas económicas y de tiempo.

La necesidad de conocer la propensión que tienen las sustancias a interactuar con transportadores de eflujo se torna un factor indispensable si se tiene en cuenta la amplia especificidad de sustrato de los mismos, hecho que imposibilita disponer de criterios rápidos e intuitivos para predecir esta propiedad (Chufan et al., 2015). Uno de los objetivos troncales de la presente tesis es arribar a nuevos fármacos capaces de controlar la sintomatología de la epilepsia refractaria, por ende, dichas sustancias deben distribuirse hacia y actuar satisfactoriamente en el sistema nervioso central (SNC) para lo cual deben atravesar con éxito la barrera hemato-

encefálica (BHE) donde uno de los transportadores ABC con mayores niveles de expresión es la P-gp (Talevi & Bruno Blanch, 2012).

La Química Medicinal ha propuesto dos estrategias para abordar la farmacorresistencia mediada por P-gp. La primera consiste en desarrollar inhibidores de la glicoproteína, y co-administrarlos con fármacos conocidos que hayan demostrado ser sustratos de la P-gp, en tanto que la segunda propone identificar potenciales sustratos de la P-gp al principio del ciclo de desarrollo de nuevos fármacos, para seleccionar candidatos a fármaco menos propensos a ser transportados por este transportador (Penzotti et al., 2002). Una tercera estrategia (de naturaleza galénica) que denominaremos caballo de Troya, será comentada hacia el final del capítulo.

En este trabajo, se explora la segunda estrategia, por medio de la construcción de modelos computacionales inferidos a partir de la estructura molecular de sustratos y no sustratos de P-gp. Los modelos desarrollados son clasificadores que establecen si una sustancia es sustrato o no de la glicoproteína-P. Dado que ya se ha desarrollado un clasificador que indica si una sustancia determinada presentará actividad anticonvulsiva o no (Talevi et al., 2007), la propuesta es utilizar estas funciones en conjunto, para extraer de grandes bases de datos (técnica conocida como cribado virtual), aquellas sustancias anticonvulsivas capaces de eludir a la P-gp. Una vez halladas las moléculas con estas características, deberán someterse a validación experimental, a través de los ensayos *in vitro* e *in vivo* pertinentes.

Por último, cabe mencionar que al comienzo de este trabajo se puso el foco en el transporte mediado por P-gp por una cuestión histórica y de volumen de antecedentes científicos disponibles; sin embargo, actualmente se está ampliando la perspectiva hacia otros transportadores de la súper-familia ABC como la BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) en función de la creciente evidencia del impacto de los mismos sobre la distribución de FAEs en el SNC (Nakanishi et al., 2013)

## **Cribado Virtual**

Los grandes avances en química orgánica y en tecnologías relacionadas a síntesis química han resultado en un tremendo crecimiento en la tasa de desarrollo de nuevas entidades químicas. Se ha estimado que el número de compuestos teóricamente factibles mediante síntesis asciende exponencialmente hacia el gúgol ( $10^{100}$ ) (Schneider & So, 2002).

En las últimas cinco décadas, tal y como se predijo, el comportamiento observado fue exponencial (Binetti et al., 2008). En 1965 el número de compuestos orgánicos e inorgánicos registrados en el *Chemical Abstract Service* (CAS) ascendía a algo más

de 210.000 compuestos; en 1990 sobrepasaba cómodamente los 10 millones de entidades químicas mientras que en 2009 ascendía ya a 50 millones. Actualmente, el servicio ha logrado indexar 100 millones de compuestos<sup>20</sup>. Aproximadamente la mitad de los mismos comprende compuestos orgánicos pequeños, tipo fármaco (la base de datos Pubchem<sup>21</sup>, orientada a pequeñas moléculas orgánicas, contiene actualmente 48 millones de entradas).

Este universo de compuestos químicos virtualmente infinito (Grzybowski et al., 2009) presenta posibilidades atractivas desde el punto de vista farmacéutico, ya que en semejante diversidad estructural se advierte el potencial de encontrar fármacos que interactúen selectivamente con cualquier blanco molecular de interés. Sin embargo, tal y como lo ha descrito Kubinyi en varias ocasiones, en este contexto, el proceso de descubrimiento de drogas es equivalente a la búsqueda de una aguja en un pajar (Kubinyi, 2002). Explorar este extenso espacio químico de una manera exhaustiva como por ejemplo a través de screening farmacológico sistemático de todas las entidades químicas conocidas contra todos los posibles blancos moleculares ya no es una posibilidad, de hecho es una estrategia irracional cuando se pondera el tiempo y los recursos que deberían invertirse para ejecutar semejante emprendimiento.

Como respuesta a lo anterior, se han desarrollado estrategias alternativas para explorar tal espacio de una manera eficiente. El cribado farmacológico de alto rendimiento (*High Throughput Screening*, HTS), por ejemplo, conjuga robótica y micro-ensayos para evaluar, mediante ensayos *in vitro* frente a receptores o enzimas, pequeñas cantidades de compuestos contra un gran número de blancos moleculares. Esta tecnología ha evolucionado a tal punto que es capaz de evaluar más de 100.000 compuestos en un día (Pereira & Williams, 2007; Mayr & Bojanic, 2009). Como consecuencia de la tecnología de punta involucrada en el HTS, la técnica es extremadamente rápida pero muy costosa y por ende difícil de implementar por grupos de investigación que disponen de recursos acotados.

Por otro lado, como herramienta mucho más económica y con una perspectiva racional se plantea el uso del cribado virtual: un conjunto heterogéneo de técnicas computacionales que permiten explorar la representación digital de las entidades químicas almacenadas en grandes repositorios de estructuras como ZINC (Irwin et al., 2012) o Pubchem (las cuales almacenan 20 y 48 millones de sustancias orgánicas pequeñas respectivamente) con el objetivo de identificar aquellos compuestos que reúnan determinada serie de requisitos estructurales relacionados con cierta actividad o propiedad biológica. Tales modelos o algoritmos se aplican a manera de filtro o tamiz: sólo aquellos compuestos de la

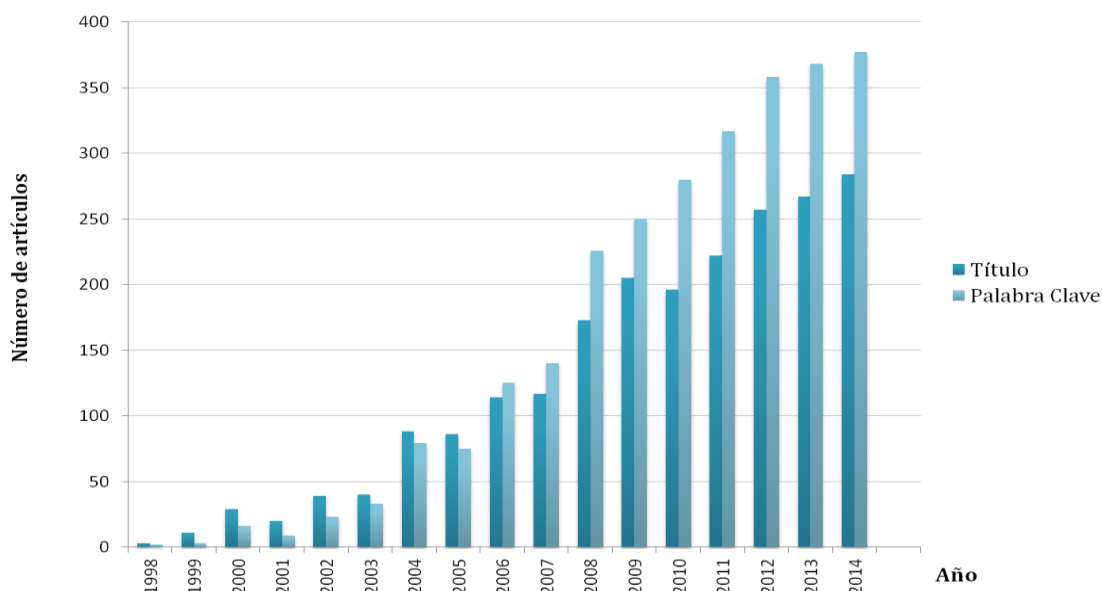
---

<sup>20</sup> <https://www.cas.org>, último acceso en Agosto 2015

<sup>21</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

base de datos que superen el filtro (es decir, que superen un valor de *score* determinado para el o los modelos computacionales o algoritmos) se ensayarán experimentalmente. En otras palabras, el cribado virtual brinda un orden prioritario basado en un criterio racional para los compuestos a ser evaluados en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Reddy et al., 2007; Talevi et al., 2011).

El aumento en el uso de estas metodologías se aprecia en la Figura 3, en la que puede observarse el número de artículos de revistas científicas que llevan en su título o entre sus palabras claves el término “Virtual Screening”, según el reconocido buscador de literatura científica Scopus22. La búsqueda se restringió a revistas científicas (journals) empleando como término de búsqueda “Virtual Screening” entrecomillado.



**Figura 3|** Número de artículos publicados en revistas científicas entre 1998 y 2014 que contienen el término “Virtual Screening” en el título y entre las palabras claves.

Entre las ventajas del cribado virtual pueden mencionarse:

**a) Tiempo / Eficiencia:** la velocidad de los microprocesadores en continuo crecimiento hace cada vez mas fácil la exploración de bases de datos de varios millones de estructuras químicas en cortos períodos de tiempo (días a semanas) (Muegge & Oloff, 2006).

**b) Costo / Eficiencia:** Una vez que un laboratorio ha desarrollado o adquirido una base de datos y el software necesario para aplicar una metodología de cribado virtual el costo de la técnica se reduce simplemente al tiempo que el proceso demanda al recurso humano especializado, por lo que el cribado virtual es una

<sup>22</sup> <http://www.scopus.com/term/analyzer.url>

metodología relativamente poco costosa. Teniendo en cuenta que existen diversas bases de datos de estructuras químicas de dominio público como Pubchem (Baycoucheva, 2007) ZINC (Irwin et al., 2012) o DrugBank (Law et al., 2014), la inversión mínima se reduce al equipo computacional necesario y al software especializado, siendo estos últimos muchas veces también de libre acceso. Por último, numerosas aplicaciones del cribado virtual pueden ser llevadas a cabo de manera exitosa y sin mayores complicaciones utilizando cualquier computadora de escritorio moderna, por lo que el acceso a la técnica es prácticamente universal.

**c) Carácter Teórico:** a diferencia del HTS, que requiere disponer de pequeñas cantidades de las sustancias evaluadas, el cribado virtual, por su carácter teórico, no requiere de una muestra de los compuestos de la base de datos previamente al *screening in silico* y puede realizarse incluso sobre estructuras hipotéticas. La adquisición o síntesis se realiza con posterioridad a la selección computacional del compuesto de la base de datos, y solamente se ensayan aquellos compuestos promisorios que son señalados como candidatos a presentar la actividad farmacológica buscada.

**d) Segundos usos:** la aplicación de una droga para otro uso clínico distinto del aprobado por los organismos reguladores está ampliamente extendida en muchas áreas de la medicina. En consecuencia, se está prestando cada vez más atención a la estrategia de reposicionamiento de fármacos, la cual provee una recuperación rápida y económicamente poco riesgosa de la inversión depositada en el desarrollo de una determinada entidad molecular. Esto es así debido a que es posible prescindir de ensayos preclínicos de toxicidad y ensayos clínicos orientados a establecer la seguridad y perfil farmacocinético del fármaco porque los mismos ya han sido realizados para aprobar la indicación original. El cribado virtual aparece como una herramienta para ayudar a identificar segundos usos desde una perspectiva racional y sistemática, tamizando bases de datos de compuestos con antecedentes de uso en clínica como por ejemplo Drugbank (Talevi et al., 2011).

**e) Bioética:** El cribado virtual responde a la filosofía de las pautas de bioética vigentes a nivel internacional, que proponen utilizar modelos computacionales o ensayos *in vitro* previos a la realización de ensayos *in vivo*, con el objetivo principal de reducir al mínimo y optimizar el número de animales de laboratorios utilizados (Claude, 2009).

## **Técnicas de Cribado Virtual**

Uno de los ejemplos más representativos de cómo una ciencia dura como la química comenzaba a fusionarse con una ciencia de la vida como la biología, fue la

propuesta del químico alemán y premio Nobel Emil Fischer sobre la interacción entre las enzimas y sus sustratos en el año 1894. Para explicar la especificidad observada en las enzimas, él postuló que tanto la enzima como el sustrato debían adquirir ciertas poses geométricamente complementarias que encajen perfectamente una con otra. Yendo más allá, propuso que el sustrato interaccionaba con la enzima de tal manera que éste actuaba como si fuese una llave y la enzima una cerradura, enunciando así su explicación sobre el mecanismo enzimático a la cual denominó “modelo llave cerradura” (Fischer, 1894).

Pocos años más tarde, en 1901, Paul Ehrlich, reconocido como el padre de la quimioterapia moderna, siguiendo el razonamiento de Fischer plantó una de las piedras angulares del desarrollo de fármacos: el concepto de “*balas mágicas*”. Ehrlich reflexionó que si fuese posible desarrollar un compuesto dirigido selectivamente hacia el agente causal de una enfermedad infecciosa, entonces sería posible eliminar tal agente de manera completamente inocua para el paciente. Así, la bala mágica se convirtió en el concepto de agente terapéutico ideal y en la utopía de la *therapia sterilisans magna* para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Winau et al., 2004; Mason, 1964).

Los sucesos mencionados marcaron a fuego el enfoque de los investigadores dedicados al diseño de fármacos, especialmente el de aquellos dedicados a las técnicas de cribado virtual; tal es así, que las metodologías de cribado virtual se dividen en dos grandes grupos dependiendo de si se basan en el ligando (llave) o en el receptor (cerradura).

**Técnicas basadas en el receptor.** También denominadas metodologías basadas en la estructura o metodologías directas, estas técnicas dependen en gran medida de la determinación y análisis de las estructuras tridimensionales de moléculas biológicas (enzimas, receptores canales iónicos, etc.). La hipótesis central de esta aproximación es que la habilidad de un ligando de interaccionar específicamente con un blanco molecular y ejercer una actividad biológica determinada depende de su capacidad de interaccionar adecuadamente con un sitio de unión particular de dicho blanco. Aquellas moléculas que compartan esas características necesarias para la interacción ejercerán efectos biológicos similares. Así, mediante el análisis minucioso del sitio de unión de ligandos de una proteína determinada pueden diseñarse exitosamente nuevas drogas (Sliwoski et al., 2014).

Disponer de información acerca de la estructura tridimensional del receptor es un requisito indispensable para toda campaña de cribado virtual basada en el blanco molecular. Gracias al avance de la genómica y de la proteómica, las metodologías basadas en el receptor se han vuelto muy populares debido a la gran cantidad de blancos moleculares recientemente descubiertos y potencialmente útiles en terapéutica (Bambini & Rappuoli, 2009; Lundstrom, 2011). El extenso uso de



técnicas biofísicas como la cristalografía de rayos X y la espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) facilitó la dilucidación de las estructuras tridimensionales de proteínas tanto del hombre como de organismos patógenos, y decenas de animales y microorganismos de experimentación. La determinación constante de nuevas estructuras ha conducido a la construcción de grandes bases de datos de dominio público disponibles en la web.

La base de datos *Protein Data Bank* (PDB) es el repositorio de estructuras tridimensionales de macromoléculas por excelencia; a la fecha cuenta con más de 111.000 entradas<sup>23</sup> de las cuales aproximadamente el 90% son proteínas. Junto con las bases de datos de pequeñas moléculas como ZINC (Irwin et al., 2012) y DUD-E (Mysinger et al., 2012) se encuentran entre las herramientas online más valiosas para aquellos científicos que desean iniciar un proyecto de descubrimiento de fármacos basado en la estructura ya que les permiten planificar y validar sus experimentos fácilmente. No hay que dejar de mencionar que actualmente se dispone de varias alternativas de bases de datos tanto de macromoléculas como de ligandos (Bellera et al., 2015) así como también de herramientas computacionales online para obtener estructuras tridimensionales de aquellas macromoléculas que no han sido determinadas experimentalmente (Bordoli et al., 2009; Sliwoski et al., 2014).

Las metodologías basadas en el receptor consisten en simular las interacciones que se producen durante el evento de reconocimiento ligando-blanco molecular (*Docking*) depositando especial atención a los estados energéticos de los complejos formados. Se estudian las distintas poses que puede adquirir un ligando dentro del sitio activo y se caracterizan los complejos en función de la energía libre del sistema (Sousa et al., 2006). En términos generales consisten en tres pasos fundamentales: **a)** generación de un modelo molecular del receptor a partir de la estructura obtenida por rayos X, RMN o por modelado por homología; **b)** pretratamiento y muestreo conformacional de los ligandos y; **c)** formación de los complejos ligando-receptor y evaluación de los mismos en términos de su energía libre de unión (Ma et al., 2013).

Si bien las técnicas de simulación del acoplamiento ligando receptor se presentan como las más atractivas desde el punto de vista gráfico, las mismas muestran tres grandes limitaciones. La primera de ellas es de carácter coyuntural y tiene que ver con que la mayoría de las estructuras proteicas disponibles corresponden a proteínas solubles dada la dificultad intrínseca ligada a la obtención de proteínas de membrana y transmembrana como canales iónicos, transportadores de eflujo, etc. (Talevi et al., 2011; Seddon et al., 2004; Lin & Guidotti, 2009; Macher & Yen, 2007; Caffrey, 2003). La segunda limitación responde al alto costo computacional

---

<sup>23</sup> [www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do](http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do)

de la técnica ya que es prácticamente imposible evaluar una gran cantidad de conformaciones de los ligandos cuando se trabaja con grandes bases de datos, en otras palabras, la metodología no permite analizar una gran cantidad de moléculas en un corto periodo de tiempo.

Finalmente, la exactitud de las predicciones del docking es altamente dependiente del blanco molecular (Paulsen & Anderson, 2009); la limitada exactitud de los programas de docking tiene su origen en las relativamente simples funciones de scoring, que no logran reflejar completamente los fenómenos de desolvatación y reorganización del receptor y no capturan adecuadamente los factores entrópicos (Deng et al., 2015). La mayor parte de las funciones de *scoring* no consiguen modelar la unión de inhibidores covalentes ni iones (Mihășan, 2012). Todas estas limitaciones redundan en una alta tasa de falsos positivos (Ferreira et al., 2010).

**Técnicas basadas en el ligando.** El cribado virtual mediante metodologías basadas en el ligando implica el análisis de estructuras químicas de las que se conoce su capacidad para interactuar con un blanco molecular de interés. Estas moléculas son caracterizadas a través de la representación tridimensional (3D) y en el plano (2D) de sus fórmulas químicas y consideradas como un conjunto estructural de referencia a partir del cual se infieren características estructurales determinantes de la actividad biológica. Las técnicas basadas en ligandos son considerados abordajes indirectos dado que no es necesario conocer las características estructurales del blanco molecular de interés (Sliwoski, 2014).

Entre las distintas metodologías de cribado virtual basadas en el ligando pueden distinguirse tres grandes grupos: **1)** Abordajes basados en farmacóforos, **2)** Metodologías basadas en la similitud química y, **3)** Enfoques basados en descriptores moleculares (Talevi et al., 2011).

**1)** Un **farmacóforo** es un arreglo tridimensional de ciertas características moleculares esenciales para que una sustancia presente una determinada actividad biológica. La IUPAC lo define como un conjunto de propiedades estéricas y electrónicas necesarias para asegurar las interacciones supramoleculares óptimas con un blanco biológico específico y para activar (o bloquear) su respuesta (Wermuth et al., 1998).

Más allá de que aquí se presenten a los modelos farmacofóricos como aproximaciones basadas en el ligando, los mismos cuentan con la versatilidad de poder ser abordados desde ambas perspectivas (receptor y ligando). La estrategia basada en el ligando consiste en superponer un conjunto de moléculas que comparten determinada actividad con el objetivo de extraer aquellas propiedades químicas comunes que se presentan como esenciales para manifestar dicha actividad, en tanto que la perspectiva basada en el receptor propone encontrar

posibles puntos de interacción entre el blanco molecular y los ligandos (Yang, 2010).

El modelado farmacofórico basado en el blanco molecular puede a su vez dividirse en dos sub-categorías: **a)** modelado basado en complejos ligando-receptor y, **b)** basado en receptores sin ligandos. La sub-categoría **a)** es conveniente para localizar e identificar las interacciones más relevantes del proceso de reconocimiento droga-receptor, sin embargo la técnica no es útil cuando no se conocen ligandos que interaccionen con el sitio de unión de interés, cuestión que puede ser superada con la estrategia **b)**, la cual mediante distintos métodos de mapeo del sitio activo detecta propiedades farmacofóricas catalíticas tales como grupos aceptores/ dadores de puentes de hidrógeno y características hidrofóbicas. Estas características son utilizadas posteriormente como criterio (hipótesis) para identificar ligandos almacenados en grandes bases de datos que interaccionen potencialmente con el blanco molecular de interés (Yang, 2010).

La principal limitación de los modelos farmacofóricos basados en receptores es que las hipótesis resultantes generalmente son un conjunto numeroso de propiedades químicas sin orden de importancia relativa, cuya aplicación sobre grandes bases de datos es dificultosa y poco práctica (Yang, 2010).

El modelado farmacofórico basado en el ligando supone una estrategia computacional clave cuando no se dispone de la estructura del blanco molecular. Como se mencionó más arriba, la misma consiste en extraer características tridimensionales comunes de un conjunto de moléculas que comparten la misma actividad biológica denominado conjunto de entrenamiento o de calibración. La generación de hipótesis farmacofóricas basadas en múltiples ligandos comprende dos etapas principales: crear el espacio conformacional para cada uno de los ligandos del conjunto de entrenamiento de manera de representar la flexibilidad de cada uno de ellos y, alinear las moléculas en aquella conformación que resulte en la superposición geométrica de la mayor cantidad de propiedades importantes para la actividad biológica (Wolber et al., 2008). La flexibilización conformacional de los ligandos y el alineamiento molecular son al mismo tiempo la base de la técnica y sus principales dificultades.

Muchos programas informáticos son capaces de llevar a cabo automáticamente estas tareas entre los que se pueden mencionar a HipHop (Barnum et al., 1996), HypoGen (Li et al., 2000), GALHAD<sup>24</sup> y MOE<sup>25</sup>. Estos programas difieren esencialmente en el algoritmo que utilizan para flexibilizar los ligandos y alinear las moléculas (Yang, 2010).

---

<sup>24</sup> Tripos Inc., <http://www.tripos.com>

<sup>25</sup> Chemical Computing Group, <http://www.chemcomp.com>

La etapa de alineamiento resulta ser la más costosa computacionalmente y la que representa un mayor desafío a la hora de diseñar algoritmos. Algunos métodos de alineamiento incorporan algoritmos donde el tiempo de cómputo crece exponencialmente con el número de propiedades analizadas (Patel et al., 2002), lo que limita la posibilidad de utilizar las hipótesis sobre grandes bases de datos y acota su campo de aplicación, con el equipamiento computacional actual, a moléculas pequeñas y propiedades químicas simples (Wolber et al., 2008).

En conclusión, pese a que el concepto de farmacóforo es una de las propuestas intelectuales más sólidas que ha aportado la química medicinal, aun no es posible implementarla en todo su potencial dada su baja eficiencia en términos de tiempo consumido y su alto costo computacional (Yang, 2010).

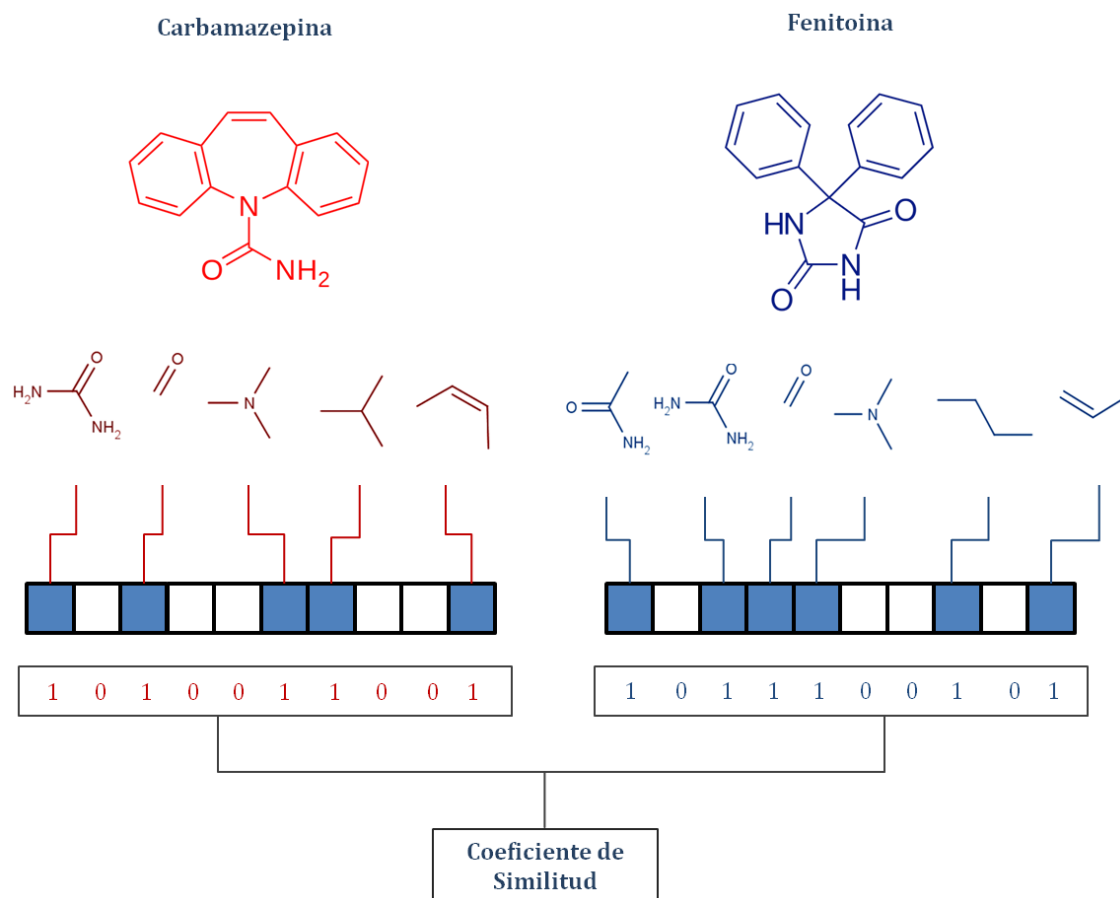
**2)** Una de las premisas centrales de la química medicinal establece que moléculas estructuralmente similares tendrán actividades biológicas similares (Martin et al., 2002). Aunque este enunciado aparenta ser bastante simple, es metodológicamente muy difícil de reflejar, básicamente por la dificultad para definir clara y consistentemente el criterio de similitud molecular (Maggiore et al., 2014).

Para construir medidas computacionales de similitud molecular se requieren tres elementos básicos: **a)** una representación de la estructura cuyos componentes codifiquen las propiedades moleculares y/o químicas relevantes para la evaluación de similitud; **b)** elementos de ponderación de las propiedades relevantes y; **c)** una función de similitud (coeficiente de similitud) que combine la información contenida en la representación y devuelva un valor de similitud apropiado. Este valor por lo general oscila entre 0 y 1, siendo 1 el resultado para moléculas idénticas y 0 para entidades totalmente disimiles (Willet, 2006).

La comparación cuantitativa entre dos moléculas habitualmente se basa en cotejar secuencias de bits derivadas de las estructuras a comparar (Figura 4). En tal secuencia (denominada *fingerprint* o huella dactilar) cada bit indica la presencia o ausencia de una propiedad estructural determinada, normalmente una subestructura, pudiendo ser estas últimas de naturaleza 3D o 2D. Alternativamente, los bits pueden indicar la frecuencia con la que aparece la propiedad en las moléculas comparadas. Los bits compartidos por ambas moléculas son cuantificados y transformados en un valor que indica cuán similares son dichas estructuras; este valor se conoce como coeficiente de similitud (Maggiore, 2014).

Durante una campaña de cribado virtual las comparaciones por similitud permiten ordenar las moléculas contenidas en grandes bases de datos de compuestos según un orden decreciente de similitud con respecto a una molécula activa de

referencia, de manera que se establece un ranking en el cual los primeros lugares son ocupados por las moléculas más similares a la referencia (Girschick et al., 2013; Hert et al., 2004).



**Figura 4 |** Esquema del proceso de comparación de dos moléculas por medio de un coeficiente de similitud.

Entre las ventajas que presentan las técnicas de cribado virtual por similitud puede citarse su bajo costo computacional, lo que permite procesar grandes bases de datos en un corto periodo de tiempo. Además las búsquedas pueden realizarse incluso utilizando una sola molécula como referencia, hecho que es especialmente valioso en aquellos casos en los que, para un blanco molecular novedoso, se disponen de pocos ligandos conocidos, de manera que resultan insuficientes para llevar a cabo un análisis QSAR (Di Ianni et al., 2015; Willet, 2006).

**3)** Los enfoques basados en descriptores dependen de la representación numérica de diferentes aspectos de la estructura molecular, denominados descriptores moleculares. A través de estas técnicas, se trata de hallar correlaciones significativas, mediante metodologías estadísticas, entre tales descriptores moleculares (variables independientes) y una propiedad biológica de interés (variable dependiente). Estas relaciones se denominan Relaciones Cuantitativas

Estructura Actividad (QSAR, del inglés *Quantitative Structure Activity Relationships*) (Talevi, 2011). Para referirse a las relaciones existentes entre las propiedades fisicoquímicas y la estructura de las moléculas se utiliza el acrónimo QSPR, del inglés *Quantitative Structure Property Relationships* (Tikhonova et al., 2004).

La definición formal de descriptor molecular establece que los mismos son el resultado final de un procedimiento lógico-matemático que transforma la información química codificada en la representación de la estructura de una molécula en un número o en el resultado de algún experimento estandarizado (Todeschini & Consonni, 2009). En otras palabras, un descriptor molecular es una variable numérica que refleja o codifica algún aspecto estructural de la molécula en estudio, como por ejemplo su hidrofobicidad, características estéricas y electrónicas, etc.

La observación de que la estructura química de las sustancias determina sus propiedades fisicoquímicas se remonta al siglo XIX cuando el químico ruso Dimitri Mendeléyev plasmó el patrón subyacente de los elementos químicos en lo que hoy se conoce como tabla periódica de los elementos (Todeschini & Consonni, 2000). Casi en simultáneo con Mendeleýev, en 1868, Crum-Brown & Frazer introdujeron la idea de que la actividad de un compuesto determinado es función de su estructura química tras observar que la potencia narcótica de determinados alcaloides era inversamente proporcional a su solubilidad en agua (Brown & Fraser, 1868). Esta línea de pensamiento fue rápidamente reforzada por experimentos similares con resultados consistentes con los obtenidos por Crum-Brown & Frazer (Richardson, 1869; Richet, 1893; Meyer, 1899; Overton, 1901; Kunal & Indrani, 2011).

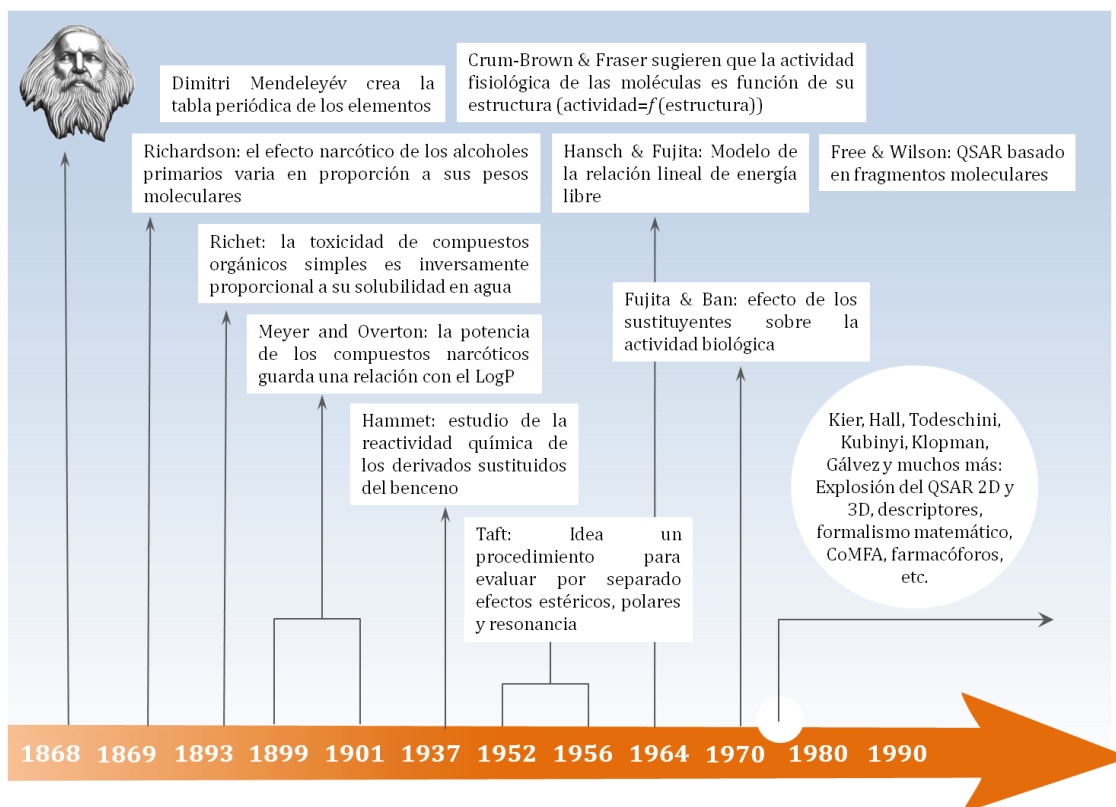
Promediando los años 1930 se produjo un gran avance en el entendimiento de la química orgánica: Hammett presenta una ecuación que relaciona de manera cuantitativa la influencia de diversos sustituyentes sobre las constantes de disociación de ácidos aromáticos utilizando los parámetros  $\rho$  (la constante de reacción, característica de cada reacción, indica la susceptibilidad de la misma a sustituyentes polares) y  $\sigma$  (la constante electrónica de Hammett, depende únicamente de la naturaleza de los sustituyentes e indica el efecto de los mismos sobre la constante de disociación en relación al efecto del hidrógeno) (Todeschini & Consonni, 2000).

La propuesta de Hammett colocó la temática al borde de un umbral; químicamente hablando, la colocó en un estado de sobre-saturación: Bastó con el agregado de una partícula de conocimiento para que precipite lo que hoy conocemos como QSAR.

Tal aporte se atribuye a la observación de Hansch y colaboradores sobre la correlación existente entre la actividad regulatoria del crecimiento de plantas de los ácidos fenoxi-acéticos y las constantes de Hammett, y a la introducción de la constante  $\pi$  de Hansch, la cual relaciona la influencia de los sustituyentes sobre el logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua (Hansch et al., 1962).

Hansch y Fujita demostraron que la actividad biológica se correlaciona de manera lineal con términos relacionados a la energía libre, creando lo que se conocen como modelos de relaciones lineales de energía libre que, junto con modelos parabólicos desarrollados por el mismo Hansch, tuvieron un impacto considerable sobre el entendimiento de cómo la estructura química influye sobre la actividad biológica (Kunal & Indrani, 2011; Hansch & Fujita, 1964). Posteriormente, Free y Wilson presentaron una alternativa a los modelos basados en contribuciones electrónicas y estéricas que proponía que la ausencia o presencia de un sustituyente dado ejercía un efecto constante y aditivo sobre la actividad biológica, independientemente de la presencia o ausencia de algún otro sustituyente en el resto de la molécula (Free & Wilson, 1964).

Fujita y Ban introdujeron una modificación al método de Free-Wilson estableciendo que la contribución de cada sustituyente a la actividad biológica debe expresarse en relación a una estructura de referencia no sustituida (Fujita & Ban, 1971). En la figura 5 se muestra una línea de tiempo de los acontecimientos históricos en el desarrollo del QSAR.



**Figura 5 |** Hitos históricos en el desarrollo del QSAR

Retomando con las técnicas de cribado virtual basadas en descriptores, la dimensionalidad de estos últimos va a definir la clase del método utilizado: QSAR-0D, QSAR-1D, QSAR-2D, QSAR-3D, QSAR-4D, QSAR-5D y QSAR-6D. Esta dimensionalidad no se corresponde con el concepto matemático, pero es utilizado como una nomenclatura sencilla basada en las distintas categorías de descriptores involucrados en cada caso (Kunal & Indrani, 2011).

**QSAR-0D:** se basa en descriptores derivados de la fórmula molecular como el peso molecular, número y tipo de átomos, suma de propiedades atómicas, etc. (Andrade et al., 2010).

**QSAR-1D:** estos estudios normalmente explican de manera global la relación entre propiedades fisicoquímicas simples, como la solubilidad, el valor de pKa o el coeficiente de partición de las moléculas y la actividad biológica (Lill, 2007; Kuzmin et al., 2005).

**QSAR-2D:** correlacionan la actividad con patrones estructurales de las moléculas, teniendo en consideración la topología de las mismas. Cuando se habla de topología molecular es en referencia a la consideración de la molécula como un conjunto de vértices (los átomos) unidos por aristas (los enlaces) denominado grafo (Pogliani, 2000). La información que puede extraerse con esta metodología es por demás variada y va desde índices de conectividad molecular sencillos hasta



complejos cálculos vectoriales realizados sobre matrices construidas a partir de los grafos (Todeschini & Consonni, 2000).

El grupo de topología molecular de la universidad de Valencia ha elaborado revisiones de aplicaciones exitosas de descriptores topológicos a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de diversas categorías: antivirales, antibióticos, agentes antineoplásicos, hipoglucemiantes entre muchos otros (Zanni, et al., 2015; García-Doménech et al., 2008).

**QSAR-3D:** aborda la orientación de las moléculas en el espacio y sus modelos operan con descriptores relacionados con (derivados de) la disposición tridimensional de las mismas. Esta metodología adquiere carácter predictivo cuando es posible diferenciar sin ambigüedades la conformación activa de orientaciones espaciales relacionadas (Kunal & Indrani, 2011). Entre las técnicas 3D más populares encontramos el análisis de campo molecular comparativo (CoMFA, Comparative Molecular Field Analysis) (Cramer et al., 1988) y el análisis comparativo de índices de similitud molecular (CoMSIA, Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) (Klebe et al., 1994).

Estas técnicas implican la interacción de las moléculas dispuestas en una grilla con átomos de prueba específicos cuando el sistema es sometido a la influencia de distintos campos de fuerza, determinándose las componentes estéricas, hidrofóbicas y electrostáticas de las interacciones observadas. Entre otras alternativas para análisis QSAR-3D se pueden mencionar los descriptores MoRSE, RDF, WHIM, etc. (Todeschini et al., 1994; Sliwoski et al., 2014).

**QSAR-4D:** esta metodología utiliza la estrategia de alineamiento pero expandiendo las variedades espaciales y moleculares de cada molécula. Además de considerar distintas conformaciones incorpora tautómeros, estereoisómeros y los distintos estados de protonación (Ekins et al., 2000; Vedani et al., 2000; Hopfinger et al., 1997; Pan et al., 2003).

En esencia la metodología 4D es similar a la 3D pero con la diferencia que se trabaja con un gran conjunto de conformaciones (1000 o más) y estados moleculares estructuralmente similares (Andrade et al., 2010).

**QSAR-5D:** esta técnica fue desarrollada para estudiar qué características deben tener los ligandos para desempeñarse más favorablemente durante el proceso de reconocimiento droga-receptor, de manera que se simulan distintos escenarios posibles, tomando como sitio activo un arreglo estructural ideal derivado de las moléculas del conjunto de entrenamiento. A través de distintos protocolos se evalúan parámetros estéricos, potencial lipofílico, puentes de hidrógeno, etc., que

hagan energéticamente más favorable el proceso de reconocimiento (Vedani & Dobler, 2000).

**QSAR 6D:** conceptualmente similar al QSAR-5D; el QSAR-6D introduce consideraciones de los estados de solvatación de los ligandos por lo que permite considerar el efecto del entorno (solvente) en el proceso de interacción (Polanski, 2009). En otras palabras, la importancia de la “sexta dimensión” permite estudiar de manera más realista las interacciones no covalentes entre la droga y el receptor ya que las mismas se encuentran fuertemente influenciadas por el entorno (Damale et al., 2014).

El sistema de clasificación basado en dimensiones propone implícitamente que existen dos clases de descriptores, los independientes de la conformación espacial (0D, 1D y 2D) y los dependientes de la misma (3D, 4D, 5D y 6D). Acorde con lo detallado arriba, las metodologías de baja dimensionalidad (0-2D) brindan la posibilidad de llevar a cabo estudios QSAR de manera mucho más rápida y con un menor costo computacional que las de mayor dimensionalidad (3-6D) dado que los primeros no requieren un procesamiento previo del espacio conformacional. La cantidad de moléculas utilizadas en una campaña de cribado virtual puede tornarse muy difícil de abordar conformacionalmente, incluso imposible si consideramos que debemos analizar el conjunto de entrenamiento, el de validación y la base de datos sobre la cual se quieren aplicar los modelos (Myint & Xie, 2010). Para superar esta brecha se ha propuesto que la mejor alternativa es la combinación de técnicas de distintas dimensionalidad, actuando las más veloces como filtro inicial, y las más costosas computacionalmente como una herramienta para refinar la selección de candidatos que pasan a ensayos *in vitro* e *in vivo*. La estrategia ha sido denominada cribado virtual secuencial, jerárquico o en cascada (Talevi et al., 2009; Drwal & Griffith, 2013; Kumar & Zhang, 2015).

A continuación y para dar cierre a este capítulo, se presentan los distintos enfoques que plantea la química medicinal para abordar el problema de la epilepsia refractaria mediada por P-gp. Una buena exposición sobre los esfuerzos químico-medicinales para abordar farmacológicamente la epilepsia puede encontrarse en el capítulo de Gavernet et al. en el libro “*Recent Trends on QSAR in the Pharmaceutical Perceptions*” (Gavernet et al., 2012).

## **Desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia refractaria**

Las estrategias generales estudiadas en los últimos 15 años para hacer frente al problema planteado por los transportadores ABC pueden ubicarse en una de las siguientes categorías: **a)** modulación de los transportadores (por ejemplo inhibición

y regulación hacia abajo); **b)** diseño de nuevas drogas que no sean sustrato de los transportadores y; **c)** la estrategia del caballo de Troya, eludiendo al transportador (Talevi & Bruno-Blanch, 2012).

La primera estrategia se refiere a la administración conjunta de fármacos antiepilépticos e inhibidores o moduladores de la P-gp. Este tópico ya fue discutido con nivel de detalle en el capítulo III de esta tesis, mencionando que al poseer la P-gp un rol fisiológico, esta estrategia ha tomado el carácter de poco factible para ser utilizada en el contexto de una patología crónica (Callahan et al., 2014). De hecho, la regulación hacia abajo de P-gp se ha asociado a trastornos crónicos tales como la enfermedad de Alzheimer; como ejemplo, se ha demostrado que en pacientes sanos de edad avanzada la acumulación cerebral de placas  $\beta$ -amiloide es inversamente proporcional al nivel de expresión de P-gp. De tal manera, se ha sugerido que la alteración en la función y expresión de P-gp a nivel de los capilares cerebrales, puede alterar el aclaramiento de placas  $\beta$ -amiloide, aumentando o disminuyendo su eliminación hacia el torrente sanguíneo (Vogelgesang et al., 2002; Talevi & Bruno Blanch, 2012).

La segunda estrategia se presenta como una alternativa para posicionar fármacos en el sistema nervioso central sin los trastornos asociados a la inhibición crónica de los transportadores de eflujo. La misma consiste en el desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivos que no sean reconocidos por la P-gp (no sustratos) a través de diseño asistido por computadoras y campañas de cribado virtual (Demel et al., 2008; Demel et al., 2009).

A la fecha, la mayoría de los modelos desarrollados para reconocimiento de sustratos de la P-gp son o bien hipótesis farmacofóricas o modelos QSAR que incluyen descriptores moleculares 3D con pocas excepciones: el trabajo de Huang et al., (Huang et al., 2007) y de Cabrera et al., (Cabrera et al., 2006), quienes reportaron modelos para identificar sustratos de la P-gp basados en descriptores constitucionales (0D) y topológicos (2D), respectivamente. En la revisión de Chen et al., se hace referencia a los modelos mencionados arriba incluyendo algunas aproximaciones basadas en análisis de similitud (Chen et al., 2012).

La última de las tres estrategias, que cae fuera del campo inmediato de la química medicinal para internarse en el ámbito de la Tecnología Farmacéutica, implica la encapsulación de fármacos sustratos de P-gp en vehículos farmacéuticos particulados que logren esconder el fármaco de la P-gp y que lo liberen una vez que llega al sitio de acción<sup>26</sup>. Para esto han sido testeados distintos sistemas de

---

<sup>26</sup> Estrategia denominada Caballo de Troya en analogía al relato mitológico que narra cómo un grupo de soldados griegos lograron filtrarse en la ciudad amurallada de Troya escondidos dentro de un caballo de madera gigante, que los propios troyanos introdujeron en la ciudad creyendo que era un trofeo de guerra.

transporte que permitan aumentar la biodisponibilidad del fármaco en el cerebro, entre los que destacan los nanosistemas (nano-partículas poliméricas, nano-geles, nano-cápsulas lipídicas, liposomas) (Bansal et al., 2009; Patel et al., 2009; Bennewitz & Saltzman, 2009; et al., 2010). Los estudios realizados sobre animales de laboratorio utilizando esta estrategia han demostrado que se puede mejorar la concentración de fármacos antiepilépticos en el cerebro formulándolos en distintos sistemas de transporte (Talevi & Bruno-Blanch, 2013).

En el presente trabajo de tesis se ha optado por utilizar la segunda estrategia a través del desarrollo de modelos computacionales basados en descriptores de baja dimensionalidad capaces de identificar potenciales sustratos de P-gp al explorar grandes bases de datos de compuestos orgánicos. Estas bases de datos serán previamente filtradas por una función capaz de identificar sustancias activas al ensayo MES (Talevi et al., 2007).

Los modelos que mejor se desempeñen en las instancias de validación serán aplicados de manera conjunta bajo la siguiente premisa: dado los múltiples sitios de unión a sustratos de la cavidad poli-específica de la P-gp, sería muy difícil obtener un modelo individual que describa a la variedad de sustratos transportados por la P-gp, por lo que la aplicación de un conjunto de modelos (aprendizaje por ensamblado) se impone como una alternativa más apta para este problema, como recientemente lo han subrayado Chen y col. (Chen et al., 2012).

Ya se mencionó que las ventajas de los métodos basados en descriptores de baja dimensionalidad (0D-2D) radican en que la independencia de la conformación espacial permite acortar notablemente los tiempos empleados (y bajar el costo computacional) para el desarrollo de los modelos y especialmente para su aplicación en campañas de CV, dado que no se requiere un procesamiento conformacional previo de las estructuras del conjunto de entrenamiento, del conjunto de prueba y de la base de datos a filtrar.

Entre las desventajas de estas técnicas aparece su carácter de caja negra. En ocasiones la complejidad y naturaleza abstracta de los descriptores (especialmente los topológicos) no dan lugar a la interpretación biológica del proceso de reconocimiento fármaco-receptor, aspecto para destacar de las metodologías 3-6D, que sí lo hacen. En otras palabras, estos modelos, muchas veces no están sujetos a interpretación y deben utilizarse como un criterio ciego de categorización de los compuestos orgánicos, en este caso, sustratos y no sustratos de P-gp. Por otra parte, es imposible para un descriptor independiente de la conformación diferenciar isómeros de geometría; sabemos, sin embargo, que las propiedades fisicoquímicas y biológicas de éstos pueden ser muy distintas.

Cerrado el bloque introductorio, en el próximo capítulo se detalla el procedimiento llevado a cabo para hallar los modelos computacionales mencionados.

## REFERENCIAS

Alagarsamy V. Introduction to Medicinal Chemistry. En: Textbook of Medicinal Chemistry, p1. Elsevier. (2010).

Alam M., Beg S., Samad A., Baboota S., Kohli K., Ali J., et al. Strategy for effective brain drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **40**: 385–403. (2010).

Andrade C., Pasqualoto K., Ferreira E., Hopfinger A. 4D-QSAR: Perspectives in drug design. *Molecules*, **15**(5): 3281–3294. (2010).

Bambini S., & Rappuoli R. The use of genomics in microbial vaccine development. *Drug Discovery Today*, **14**: 252–260. (2009).

Bansal T., Akhtar N., Jaggi M., Khar R., Talegaonkar S. Novel formulation approaches for optimizing delivery of anticancer drugs based on P-glycoprotein modulation. *Drug Discovery Today*, **14**: 1067–1074. (2009).

Barnum D., et al. Identification of common functional configurations among molecules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **36**: 563–571. (1996).

Baycoucheva S. A new era in chemical information: PubChem, DiscoveryGate, and chemistry central. *Online (Wilton, Connecticut)*. **31**: 16–20. (2007).

Bellera C., Di Ianni M., Sbaraglini M., Castro E., Bruno-Blanch L., Talevi A. Knowledge-Based Drug Repurposing: A Rational Approach Towards the Identification of Novel Medical Applications of Known Drugs. En: *Frontiers in Computational Chemistry*. Qami & Madura (Eds.). Bentham Science Publishers. E.A.U. (2015).

Bennewitz M., & Saltzman W. Nanotechnology for delivery of drugs to the brain for epilepsy. *Neurotherapeutics*, **6**: 323–336. (2009).

Binetti R., Costamagna F., Marcello I. Exponential growth of new chemicals and evolution of information relevant to risk control. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. **44**, 13-15. (2008).

Bordoli L., Kiefer F., Arnold K., Benkert P., Battey J., Schwede T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*, **4**: 1–13. (2009).

Brown C., & Fraser T. On the connection between chemical constitution and physiological action I. On the physiological action of the salts of the ammonium bases, derived from strychnia, brucia, thebaia, codeia, morphia, and nicotia. *Journal of Anatomy and Physiology*, **2**(2): 224–242. (1868).

Burguer A. The practice of medicinal Chemistry. En: Medicinal Chemistry, Burguer A., ed. Wiley. New York. pp: 4–9. (1970).

Cabrera M., et al. A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **95**: 589–606 (2006).

Caffrey M. Membrane protein crystallization. *Journal of Structural Biology*, **142**(1):108–132. (2003).

Callahan R., Luk F., Bebawy M. Inhibition of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein: Time for a Change of Strategy? *Drug Metabolism and Disposition*, **42**: 623–631. (2014).

Chen L., Li Y., Yu H., Zhang L., Hou T. Computational models for predicting substrates or inhibitors of P-glycoprotein. *Drug Discovery Today*, **17**:343–351. (2012).

Chufan E., Sim H., Ambudkar S. Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies. *Advanced Cancer Research*, **125**: 71–96. (2015).

Claude N. Reducing the use of laboratory animals. *Bulletin d' le Academie Nationale de Medecine*, **193**: 1767–1772. (2009).

Cramer R., Patterson D., Bunce J. Comparative molecular field analysis (CoMFA). Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of American Chemical Society*, **110**(18): 5959. (1988).

Damale M., Harke S., Khan F., Shinde D., Sangshetti J. Recent advances in multidimensional QSAR (4D-6D): A critical review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **14** (1): 35–55. (2014).

Demel M., Krämer O., Ettmayer P., Haaksma E., Ecker G. Predicting ligand interactions with ABC transporters in ADME. *Chemical Biodiversity*, **6**:1960–1969. (2009).

Demel M., Schwaha R., Krämer O., Ettmayer P., Haaksma E., Ecker G. In silico prediction of substrate properties for ABC-muldrug transporters. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, **4**: 1167–1180. (2008).

Deng N., Forli S., He P., Perryman A., Wickstrom L., Vijayan R., Levy R. Distinguishing Binders from False Positives by Free Energy Calculations: Fragment Screening Against the Flap Site of HIV Protease. *The Journal of Physical Chemistry. B*, **119**(3): 976–988. (2015).

Di Ianni M., Gantner M., Ruiz M., Castro E., Bruno-Blanch L., Talevi A. Systematic Comparison of the Performance of Different 2D and 3D Ligand-Based Virtual Screening Methodologies to Discover Anticonvulsant Drugs. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, **18**(4): 387–398. (2015).

Drwal M., & Griffith R. Combination of ligand- and structurebased methods in virtual screening. *Drug Discovery Today Technologies*, **10**(3): 395–401. (2013).

Ekins S., Bravi G., Binkley S., Gillespie J., Ring B., Wikel J., Wrighton S. Three- and four-dimensional-quantitative structure activity relationship (3D/4D-QSAR) analyses of CYP2C9 inhibitors. *Drug Metabolism and Dispositions*, **28**(8): 994–1002. (2000).

Ferreira S., Simeonov A., Jadhav A., Eidam O., Mott B., Keiser M., McKerrow J., Maloney D., Irwin J., Shoichet B. Complementarity Between a Docking and a High-Throughput Screen in Discovering New Cruzain Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**(13): 4891–4905. (2010).

Ferri N., Siegl P., Corsini A., Herrmann J., Lerman A., Benghozi R. Drug attrition during preclinical and clinical development: understanding and managing drug-induced cardiotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, **138**: 470–484. (2013).

Fischer E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **27**: 2985–2993. (1894).

Free S., Wilson J. A mathematical contribution to structureactivity studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, **7**(4): 395–399. (1964).

Fromm M. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences*, **25**: 423–429. (2004).

Fujita T., & Ban T. Structure-activity study of phenethylamines as substrates of biosynthetic enzymes of sympathetic transmitters. *Journal of Medicinal Chemistry*, **14**(2): 148–152. (1971).

García-Doménech R., Gálvez J., de Julián Ortiz J., & Pogliani I. Some new trends in chemical graph theory. *Chemical Reviews*, **108**(3): 1127–1169. (2008).

Gavernet L., Talevi A., & Bruno Blanch L. Computer-Based Strategies Towards the Discovery of New Antiepileptic Agents. En: *Recent Trends on QSAR in the Pharmaceutical Perceptions*, Ed. Khan M. Bentham Science, pp: 99–118. (2012).

Girschick T., Puchbauer L., Kramer S. Improving structural similarity based virtual screening using background knowledge. *Journal of Cheminformatics*, **5**: 50. (2013).

Grzybowski, B.A., Bishop, K.J.M., Kowalczyk B., Wilmer C. The 'wired' universe of organic chemistry. *Nature Chemistry*, **1** (1): 31–36. (2009).

Hansch C., & Fujita, T.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of American Chemical Society*, **186**(8): 1616–1626. (1964).

Hansch C., Maloney P., Fujita T., Muir R. Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients. *Nature*, **194**(4824), 178–180. (1962).

Hert J., Willett P., Wilton D., Acklin P., Azzaoui K., Jacoby E., Schuffenhauer A. Comparison of fingerprint-based methods for virtual screening using multiple bioactive reference structures. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **44**: 1177–1185. (2004).

Hop C., et al. High Throughput ADME Screening: Practical Considerations, Impact on the Portfolio and Enabler of In Silico ADME Models. *Current Drug Metabolism*, **9**: 1389–2002. (2008).

Hopfinger A., Wang S., John Tokarski S., Jin B., Albuquerque M., Madhav P., Duraiswami C. Construction of 3D-QSAR models using the 4D-QSAR analysis formalism. *Journal of American Chemical Society*, **119**(43): 10509–10524. (1997).

Huang J., et al. Identifying P-glycoprotein substrates using a support vector machine optimized by a particle swarm. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **47**: 1638–1647. (2007).



Irwin J., Sterling T., Mysinger M., Bolstad E., Coleman R. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **52**: 1757–1768. (2012).

Kell D. Finding novel pharmaceuticals in the systems biology era using multiple effective drug targets, phenotypic screening and knowledge of transporters: where drug discovery went wrong and how to fix it. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, **280**: 5957-5980. (2013).

Klebe G., Abraham U., Mietzner T. Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict their Biological Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **37**: 4130–4146. (1994).

Kola I., & Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**: 711–716. (2004).

Kubinyi H. The design of combinatorial libraries. *Drug Discovery Today*, **7**(9): 503–504. (2002).

Kumar A., & Zhang K. Hierarchical virtual screening approaches in small molecule drug discovery. *Methods*, **21**: 26–37. (2015).

Kunal R., & Indrani M. On Various Metrics Used for Validation of Predictive QSAR Models with Applications in Virtual Screening and Focused Library Design. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **14**: 450–474. (2011).

Kuzmin V., Artemenko A., Polischuk P., Muratov E., Hromov A., Liahovskiy A., Andronati S., Makan S. Hierarchic system of QSAR models (1D–4D) on the base of simplex representation of molecular structure. *Journal of Molecular Modeling*, **11**(6): 457–467. (2005).

Law V., Knox C., Djoumbou Y., Jewison T., Guo A., Liu Y., Maciejewski A., Arndt D., Wilson M., Neveu V., Tang A., Gabriel G., Ly C., Adamjee S., Dame Z., Han B., Zhou Y., Wishart D. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Research*, **42**: D1091–1097. (2014).

Lemmen C., & Lengauer T. Computational methods for the structural alignment of molecules. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, **14**(3): 215–232. (2000).

Li, H. et al. (2000) HypoGen: an automated system for generating 3D predictive pharmacophore models. En: Pharmacophore Perception, Development, and Use in Drug Design (Guner, O.F., ed.), pp. 171–189, International University Line. (2000).

- Lill M. Multi-dimensional QSAR in drug discovery. *Drug Discovery Today*, **12**(23-14): 1013–1017. (2007).
- Lin S., & Guidotti G. Chapter 35. Purification of membrane proteins. *Methods in Enzymology*, **463**: 619–629. (2009).
- Löscher W. Mechanisms of drug resistance. *Epileptic Disorders*, **7**: S3–S9. (2005a).
- Löscher W., Schmidt D. Drug resistance in Epilepsy, *Epilepsia*; **46**: 858–77. (2005b).
- Lundstrom K. Genomics and drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*, **3**: 1855–1858. (2011).
- Ma D., Chan D., Leung C. Drug repositioning by structure-based virtual screening. *Chemical Society Reviews*, **42**: 2130–2141. (2013).
- Macher B., & Yen T. Proteins at membrane surfaces – a review of approaches. *Molecular Biosystems*, **3**(10): 705–713. (2007).
- Maggiore G., Vogt M., Stumpfe D., Bajorath J. Molecular Similarity in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, **57**(8): 3186–3204. (2014).
- Martin Y., Kofron J., Traphagen L. Do Structurally Similar Molecules Have Similar Biological Activity? *Journal of Medicinal Chemistry*, **45** (19): 4350–4358. (2002).
- Mason W. Therapia Sterilisans Magna: The Dream, The Dreamers, The Challenge. *Journal of the National Medical Association*, **56**(2): 148–150. (1964).
- Mayr L., & Bojanic D. Novel trends in high-throughput screening. *Current Opinion in Pharmacology*. **9**: 580–588. (2009).
- Meyer H. *Archives of Experimental Pathology and Pharmacology*, **42**: 109–118. (1899).
- Muegge I., & Oloff S. Advances in virtual screening. *Drug Discovery Today Technologies*, **3**: 405–411. (2006).
- Mihășan M. What in silico molecular docking can do for the 'bench-working biologists. *Journal of Biosciences*, **37**(6): 1089–1095. (2012).
- Myint K., & Xie X. Recent advances in fragment-based QSAR and multi-dimensional QSAR methods. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 3846–3866. (2010).

Mysinger M., Carchia M., Irwin J., & Shoichet, B. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*, **55**(14): 6582–6594. (2012).

Nakanishi H., Yonezawa A., Matsubara K., Yano I. Impact of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the brain distribution of antiepileptic drugs in knockout mouse models. *European Journal of Pharmacology*, **710**(1–3): 20–28. (2013).

Overton C., *Studien Über die arkose*, Fischer, Jena, Germany. (1901).

Pan D., Tseng Y., Hopfinger A. Quantitative structure-based design: formalism and application of receptor-dependent RD-4DQSAR analysis to a set of glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **43**(5): 1591–1607. (2003).

Patel Y. et al. A comparison of the pharmacophore identification programs: catalyst, DISCO and GASP. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, **16**: 653–681. (2002).

Patel M., Goval B., Bhadada S., Bhatt J., Amin A. Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. *CNS Drugs*, **23**: 35–58. (2009).

Paulsen J., & Anderson A. Scoring Ensembles of Docked Protein: Ligand Interactions for Virtual Lead Optimization. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **49**(12): 2813. (2009).

Penzotti J., Lamb M., Evensen E., Grootenhuis P. A computational ensemble pharmacophore model for identifying substrates of P-glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**:1737–1740. (2002).

Pereira D., & Williams J. *British Journal of Pharmacology*, **152**: 53–61. (2007).

Pogliani L. From molecular connectivity indices to semiempirical connectivity terms: recent trends in graph theoretical descriptors. *Chemical Reviews*, **100**: 3827–3858. (2000).

Polanski J. Receptor Dependent Multidimensional QSAR for Modeling Drug - Receptor Interactions. *Current Medicinal Chemistry*, **6**(25):3243–3257. (2009).

Reddy A., Pati S., Kumar P., Pradeep H., Sastry G. Virtual screening in drug discovery a computational perspective. *Current Protein and Peptide Science*, **8**: 329–351. (2007).

Richardson B. Physiological research on alcohols. *Medical Times and Gazzette*, **2**: 703–706. (1869).

Richet C. On the relationship between the toxicity and the physical properties of substances. *Comptes Rendus Societe Biologies*, **5**(9): 775–776. (1893).

Schneider, G. & So S. “A conceptual framework”, en “*Adaptive systems in drug design*”. Schneider G., & So S., eds.), Landes Bioscience, Georgetown, Texas, Estados Unidos, págs. 3-31. (2002).

Schuster D., Laggner C., Langer T. Why drugs fail: a study on side effects in new chemical entities. *Current Pharmaceutical Design*, **11**(27): 3545–3559. (2005).

Seddon A., Curnow P., & Booth P. Membrane proteins, lipids and detergents: not just soap opera. *Biochimica et biophysica acta*, **1666**(1-2): 105–117. (2004).

Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe E. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, **66**(1): 334–395. (2014).

Sousa S., Fernandes P., Ramos M. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*. **65**: 15-26. (2006).

Talevi A., & Bruno-Blanch L. Efflux transporters at the blood–brain barrier: Therapeutic opportunities. En: *Blood–brain barrier: new research* Montenegro P., & Juárez S., eds. 1st ed. New York. Nova Science, p: 117–144. (2012).

Talevi A., Bellera C., Castro E., Bruno-Blanch L. A successful virtual screening application: prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *Journal of Computed Aided Molecular Design*, **21**: 527–538. (2007).

Talevi A., Bruno-Blanch L. On the development of new antiepileptic drugs for the treatment of pharmacoresistant epilepsy: different approaches to different hypothesis. In: *Pharmacoresistance in Epilepsy. From Genes and Molecules to Promising Therapies*, pp. 207-224. EA, R. L. C., Ed. Springer: New York. (2013).

Talevi A., Castro E., Bruno-Blanch L. Virtual Screening: An emergent, key methodology for drug development in an emergent continent – A bridge towards patentability. En: *Advanced Methods and Applications in Chemoinformatics*, E. A. Castro and A. K. Haghi (Eds.), Editorial IGI Global. pp. 229-245 (2011).

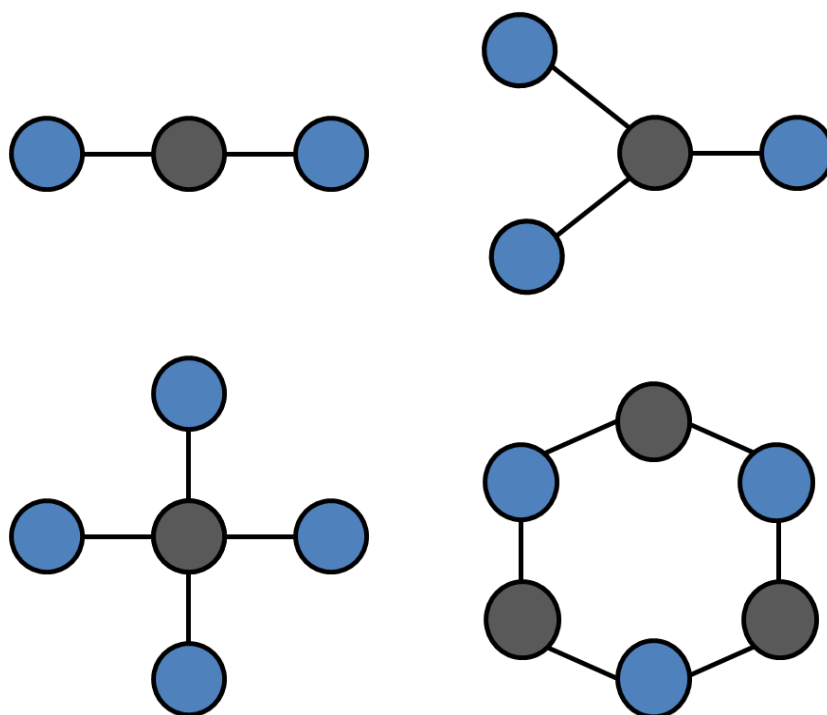
Talevi A., Gavernet L., Bruno-Blanch L. Combined virtual screening strategies. *Current Computer Aided Drug Design*, **5**(1): 23-37. (2009).

- Tikhonova I., Baskin I., Palyulin V., Zefirov N. Virtual screening of organic molecule databases. Design of focused libraries of potential ligands of NMDA and AMPA receptors. *Russian Chemical Bulletin*, **53**(6): 1335–1344. (2004).
- Todeschini R., & Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors*. Wiley-VCH: Weinheim. (2000).
- Todeschini R., & Consonni V. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. (2009).
- Todeschini R., Lasagni M., Marengo E. New molecular descriptors for 2D and 3D structures. Theory. *Journal of Chemometrics*, **8**(4): 263–272. (1994).
- Tropsha A., et al. QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To? *Journal of Medicinal Chemistry*, **57**(12): 4977–5010. (2014).
- Vedani A., & Dobler M. 5D-QSAR: the key for simulating induced fit? *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**(11): 2139–2149. (2000).
- Vedani A., Briem H., Dobler M., Dollinger H., Mc Masters D. Multiple-conformation and protonation-state representation in 4DQSAR: the neurokinin-1 receptor system. *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**(23): 4416–4427. (2000).
- Vogelgesang S., Cascorbi I., Schroeder E., Pahnke J., Kroemer H., Siegmund W., Kunert-Keil C., Walker L., Warzok R. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly nondemented humans. *Pharmacogenetics*, **12**: 535–541. (2012).
- Walker M., Barrett T., Guppy L. Functional pharmacology: the drug discovery bottleneck?. *Drug Discovery Today : Targets*, **5**: 208–2015. (2004).
- Wermuth C., Ganellin C, Lindberg P., & Mitscher L. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1997). *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **33**: 385–395. (1998).
- Willet P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discovery Today*, **11**(23-24): 1046–1053. (2006).
- Winau I., Westphal O., Winau R. Paul Ehrlich — in search of the magic bullet. *Microbes and Infection*, **6**(8): 786–789. (2004).

Wolber G., Seidel T., Bendix F., & Langer T. Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discovery Today*, **13**(1-2): 23–29. (2008).

Yang S. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. *Drug Discovery Today*, **15**: (11-12): 444–450. (2010).

Zanni R., Galvez-Llompарт M., García-Domenech R., Galvez J. Latest advances in molecular topology applications for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **10**(9): 945-957. (2015).



Distintos tipos de grafos. En topología molecular se utilizan como una representación simbólica donde los vértices son los átomos y las aristas los enlaces entre ellos. A partir de estos diagramas se pueden derivar una gran cantidad de descriptores moleculares y correlacionarlos exitosamente con la actividad biológica de las sustancias (*Expert Opinion on Drug Discovery*, **10**(9): 945-957. 2015).

“Cuando un hecho parece contradecir una extensa cadena de deducciones, invariablemente prueba que debe ser interpretado de otra manera”. Estudio en escarlata. Sir Arthur Conan Doyle. 1887.





## METODOLOGÍA

Bajo este título se abre el segundo bloque del trabajo de tesis. Aquí, se presentarán cada una de las etapas que condujeron a la generación de funciones matemáticas basadas en descriptores moleculares 2D capaces de categorizar compuestos orgánicos almacenados en grandes bases de datos en sustratos y no-sustratos de la glicoproteína-P (P-gp).

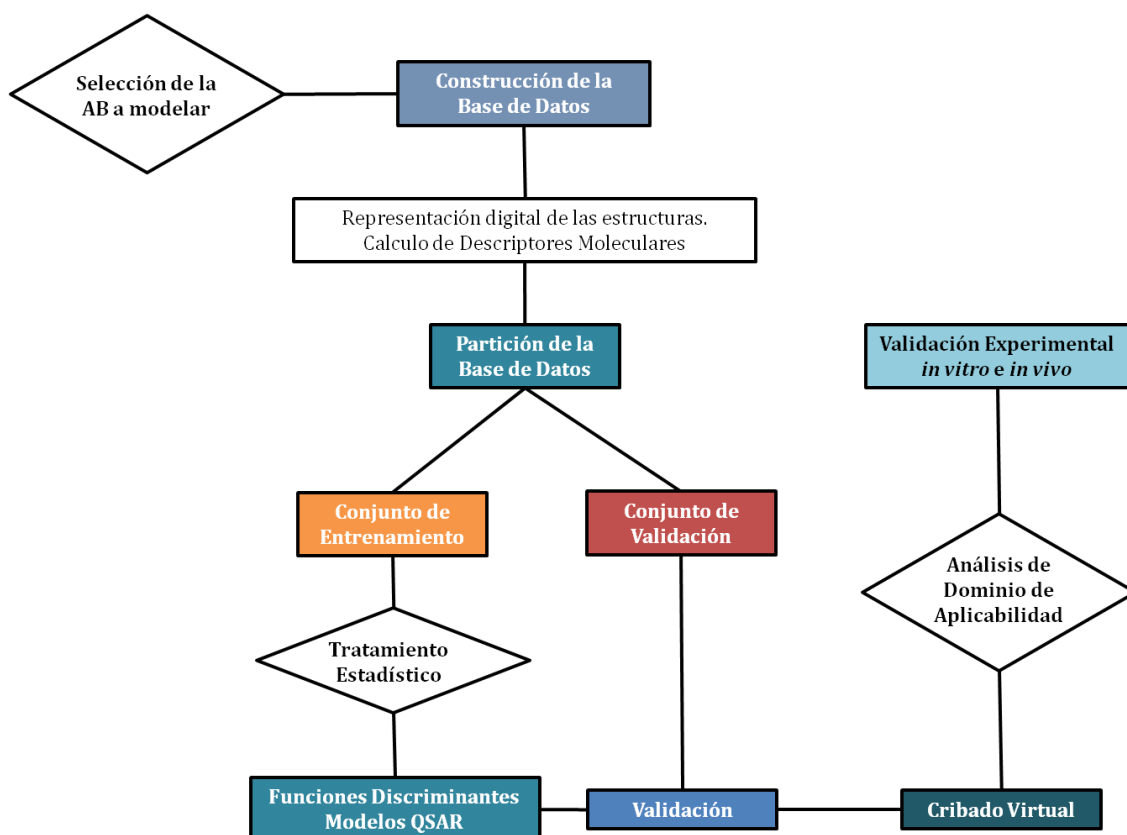
Se detallarán a su vez los pormenores del proceso mediante el cual, a través de la aplicación conjunta de las funciones generadas y una función capaz de identificar fármacos con actividad anti-epiléptica se identifican sustancias potencialmente útiles para el tratamiento de la epilepsia refractaria bajo el amparo de la *hipótesis del transportador*.

Por último, se explican las técnicas experimentales *in vitro* e *in vivo* utilizadas para validar los resultados obtenidos.

### Generación de modelos QSAR

La construcción de ecuaciones matemáticas que relacionan la estructura química con una determinada propiedad biológica ya sea prediciendo un valor (por ejemplo dosis efectiva 50, DE<sub>50</sub>) o asignando una categoría (sustrato/no-sustrato, activo/inactivo, etc.) conlleva un protocolo (Figura 1) específico cuyas etapas generales son:

**a)** Construcción de una *base de datos, set de datos o dataset* de compuestos químicos cuya actividad o clase de interés (sustratos, no-sustratos) haya sido experimentalmente determinada; **b)** Cálculo de *los descriptores moleculares asociados* a cada estructura de la base de datos generada; **c)** Partición de la base de datos en un *conjunto de entrenamiento o training set* (a partir del cual se inferirá estadísticamente el modelo) y un *conjunto de prueba o test set* que se usará para estimar la capacidad predictiva del modelo (la capacidad de generalización, la habilidad del modelo de predecir la categoría de casos no incluidos en el conjunto de entrenamiento) y; **d)** Generación y validación del modelo (Yee & Wei, 2012; Kunal & Indrani, 2011).



**Figura 1|** Protocolo general de desarrollo de modelos computacionales que relacionan la estructura química con una actividad biológica (AB) determinada y su aplicación en campañas de cribado virtual.

El principal objetivo de este trabajo de tesis es el desarrollo de un conjunto de funciones discriminantes basadas en descriptores independientes de la conformación para ser aplicados en campañas de cribado virtual con el fin de descartar potenciales sustratos de P-gp entre distintos candidatos a fármacos para el tratamiento de la epilepsia refractaria.

Este ensamble de modelos apunta a explorar eficientemente grandes repositorios de estructuras químicas para dar con aquellas estructuras que puedan lidiar con el fenómeno de resistencia múltiple a fármacos mediada por P-gp. El uso de un conjunto de modelos, en lugar de un modelo individual se propone como una estrategia para incrementar la especificidad de los mismos de manera de tener en consideración el hecho de que la P-gp presenta múltiples sitios de unión (poli-especificidad de sustrato) por lo que es razonable pensar que un modelo individual será incapaz de describir la variedad de estructuras químicas transportadas por el transportador (Chufan et al., 2015).

## **Selección de la actividad biológica a modelar. Construcción de la base de datos de sustratos y no-sustratos de P-gp.**

Diversos estudios señalan que la medida directa del transporte de una sustancia a través de mono-capas de células (ensayos de transporte bidireccional) es el método más confiable para la identificación de sustratos de los transportadores ABC (Polli et al., 2011; Hochman et al., 2002; Schwab et al., 2003; Zhang et al., 2012).

En líneas generales, estos experimentos consisten en comparar la tasa de permeabilidad basolateral-apical ( $B \rightarrow A$ ) a apical-basolateral ( $A \rightarrow B$ ) de la sustancia problema con la tasa respectiva en presencia de un inhibidor del transportador. Para tal fin, como se explicará más adelante, se utiliza una monocapa de células epiteliales específicas que expresan el transportador ABC de interés en su membrana apical (Demel et al., 2008).

Los ensayos de transporte bidireccional también permiten diferenciar si un compuesto actúa como sustrato, modulador o inhibidor evaluando su capacidad de alterar el flujo trans-epitelial de un sustrato de referencia (Demel et al., 2008).

La Food and Drug Administration (FDA) ha redactado guías para decidir si una droga es sustrato o no de P-gp, recomendando a los ensayos de transporte bidireccional en cultivos celulares como los más adecuados para tal fin (Giacomini et al., 2010; Zhang et al., 2008).

En función de lo anterior, la base de datos de sustratos y no sustratos de P-gp fue construida mediante una búsqueda bibliográfica exhaustiva en repositorios de artículos científicos<sup>27</sup> de aquellas sustancias químicas que hayan sido testeadas en ensayos de permeabilidad bidireccional, asignando la categoría en base a información consistente: si una sustancia fue reportada por dos o más artículos como sustrato transportable de P-gp, se le asigna la categoría sustrato y las sustancias con resultados dispares no se incluyen en la base. Para identificar un compuesto como no sustrato la condición es la misma que para los sustratos. Por último, las sustancias reportadas como moduladores, inhibidores o alguna otra categoría se sometieron a una búsqueda más rigurosa a fin de definir si era posible asignarles la categoría de sustratos o no-sustratos. La información al respecto con las referencias correspondientes podrá encontrarse en el Anexo de esta tesis. El hallazgo de conclusiones dispares en cuanto al transporte de una sustancia por P-gp se ha atribuido al hecho de que existe un amplio espectro de variantes de ensayos de permeabilidad, incluyendo distintos protocolos y líneas celulares (Broccatelli,

---

<sup>27</sup> Scopus: <http://www.scopus.com/>  
PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>  
PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

2012). La heterogeneidad de los datos utilizados justifica la elección del Análisis Discriminante como técnica de modelado, ya que un modelo clasificador permite amortiguar, al menos parcialmente, la variabilidad experimental del *dataset* (por ejemplo, variabilidad inter-laboratorio) (Talevi et al., 2012b).

### **Tamaño y partición de la base de datos**

Una de las características más importantes de los modelos que relacionan la estructura química con la actividad biológica es su poder predictivo, entendiendo por tal a la habilidad que posee el modelo para predecir correctamente la propiedad modelada para compuestos que no fueron utilizados para desarrollar la ecuación. Esta cualidad está estrechamente relacionada con las consideraciones tenidas en cuenta al momento de construir y dividir la base de datos en conjunto de entrenamiento y conjunto de prueba o validación (Golbraikh & Tropsha, 2002).

El número de compuestos de una base de datos construida para realizar estudios QSAR suele no ser ni demasiado grande, por razones prácticas y por limitaciones en la cantidad de datos disponible, ni demasiado chico. Dependiendo de la metodología computacional utilizada, el límite superior puede estar condicionado por los recursos computacionales y tiempos disponibles para llevar a cabo el modelado; más allá de esto, se ha demostrado que el uso de *datasets* de numerosos resulta en la obtención de modelos de mayor capacidad predictiva (Partha et al., 2008). Por otro lado, es imposible determinar cuál es el mínimo número de compuestos a incorporar en la misma para derivar modelos confiables. Expertos en la materia han sugerido que la mejor situación se da cuando el número total de compuestos incluidos está entre 150 y 300, y en el caso de funciones clasificatorias como las desarrolladas en la presente tesis, de esa cantidad, aproximadamente la mitad de compuestos debe permanecer a una categoría y los restantes a la otra (Tropsha, 2010).

Como se menciona más arriba, uno de los puntos a considerar durante el proceso de modelado, que impacta directamente sobre la confiabilidad o poder predictivo de los modelos, es la partición de la base de datos en conjunto de entrenamiento (*training set*) y conjunto de prueba o validación (*test set*). En el mejor de los casos, esta tarea debe satisfacer varias condiciones, en particular cuando se planea aplicar el modelo desarrollado como filtro en campañas de tamizado virtual, en las que se suelen abordar grandes y heterogéneas bibliotecas de compuestos químicos: **a)** El conjunto de entrenamiento debe ser heterogéneo, es decir, debe contener compuestos estructuralmente diversos; **b)** los elementos del conjunto de prueba deben ser representativos de los del conjunto de entrenamiento: esta situación permite establecer si todas las características relevantes del conjunto de entrenamiento han sido capturadas por el modelo; **c)** el conjunto de

entrenamiento debe estar balanceado en activos e inactivos (sustratos / no sustratos) de manera que los modelos generados no presenten tendencia a asignar una categoría a las moléculas en base a la abundancia relativa que presenta ésta en el conjunto de entrenamiento (Golbraikh et al., 2003).

Uno de los métodos de partición más utilizados es la asignación al azar de los elementos a cada conjunto. Se ha demostrado que esta estrategia es adecuada cuando el *dataset* posee un  $n$  mínimo y cuando se seleccionan conjuntos de entrenamiento y de prueba de tamaño similar (Golbraikh & Tropsha, 2002; Golbraikh et al., 2003). Por otro lado, como desventaja se menciona que la partición al azar no provee de un criterio racional para seleccionar las estructuras que conformarán el conjunto de prueba, por lo que no garantiza que los elementos de este último sean representativos del conjunto de entrenamiento (Yasri & Hartsough, 2001; Martin et al., 2012).

Con el objetivo de seleccionar conjuntos de moléculas que sean representativos de un espacio químico determinado, se han propuesto distintos métodos racionales de partición orientados a asignar inteligentemente las moléculas a cada conjunto. Entre los más conocidos se pueden mencionar las metodologías de agrupamiento o *clustering* como la denominada k-means (Everitt et al., 2011) mediante la cual se agrupan las moléculas en distintos sub-conjuntos o clusters dentro de los cuales los elementos comparten cierta similitud estructural; muestreando posteriormente compuestos de cada *cluster*, se obtiene una excelente representatividad del espacio químico (Golbraikh & Tropsha, 2002). Entre otros métodos racionales de partición destacan los mapas auto-organizados de Kohonen (Zupanet al., 1997; Gasteiger et al., 1993), los métodos de Kennard-Stone (Snarey et al., 1997) y los métodos basados en esferas de exclusión (Golbraikh et al., 2003).

A pesar de que ciertos estudios han indicado que se obtienen modelos con mayor capacidad predictiva cuando se utilizan conjuntos de datos particionados de manera racional (Golbraikh & Tropsha, 2002), la superioridad de este método por sobre la partición al azar no está aun demostrada ya que existen resultados conflictivos (Olsson et al., 2004; Gramatica & Pilutti, 2004).

En el presente trabajo de tesis se ha optado por particionar la base de datos de sustratos y no-sustratos de P-gp construida a partir de datos bibliográficos, asignando el 50% de los sustratos y el 50% de los no sustratos al conjunto de entrenamiento, y las mitades restantes, al conjunto de prueba. Esta decisión se tomó sobre la base de estudios que sugiere que las particiones aleatorias que generan conjuntos de iguales proporciones, proporcionan resultados más confiables durante el proceso de validación externa que se explicará más adelante (Talevi et al., 2010; Golbraikh & Tropsha, 2002; Golbraikh et al., 2003). Como criterio de partición al azar, los compuestos de cada categoría fueron ordenados

alfabéticamente y uno de cada dos compuestos fue extraído para el conjunto de prueba. Cabe la aclaración de que no existe un patrón periódico ni de otro tipo entre los nombres de los compuestos de la base de datos y su estructura química o actividad farmacológica.

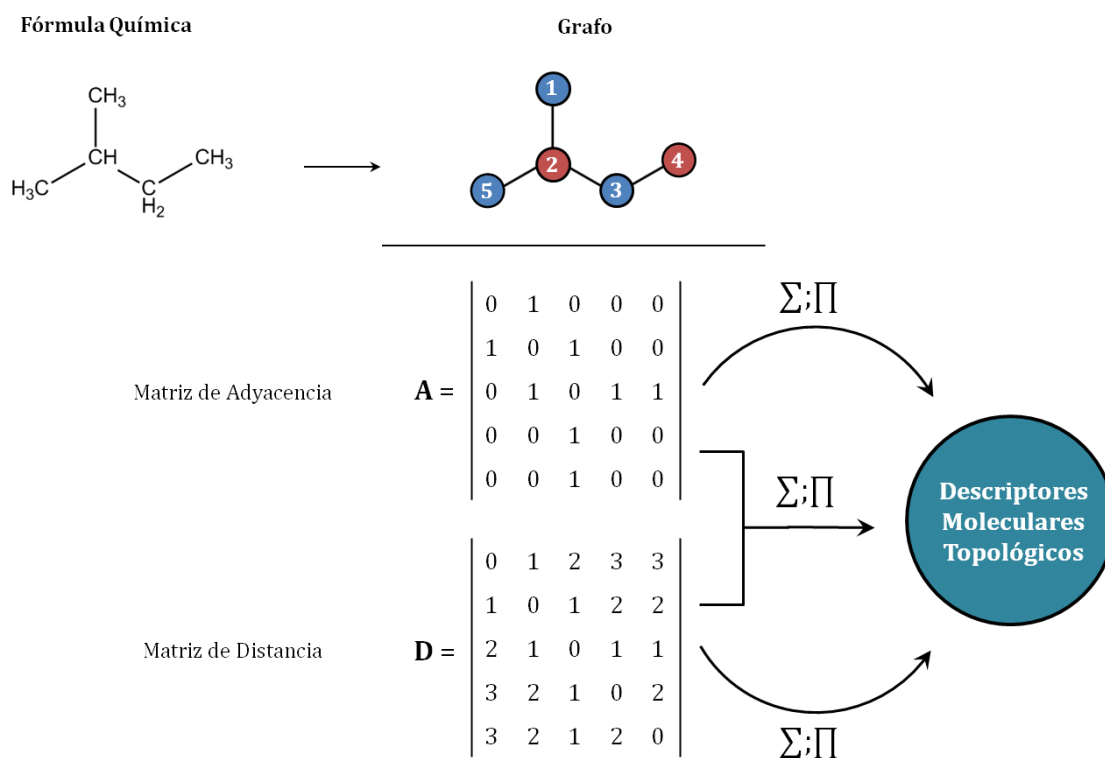
### **Digitalización de estructuras químicas. Cálculo y manejo de descriptores moleculares**

Las estructuras químicas recopiladas fueron representadas manualmente utilizando el programa ChemDraw 8.0 (PerkinElmer Inc., 2011). Tras construir la fórmula química de la molécula se genera un archivo de extensión .mol que contiene información codificada acerca de los átomos, conectividad y coordenadas de la molécula. Los detalles sobre los aspectos informáticos de este tipo de archivos quedan fuera del alcance de esta tesis.

Luego de representar cada una de las moléculas de la base de datos de sustratos y no sustratos de P-gp, se utilizó el programa Dragon 4.0 (Milano Chemometrics, 2003) para caracterizar cada una de ellas a través de un conjunto de 877 descriptores de baja dimensionalidad (0D-2D) distribuidos en 13 categorías distintas, entre ellas, descriptores constitucionales, descriptores topológicos, índices de conectividad, índices topológicos de carga de Gálvez, entre otros.

Tal y como lo indica el título de la tesis, se utilizan índices topológicos (conjuntamente con otros descriptores moleculares independientes de la conformación) para hallar una relación entre la estructura química de las moléculas y su capacidad para ser reconocidas y transportadas por la P-gp.

La **topología molecular** propone un tratamiento algebraico para la descripción de los compuestos químicos por medio de la aplicación de la teoría de grafos en el campo de la química. Como se muestra en la figura 2, las fórmulas químicas se prestan perfectamente a ser descritas como un grafo. Estos últimos son la materia de estudio de la Teoría de Grafos y consisten en un conjunto de nodos, puntos o vértices unidos por aristas, ejes o líneas. Se comprenderá intuitivamente que la aplicación de la Teoría de Grafos a las sustancias químicas consiste en considerar a los átomos como los vértices y a los enlaces como las aristas. El tratamiento algebraico posterior deriva en un amplio espectro de descriptores moleculares (Todeschini & Consonni, 2000; 2009) y el mismo se inicia con la construcción del grafo molecular y las matrices numéricas asociadas a los mismos.



**Figura 2|** Cálculo de descriptores topológicos. La estructura química (isopentano en este caso) es inicialmente representada como un grafo a partir del cual se pueden construir matrices de las que finalmente surge un valor denominado descriptor molecular. En este caso se representan las dos matrices de menor complejidad en lo que respecta al cálculo de índices topológicos, la matriz de adyacencia y la de distancia, de las cuales puede inferirse información acerca de la conectividad de las moléculas. Puede consultarse el Manual de Descriptores Moleculares de Todeschini & Consonni, donde se expone el fundamento del cálculo de una gran cantidad de descriptores moleculares topológicos (Todeschini & Consonni, 2000).

Dado que un número elevado de descriptores puede conducir a una alta probabilidad de encontrar correlaciones espurias entre la propiedad modelada y un subconjunto de los mismos, fueron generados 30 subconjuntos de 200–250 descriptores cada uno, por medio de combinaciones aleatorias (bloques aleatorios) de los distintos bloques de descriptores de baja dimensionalidad del programa Dragon 4.0 (Tabla 3).

| Grupo | Número de Descriptores | Nombre del Bloque                            | Contenido   |
|-------|------------------------|--|---|
| 1     | 48                     | Descriptores Constitucionales                | Peso Molecular, número de átomos, número de enlaces múltiples, etc                                |
| 2     | 119                    | Descriptores Topológicos                     | Índices de Wiener, Kier, Balaban, etc   |
| 3     | 47                     | Conteo de Trayectos y Caminos                | Conteo de trayectos y caminos de distintos órdenes  |
| 4     | 33                     | Índices de Conectividad                      | Índices de Randic, índices de Kier y Hall, índices de valencia, etc                               |
| 5     | 47                     | Índices de Información                       | Distintas magnitudes derivadas de los grafos  |
| 6     | 96                     | Auto-correlaciones 2D                        | Auto-correlaciones 2D de distintos órdenes y ponderados con alguna propiedad atómica              |
| 7     | 107                    | Índices derivados de la matriz de adyacencia | Auto-valores derivados de distintos cálculos integrales y ponderados con alguna propiedad atómica |
| 8     | 64                     | Descriptores BCUT                            | Auto-valores derivados de la matriz de adyacencia modificada por Burden                           |
| 9     | 21                     | Índices Topológicos de Carga de Gálvez       | Índices topológicos de carga de distintos órdenes   |
| 10    | 44                     | Índices basados en Auto-valores              | Auto-valores derivados de las matrices A y D  |
| 11    | 121                    | Conteo de Grupos Funcionales                 | Número de carbonilos, número de carboxilos, número de grupos amino, etc                           |
| 12    | 120                    | Fragmentos centrados en el átomo             | Frecuencia de aparición de secuencias de átomos predefinidos                                      |
| 13    | 10                     | Propiedades Moleculares                      | LogP, factor hidrofílico, área polar superficial, etc.  |

**Tabla 3|** Bloques de descriptores de baja dimensionalidad de Dragon 4.0. Para generar los subconjuntos de descriptores, se toma al azar de a un bloque hasta sumar 200-250 descriptores, por ejemplo grupo 1 + grupo 2 + grupo 8 = sub conjunto de 231 descriptores.

Un trigésimo primer subconjunto de descriptores al cual se denominó “bloque racional”, fue diseñado en base a los reportes existentes de modelos computacionales de afinidad a P-gp, de manera que incluyeron en este último subconjunto aquellos descriptores de Dragon 4.0 que coinciden con las propiedades relevantes para la interacción de las sustancias con P-gp, descritas en los artículos consultados (Penzotti et al., 2002; Xue et al., 2002; Cerqueira Lima et al., 2006; Cianchetta et al., 2005; Zhang et al., 2007; Li et al., 2007; Chang et al., 2006; Ekins et al., 2002; Wang et al., 2003; Boccard et al., 2009; Zalloum & Taha, 2008; Müller et al., 2008; Huang et al., 2007; Srinivas et al., 2006; Raub, 2005; Wiese & Pajeva, 2001). Por ejemplo, varios de los trabajos examinados reportan que el número de grupos aceptores y dadores de puentes de hidrógeno son importantes en el proceso de reconocimiento droga – P-gp, de manera que fueron incluidos en el bloque racional los descriptores que representan la frecuencia de grupos dadores de puentes de hidrógeno y aceptores de puentes de hidrógeno, el número de grupos amino primarios, secundarios y terciarios y el número de grupos hidroxilo. A su vez, distintos artículos sugieren que el tamaño de la molécula también posee importancia para dicho reconocimiento, por lo que



además se incorporaron al conjunto los descriptores peso molecular y refractividad molar dado que estos están estrechamente correlacionados con el tamaño y volumen molecular respectivamente. Por último, las auto-correlaciones 2D (descriptores del grupo 6) permiten inferir como influye la diferencia en determinada propiedad molecular (por ejemplo, electronegatividad) entre dos átomos de la estructura ubicados a cierta distancia topológica entre sí; como resultado, estos descriptores reflejan la distribución interna de ciertas propiedades moleculares espaciales (Todeschini & Consonni, 2000; 2009), por lo que es lógico pensar que estén relacionados con las características de los farmacóforos previamente reportados. Como resultado de este análisis, el conjunto racional quedó conformado por 90 descriptores moleculares de baja dimensionalidad. Tanto en los subconjuntos aleatorios como en el bloque racional, los descriptores asociados con un bajo contenido de información (que asumen un valor constante o casi constante a lo largo del training set) fueron excluidos del análisis que se explicará a continuación.

### **Generación / entrenamiento de los modelos**

Entre los cientos de descriptores moleculares calculados, se intenta buscar aquellos que mejor se correlacionen con la propiedad de interés. Esta tarea puede ser realizada mediante distintos tratamientos (habitualmente estadísticos, pero no siempre) y es lo que se conoce como modelado (Kunal & Indrani, 2011).

La determinación experimental de si una sustancia es transportada o no por la P-gp utilizando ensayos de permeabilidad en mono-capas de células constituye un universo complejo donde son válidos una variedad de protocolos e incluso distintas líneas celulares (Broccatelli, 2012). A fin de poder lidiar con esta heterogeneidad de experimentos y aliviar a los modelos de reflejar los errores aleatorios provenientes de las distintas determinaciones, se ha propuesto utilizar esquemas de clasificación binarios (Penzotti et al., 2002) donde el resultado del ensayo es transformado (codificado) en una etiqueta o variable categórica a la cual se le asigna un valor, en esta tesis, si los artículos consultados reportan que una sustancia es transportada por P-gp en determinada condición experimental denominándola sustrato, se le asigna el valor 1; de lo contrario, si informa que no es transportada por P-gp reportándola como no-sustrato, se le atribuye el valor -1. Por consiguiente, esta variable binaria arbitraria es adoptada como variable dependiente en la construcción de los modelos.

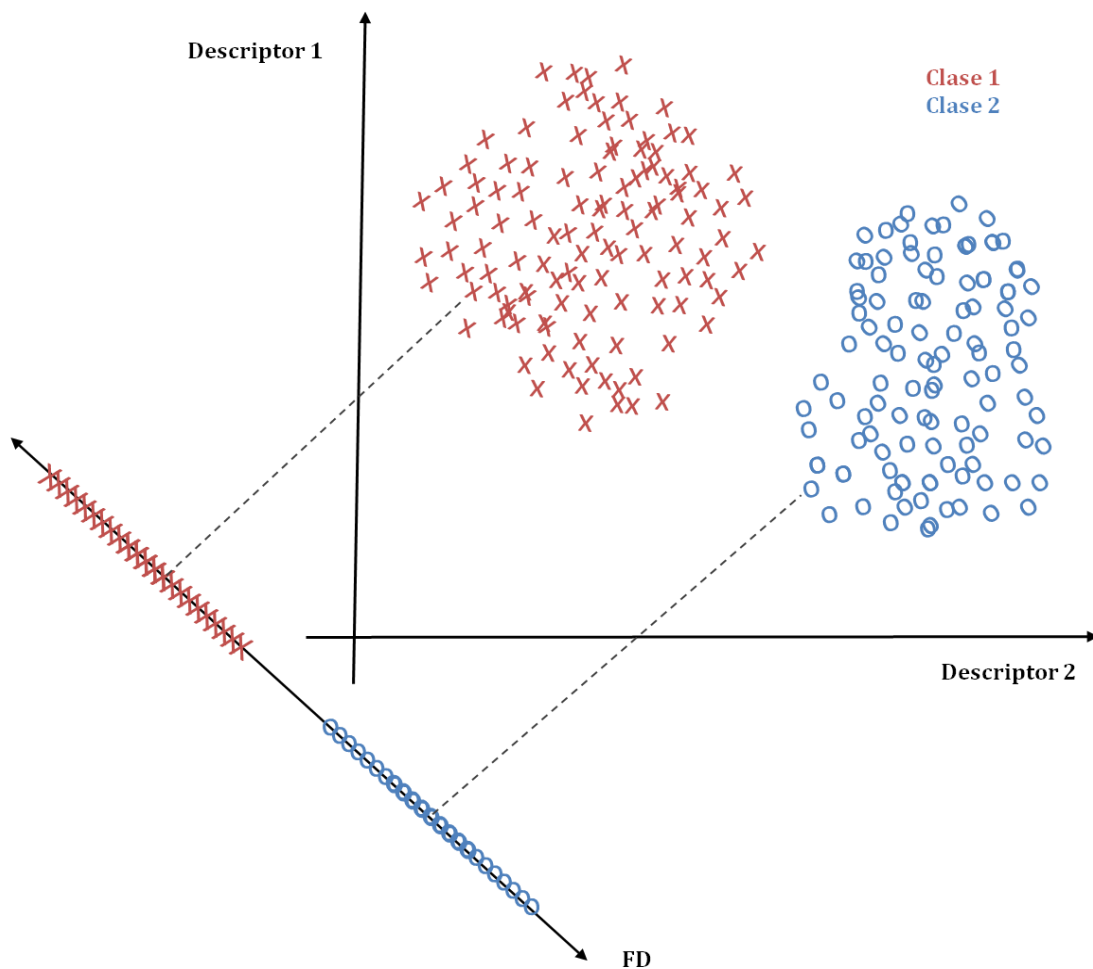
Para seleccionar los descriptores incluidos en los modelos se aplicó, utilizando el programa Statistica 7.0 (StatSoft inc, 1984–2007), la técnica de tratamiento estadístico denominada *Regresión Lineal Múltiple* en modo *Stepwise Forward* sobre

cada uno de los subconjuntos de descriptores generados (Van Waterbeemd, 1995; Yee & Wei, 2012). Esta estrategia consiste en realizar una regresión lineal múltiple por cuadrados mínimos escalonada o por pasos, hasta encontrar la combinación de variables continuas que mejor discrimine las categorías de los compuestos del conjunto de entrenamiento. En cada etapa, el programa busca automáticamente la variable independiente (descriptores) mejor correlacionada con la variable dependiente y la incluye en el modelo de regresión; en el segundo paso busca introducir en el modelo, de entre las variables independientes que quedan en el pool de descriptores, aquella que consigue mejorar más la capacidad clasificatoria del modelo; el proceso continúa hasta que la adición de una nueva variable no contribuye a un aumento significativo del poder discriminante o hasta que el usuario lo defina por algún otro criterio.

Una vez halladas las combinaciones lineales  $k$ -dimensionales de descriptores de cada pool que brindan la mejor separación entre las dos categorías de compuestos del conjunto de entrenamiento, se utiliza el *Análisis Lineal Discriminante* (ALD) para construir las funciones discriminantes (FDs) cuya expresión general se muestra abajo. En estas últimas,  $a_0$  es una constante y  $a_i$  es el coeficiente asociado al descriptor molecular  $d_i$  (Yee & Wei, 2012).

$$FD = a_0 + \sum_{i=1}^k a_i \cdot d_i$$

Matemáticamente, las FDs definen un plano  $k$ -dimensional donde idealmente los compuestos de una categoría se encuentran hacia uno de los lados del mismo y los de la otra categoría hacia el lado opuesto. La figura 3 muestra a modo de ejemplo cómo opera una FD en un problema bi-dimensional (considerando dos descriptores) (Yee & Wei, 2012).



**Figura 3|** Representación gráfica de una FD hipotética. Se puede apreciar que el ALD tiende a maximizar la separación entre las distintas categorías por medio de la reducción de la dimensionalidad del problema, transformando un plano, en una recta, una superficie en un plano, y para problemas k-dimensionales, una hiper-superficie en un hiper-plano.

Con respecto a los valores o *score* que pueden tomar las funciones discriminantes, debido a que ha sido asignado arbitrariamente el valor 1 para los sustratos y -1 para los no sustratos del conjunto de entrenamiento, se espera que un compuesto externo adquiriera valores positivos si es sustrato y negativos si no lo es. La determinación del valor de corte de las FDs es una cuestión que se detallará más adelante pero *a priori*, cuando ambas clases poseen una distribución similar, se puede utilizar el promedio entre los valores asignados a cada categoría para decidir si una sustancia pertenece a una u otra clase (Yee & Wei, 2012).

El programa Statistica 7.0 utilizado para ejecutar la regresión lineal múltiple y el ALD, permite predefinir una serie de condiciones importantes para la obtención de modelos estadísticamente válidos, a saber:

**Tolerancia ( $\beta$ ):** la tolerancia de una variable independiente se define como 1 menos el cuadrado del coeficiente de regresión múltiple entre dicha variable y todas las demás variables independientes incluidas en la ecuación (Rawlings et al., 1998). Por lo tanto, cuanto más chico es el valor de tolerancia de una variable, más redundante es la contribución de esta última a la ecuación de regresión, es decir, dicha variable está altamente correlacionada con alguna otra variable en el modelo. Para evitar la incorporación de pares de descriptores altamente correlacionados se ha fijado 0.2 como valor mínimo de tolerancia. Por cada pool de descriptores, se derivó un modelo de tolerancia 0.2, otro de 0.35 y uno con el máximo de tolerancia admitido por el software, 0.5.

**Número máximo de pasos (*steps*):** directamente relacionado con la cantidad de descriptores incorporados al modelo, el control de este parámetro apunta a minimizar las chances de sobre-ajuste (*over-fitting*), es decir, la obtención de FDs demasiado optimistas que clasifiquen excesivamente bien a los compuestos del conjunto de entrenamiento pero fallen en predecir la clase de moléculas ajenas al mismo (ganancia de poder explicativo a expensas de pérdida de poder predictivo o capacidad de generalización) (Hawkins, 2004). Mediante observaciones basadas en la experiencia (reglas de pulgar), se recomienda incorporar no más de 1 descriptor al modelo por cada 10–15 moléculas del conjunto de entrenamiento (Peduzzi et al., 1995; Peduzzi et al., 1996).

**Nivel de significación estadística ( $\alpha$ ):** fueron incorporados a los modelos sólo aquellos descriptores con coeficientes significativos a un nivel de  $\alpha$  de 0.05.

**Ordenada al origen:** dado que Statistica 7.0 permite forzar las ecuaciones de regresión a adquirir el valor (0,0) (“set on zero”), se estudiarán también los modelos generados bajo esta opción. Esta decisión fue tomada al observar que los modelos originales adquieren una ordenada al origen negativa, por lo que esta estrategia podría evitar el riesgo de que los modelos posean una tendencia a asignar la categoría no-sustratos. Por lo tanto, los 30 conjuntos aleatorios fueron adicionalmente analizados con la estrategia denominada “set on zero” bajo los tres niveles de tolerancia mencionados arriba. La discusión en torno a esta metodología queda reservada para el próximo capítulo (Eisenhauer, 2003).

En el caso del bloque de descriptores racional, se utilizó una estrategia manual en la cual el primer descriptor incorporado por el algoritmo *Stepwise Forward* fue retirado sistemáticamente, volviendo a generar el modelo con los descriptores remanentes hasta que no se observe correlación entre los descriptores y la variable dependiente. Los métodos “paso a paso” (*stepwise*) conducen a soluciones subóptimas ya que el subconjunto de descriptores incluidos en el modelo depende fuertemente la identidad del descriptor que se incluye en el primer paso. El

remover del pool de descriptores el predictor incluido en primera instancia permite ampliar la cantidad de modelos obtenidos del pool racional.

## **Validación de las Funciones Discriminantes**

Las instancias de validación pueden etiquetarse como un punto crítico del proceso de modelado. Las mismas apuntan a evaluar la robustez y la capacidad predictiva de los modelos generados. Las técnicas de validación pueden clasificarse en internas y externas (Tropsha et al., 2003; Kunal & Kar, 2014).

La validación interna se realiza para determinar la robustez del modelo y para asegurar que la correlación entre la variable que codifica las clases y los descriptores moleculares no haya sido aleatoria; en este caso, el propio conjunto de entrenamiento es utilizado para validar los modelos. La validación externa en cambio, utiliza el conjunto de prueba o *test set*, conformado por compuestos cuya categoría es conocida pero que no fueron incluidos en el conjunto de entrenamiento, para evaluar la calidad predictiva/la capacidad de generalización de las FDs. A continuación se detallan las técnicas utilizadas este trabajo de tesis.

**Técnicas de validación interna.** Dos estrategias distintas fueron utilizadas para validar internamente las FDs; la *validación cruzada*, que pone a prueba la robustez de los modelos y; el *test de aleatorización de Fischer (Y-Scrambling)* que indica si el poder clasificador del modelo encontrado difiere significativamente del azar (Tropsha et al., 2003; Kunal & Kar, 2014).

La validación cruzada consiste en remover uno (*Leave-one-out*, LOO) o varios (*Leave-group-out*, LGO) de los compuestos del training set de manera aleatoria o sistemática. Luego se recalcula la FD con las moléculas remanentes y con la nueva FD se predice la clase de las moléculas excluidas. En este caso se realizaron 13 rondas de validación LGO removiendo sistemáticamente 12 compuestos cada vez (6 sustratos y 6 no sustratos) de manera que todos los compuestos fueron excluidos al menos una vez (Gramatica, 2007). El resultado del LGO fue expresado como la media aritmética del % global de buenas clasificaciones de todos los nuevos modelos generados y su correspondiente intervalo de confianza 95%.

La técnica de aleatorización consiste en reconstruir n veces la FD con los mismos descriptores del modelo original seleccionado, pero asignándole valores aleatorios a la variable binaria que define la clasificación de las moléculas, es decir, se permutan los valores de la variable binaria entre las moléculas que componen el training set, esperando obtener un modelo con baja capacidad discriminante y sin valor estadístico. El número de aleatorizaciones por modelo depende de cada

estudio particular, sin embargo se recomienda repetir el proceso al menos 25 veces para descartar una correlación al azar (Rücker et al., 2007). Aquí el proceso fue repetido 50 veces y el resultado final fue expresado como el promedio de los % de buenas clasificaciones de los modelos generados al azar y su correspondiente intervalo de confianza 95%.

**Validación externa.** Esta estrategia ha sido catalogada por los expertos como la más rigurosa para poner a prueba la capacidad de generalización de los modelos, siempre y cuando, la disponibilidad de datos no sea un problema (Tropsha, 2010; Kunal & Kar, 2014). Como ya se adelantó arriba, consiste en utilizar los modelos generados para predecir el valor de la variable dependiente de un conjunto de compuestos de categoría conocida que no han sido utilizados para generarlos (Talevi et al., 2012a).

A pesar del consenso unánime respecto a que se trata de la mejor manera de poner a prueba la habilidad de los modelos para predecir la categoría de compuestos desconocidos, existen importantes diferencias en las opiniones de cómo asignar las moléculas de la base de datos al conjunto de prueba, dado que por ejemplo, en el caso de bases pequeñas, separar demasiados compuestos para el test set puede derivar en una pérdida de información química en el conjunto de entrenamiento (Kunal & Indrani, 2011). Para mencionar un ejemplo, Hawkins (Hawkins, 2004) afirma que utilizar un conjunto de prueba externo para evaluar la predicción del modelo es adecuado cuando el mismo está formado por más de 20 estructuras (y por lo menos 50, idealmente) y sólo si la base de datos es realmente grande (>100 compuestos), de lo contrario el test set tiende a sub-estimar la capacidad predictiva de los modelos; por otro lado, otros autores sugieren retener un 10-20% de los compuestos de la base de datos para el conjunto de prueba (Yasri & Hartsough, 2001). Por motivos ya explicados y justificados al comienzo del capítulo, y considerando que nuestro data set contiene más de 100 compuestos, se han asignado la mitad de los compuestos de cada categoría al conjunto de prueba para llevar a cabo la validación externa.

### **Criterios de selección de las mejores FDs**

Hacia el final del proceso de modelado, se espera obtener algo más de 200 modelos con diferentes cualidades estadísticas, por lo que es adecuado fijar criterios que permitan retener los modelos más aptos, y descartar los que no lo son. Para tal fin, fueron observadas las siguientes características:

**Porcentaje de buenas clasificaciones:** Debido a la gran variabilidad en los datos obtenidos en ensayos relacionados a P-gp, se ha argumentado que el límite

superior de la precisión de los modelos que apuntan a predecir transporte por P-gp es de 85% (Zhang et al., 2007).

En base a esta información y a los reportes previos de modelos capaces de reconocer sustratos de P-gp (Penzotti et al., 2002; Xue et al., 2002; Cerqueira Lima et al., 2006; Cianchetta et al., 2005; Zhang et al., 2007; Li et al., 2007; Chang et al., 2006; Ekins et al., 2002; Wang et al., 2003; Boccard et al., 2009; Zalloum & Taha, 2008; Müller et al., 2008; Cabrera et al., 2006) se definió que las FDs deben poseer como mínimo un 75% global de buenas clasificaciones del conjunto de entrenamiento y dentro del mismo, se desea que los porcentajes de clasificaciones correctas de una y otra categoría estén balanceados, es decir, idealmente ese 75% debe provenir de clasificar correctamente el 75% de los sustratos y el 75% de los no sustratos. Un criterio idéntico se aplica para decidir qué modelos presentan un mejor desempeño durante la validación externa.

**Principio de Parsimonia:** también conocido como navaja de Occam, se refiere al uso de modelos que contienen la cantidad de variables independientes justas y necesarias para explicar la variable dependiente. A continuación, tres maneras de expresar este principio:

*“Pluralitas non est ponenda sine necessitate”  
(La pluralidad no se debe postular sin necesidad.)*

*“No ha de presumirse la existencia de más cosas que las absolutamente necesarias”*

*“En igualdad de condiciones, la explicación más sencilla suele ser la correcta”*

La violación del principio de parsimonia durante la construcción de modelos QSAR deriva irremediablemente en sobre-ajuste (*over-fitting*) (Hawkins et al., 2004), ya que en el afán de explicar a la perfección las características de las moléculas del conjunto de entrenamiento por medio de la incorporación de un número de descriptores excesivo, se pierde también en exceso capacidad de generalización o poder predictivo. Como ejemplo extremo de sobre-ajuste podríamos mencionar modelos que discriminan con margen de error nulo entre las dos clases de compuestos del conjunto de entrenamiento pero que son incapaces de predecir la clase de compuestos externos a este último. Esta situación también podría encontrarse en el caso de recurrir a técnicas de modelado más flexibles de lo necesario (por ejemplo, modelado no lineal cuando los datos pueden explicarse con un modelo lineal).

En definitiva, frente a la situación de encontrar varios modelos con buenos desempeños estadísticos se optará por aquel que incluya menor número de descriptores.

## Valor de Corte. Combinación de modelos / Fusión de Datos

Dos indicadores importantes de la performance de un modelo QSAR determinado son su *sensibilidad* ( $S_e$ , la tasa de verdaderos positivos) y su *especificidad* ( $S_p$ , la tasa de verdaderos negativos). Tales factores están definidos por las siguientes ecuaciones:

$$S_e = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$S_p = \frac{VN}{VN + FP}$$

donde FN denota los falsos negativos y FP representa los falsos positivos. En el presente trabajo, dado que se pretende identificar compuestos que no sean transportados por P-gp (no sustratos) y se desea descartar a los que si los son (sustratos), las expresiones de arriba pueden reescribirse de la siguiente manera:

$$S_e = \frac{\text{Verdaderos no sustratos}}{\text{Verdaderos no sustratos} + \text{Falsos sustratos}}$$

$$S_p = \frac{\text{Verdaderos sustratos}}{\text{Verdaderos sustratos} + \text{Falsos no sustratos}}$$

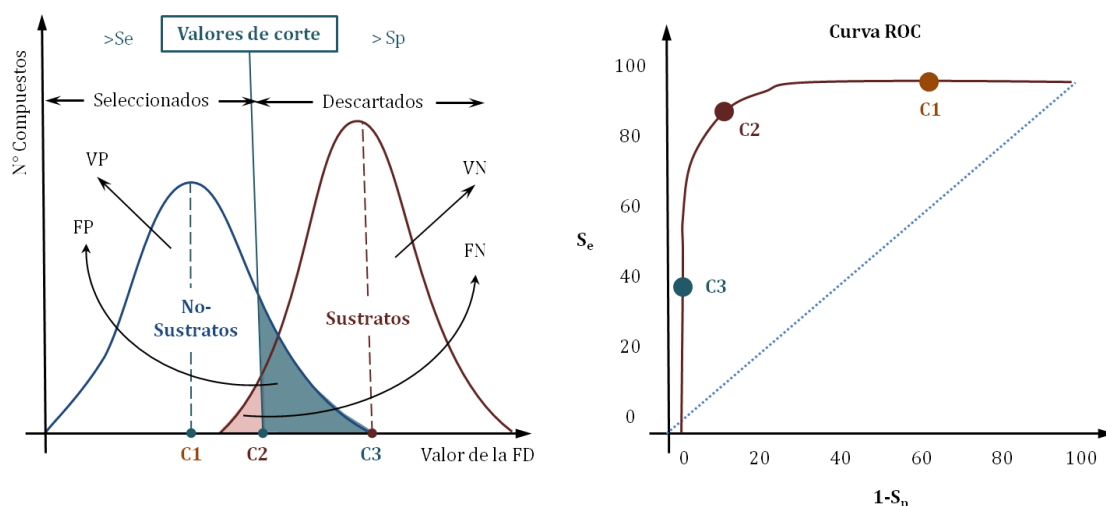
Por medio de la modificación del valor de corte de la respuesta (*output o score*) del modelo, valor que se utilizará para distinguir en nuestro caso sustratos y no sustratos, se puede observar que  $S_e$  y  $S_p$  evolucionan en forma opuesta, por lo tanto, no es posible optimizar ambos parámetros de manera simultánea y debe por lo tanto encontrarse un balance. Para tal fin, las curvas *Receiver Operating Characteristics* (ROC) se presentan como una herramienta de gran utilidad (Triballeau et al., 2005).

Las curvas ROC, ampliamente utilizadas para comparar la performance de distintos modelos y aproximaciones de modelado (Truchon & Bayly, 2007), son representaciones graficas de  $S_e$  contra  $1-S_p$  con las que es posible establecer el valor de corte óptimo de las funciones discriminantes o de una combinación de funciones discriminantes, es decir, aquel que brinde el mejor balance entre los errores tipo I (probabilidad de encontrar un FP) y tipo II (probabilidad de encontrar un FN). Por otro lado, el área bajo la curva ROC (AUC), permite comparar de manera simultánea la performance de distintos modelos y/o metodologías (De Long et al., 1988). Como puede observarse en la figura 4 los ejes del gráfico de la curva ROC adoptan valores entre 0 y 1 (0% y 100%), delimitando un cuadrado de área = 1.00. Un modelo clasificador se considera no-discriminativo si su curva ROC no es estadísticamente distinta de la línea oblicua de pendiente 1 que se muestra



en la figura de la derecha, la cual está asociada a un  $AUC = 0.50$ . A medida que el AUC del modelo se acerca al valor 1,00 (clasificación perfecta), mayor será su capacidad discriminativa (Triballeau et al., 2005).

Se ha señalado que no hay una regla general para hallar un balance entre los errores tipo I y tipo II, sino que esto depende de consideraciones pragmáticas que han de ser juzgadas por el propio investigador (Triballeau et al., 2005; Neyman & Pearson, 1993; Hubbard & Bayarri, 2003). En este caso, se ha depositado especial interés en desarrollar modelos altamente específicos, que sean capaces de descartar prácticamente todos los sustratos. Con carácter conservador, esta actitud responde directamente al marco económico en el cual se desarrolla el trabajo de tesis. Más específicamente, la estrategia de selección de candidatos a adquirir y ensayar en pruebas *in vitro* e *in vivo* debe ser coherente con el acotado presupuesto asignado a tal fin; en nuestro caso, hemos considerado preferible aumentar la especificidad y perder motivos estructurales valiosos, a aumentar la sensibilidad y correr el riesgo de seleccionar un FP y tener que asumir importantes pérdidas de tiempo y dinero.



**Figura 4|** Construcción de una curva ROC hipotética.

Numerosos estudios recientes, indican que el uso de esquemas de fusión de datos y clasificación a través de modelos aplicados de manera simultánea durante campañas de cribado virtual (metaclasificación) puede mejorar marcadamente el desempeño tanto de aproximaciones computacionales basadas en el ligando como en el receptor (Holliday et al., 2011; Kukol, 2011; Sastry et al., 2013).

Dado que muchos de los modelos obtenidos mostraron un mejor desempeño para la clasificación de los no-sustratos (ver capítulo VII), lo que se traduce en una alta tasa de FP, y teniendo en consideración la amplia especificidad de sustrato de P-gp (Chufan et al., 2015), se ha optado por explorar el desempeño de distintas combinaciones de las FDs obtenidas, buscando minimizar la tasa de FP en la

validación externa. La poli-especificidad de sustrato de P-gp parece indicar que es muy difícil obtener un modelo capaz de identificar a todos los compuestos reconocidos por esta macromolécula.

Las FDs fueron combinadas mediante una estrategia muy sencilla: primero se buscó la mejor combinación de a dos de los modelos derivados de los conjuntos de descriptores aleatorios y, posteriormente esta combinación se combinó con los modelos derivados del pool racional para hallar la mejor combinación de tres FDs. Es decir, se exploró de manera exhaustiva todas las posibles combinaciones de dos modelos individuales surgidos de los bloques aleatorios; encontrada tal combinación, se procedió a buscar de manera exhaustiva la mejor combinación de la misma con un tercer modelo de entre los obtenidos del bloque de descriptores que hemos denominado “racional”.

Durante la búsqueda, se aplicaron los modelos a los compuestos del conjunto de prueba haciendo que los valores de las FDs combinadas operen de manera aditiva, la figura 5 explica con más claridad este proceso.

| Compuesto  | FD 1        | FD 2        | FD 1+2        |
|------------|-------------|-------------|---------------|
| Sustrato A | sustrato    | no sustrato | sustrato ✓    |
| Sustrato B | no sustrato | no sustrato | no sustrato ✗ |

**Figura 5|** Combinación de un par de FDs. Si al menos una de las FDs del par combinado clasifica al compuesto como un sustrato, entonces se lo considera sustrato. Si ambas funciones lo clasifican mal, entonces la combinación falla en clasificar el compuesto. Se trata, nuevamente, de un esquema de combinación conservador tendiente a reducir el número de falsos no sustratos.

Finalmente, una vez hallada la combinación de tres FDs que minimice la tasa de FP, se evaluó el desempeño de tres esquemas de fusión de datos distintos: MAX, toma como salida de la combinación de modelos al máximo valor de las 3 FD; MIN toma como salida el valor mínimo y; PROM, la clase de los compuestos es asignada promediando los valores de las tres FDs. Se espera que los esquemas de combinación y fusión de datos conduzcan a un aumento sustancial en la especificidad de los modelos. Mediante la construcción de las curvas ROC para cada uno de los mejores modelos y su combinación a través de los distintos esquemas de fusión, se seleccionara el valor de corte óptimo en base a los criterios expuestos más arriba, dejando a las FDs listas para ser aplicadas sobre grandes bases de datos de compuestos.

## Cribado Virtual

El uso de la combinación de modelos hallada por la metodología explicada en la sección anterior sobre los repositorios de compuestos tipo fármaco, será precedida por la aplicación de una FD capaz de identificar sustancias anticonvulsivas activas al ensayo de convulsiones por electroshock máximo (MES test) (Talevi et al., 2007), el cual se explicará más adelante en este capítulo. Dicha FD, así como las desarrolladas en la presente tesis, está basada en descriptores moleculares 2D calculados con Dragon 4.0 (Milano Chemometrics, 2003) y su expresión matemática es la siguiente:

$$\text{Clase} = 8.110 - 2.206.HVcpx - 4.277.BIC2 + 0.443.GATS7e + 1.089.GATS8p$$

donde “Clase” indica cuando un compuesto dado protege de la convulsión inducida en el ensayo MES, considerándose activa la molécula cuando Clase  $\geq 0$  e inactiva cuando es  $<0$ . HVcpx y BIC2 son descriptores del grupo 5 que contienen información sobre los grafos mientras que GATS7e y GATS8p son autocorrelaciones de Geary de distinto orden ponderadas por la electronegatividad y polarizabilidad atómica respectivamente. Para más información sobre estos descriptores puede consultarse la referencia de Talevi et al., del 2007.

A modo secuencial, los compuestos que superen el filtro reportado por Talevi y colaboradores, serán cribados por la combinación de FDs desarrollada en este trabajo, con lo que se pretende obtener sustancias anticonvulsivas capaces de eludir a la P-gp.

Las bases de datos utilizadas fueron ZINC 5.0 que a la fecha recopila más de 20 millones de compuestos orgánicos pequeños<sup>28</sup> (Irwin et al., 2012) y DrugBank 3.0 (Knox et al., 2011), la cual contiene más de 7500 entidades moleculares entre las que se encuentran alrededor de 1540 moléculas pequeñas aprobadas por la FDA y más de 5000 moléculas de experimentación<sup>29</sup>. Drugbank es, por lo tanto, un repositorio virtual adecuado para encarar campañas de reposicionamiento asistido por computadora.

La forma habitual de procesar estas bases de datos es calcular los descriptores que forman parte de cada FD para cada uno de los compuestos de las mismas, y luego de incluir dichos valores en los modelos se obtiene la clasificación predicha de todos los compuestos. Haciendo uso del valor de corte establecido previamente mediante la construcción de curvas ROC, se decide cuáles compuestos son candidatos a adquisición y evaluación, y cuáles son descartados.

---

<sup>28</sup> <http://zinc.docking.org/browse/subsets/>

<sup>29</sup> <http://www.drugbank.ca/stats>

## Ámbito de aplicabilidad

La última instancia de inspección *in silico* que deben atravesar los candidatos a fármaco antes de pasar a la fase de compra y evaluación consiste en determinar cuán confiable es la predicción realizada, ya que a pesar de que un modelo resulte robusto, significativo y haya sido correctamente validado, es ficticio esperar que prediga correctamente una propiedad para la totalidad de estructuras químicas existentes (Tropsha et al., 2003). Por lo tanto es necesaria una estimación del *ámbito de aplicabilidad* de las FDs generadas, es decir, de aquella región del espacio químico donde las mismas realizan predicciones confiables. En la práctica, se expresa como un límite numérico a partir del cual la predicción deja de ser confiable. El ámbito de aplicabilidad queda definido por la naturaleza de los compuestos químicos que conforman el conjunto de entrenamiento (Gramatica, 2007). Existen diversos métodos para estimar el ámbito de aplicabilidad (Tetko et al., 2008; Dimitrov et al., 2005; Gramatica, 2007); una de las formas más sencillas es utilizando la Regla de la Palanca (*leverage method*): se determinan los valores de palanca ( $h_i$ ) de cada compuesto de la base de datos a evaluar, siendo  $x_i$  el vector de los descriptores del compuesto  $i$  y  $X$  la matriz conteniendo los valores de los descriptores del modelo para el conjunto de entrenamiento (Tropsha et al., 2003).

$$h_i = x_i^T (X^T X)^{-1} x_i \quad (i= 1, \dots, n)$$

Se considera que un compuesto seleccionado por cribado virtual de una base de datos estará dentro del ámbito de aplicabilidad del modelo cuando presente un valor de  $h$  inferior al valor crítico ( $h^*$ ), definido generalmente como  $h^*=3k/n$ , donde  $k$  es el número de descriptores incluidos en el modelo y  $n$  el número de compuestos que conforman el conjunto de entrenamiento. Una palanca superior al valor crítico significa que la predicción es resultado de una extrapolación sustancial y por lo tanto no se debe confiar en la misma (Gramatica & Papa, 2003).

## Evaluación Biológica

Concluida la fase de desarrollo *in silico*, se dispone de un criterio racional que apunta entre otras cosas a disminuir el impacto económico y ambiental del desarrollo de fármacos, es decir, el análisis computacional realizado permite por un lado optimizar los recursos monetarios disponibles para la adquisición de drogas, y por otro limitar la cantidad de animales de laboratorio sacrificados en pos de identificar nuevas sustancias con actividad terapéutica, tal y como lo recomiendan las pautas de bioética vigentes a nivel internacional (Claude, 2009). Dada la naturaleza de los compuestos buscados, es imposible desligarse por completo del uso de animales de laboratorio, por lo que lo mejor que se puede

hacer es un uso responsable y racional de los mismos, anteponiendo a esta fase experimental, cuando sea posible, el uso de modelos *in silico* y/o *in vitro*. En el presente trabajo de tesis se ha utilizado tanto métodos *in vitro* como *in vivo* para validar los resultados obtenidos. A continuación, el detalle de los mismos.

### **Determinación de la actividad antiepiléptica de los candidatos seleccionados en modelos animales**

Una innumerable cantidad de modelos animales de epilepsia y convulsiones epilépticas han sido descritos (Löscher, 1999). Los mismos pueden ser asignados a distintas categorías, por ejemplo, modelos de crisis espontáneas o modelos de crisis inducidas eléctrica o químicamente; modelos de crisis recurrentes o modelos de crisis aisladas; modelos de crisis generalizadas o modelos de crisis parciales; modelos de crisis convulsivas o modelos de crisis no convulsivas; modelos crónicos o modelos agudos; etc. (Löscher, 2011).

El proceso de desarrollo de nuevos fármacos anti-epilépticos requiere del procesamiento o *screening* de un gran número de compuestos, actividad para la cual se buscan modelos animales sencillos con una gran capacidad de predicción de actividad clínica. Esta es la razón por la que dos modelos simples de convulsiones en ratas y ratones, como el ensayo MES (Maximal Electroshock Test) y scPTZ (sub-cutaneous Pentilentetrazol Test), desarrollados hace más de 60 años, siguen siendo ampliamente utilizados en la búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos (Bialer & White, 2011; White et al., 2006).

En el **ensayo MES** se inducen convulsiones tónico-clónicas a través de un estímulo eléctrico de corta duración (0.2 segundos) utilizando electrodos trans-corneales o trans-auriculares sobre ratones (50mA) o ratas (150mA) normales. La convulsión máxima típicamente consiste en un corto periodo de flexión tónica seguido de un periodo más prolongado de extensión tónica de los miembros posteriores y un episodio clónico final. Se considera que la abolición de la fase de extensión tónica indica que la droga administrada protege de la convulsión (los miembros posteriores no deben formar un ángulo de más de 90 grados con el tronco) siendo este parámetro el punto final del ensayo.

El ensayo MES se utiliza mayoritariamente para identificar sustancias capaces de bloquear convulsiones generalizadas tónico-clónicas. Adicionalmente, se ha propuesto que esta prueba es capaz de predecir capacidad de protección contra convulsiones parciales (Krall et al., 1978), sin embargo, la falta de eficacia anti-MES de diversos FAEs novedosos (por ejemplo levetiracetam, tiagabina, vigabatrina)

que luego mostraron utilidad para suprimir convulsiones parciales, es un fuerte argumento en contra de esta idea (Löscher, 2011).

El ensayo **scPTZ** (también conocido como metrazol), consiste en la inducción química de convulsiones por medio de la administración sub-cutánea de una dosis convulsiva de pentilinetetrazol (PTZ, 6,7,8,9-Tetrahydro-5H-tetrazolo(1,5-*a*)azepine). Los animales son observados durante un lapso de 30 minutos post inyección de PTZ para determinar la presencia o ausencia de algún episodio convulsivo. El PTZ provoca inicialmente sacudidas clónicas, que luego se hacen más sostenidas, y pueden conducir a un episodio tónico clónico. Como criterio para decidir protección o no frente a la convulsión, se toma la aparición de al menos un episodio clónico continuo de más de 5 segundos de duración. Este ensayo es utilizado para estudiar la capacidad de las drogas de proteger contra crisis de ausencia o mioclonías; sin embargo, varios FAEs que son capaces de suprimir la aparición de este tipo de episodios en pacientes (topiramato por ejemplo), fallan en la prueba del PTZ, por lo que es necesario el desarrollo de nuevos modelos capaces de predecir correctamente la eficacia de los FAEs contra la aparición de crisis no-convulsivas (Löscher, 2011).

En este trabajo de tesis, los candidatos seleccionados por cribado virtual han sido evaluados utilizando el ensayo MES. En algunos casos también se realizó el ensayo PTZ a fin de ampliar la información sobre el perfil farmacológico de algún candidato de interés; sin embargo, el modelo construido por Talevi y colaboradores ha sido desarrollado para identificar compuestos activos en el ensayo MES y el mismo es, por lo tanto, el modelo más relevante para validar el efecto anticonvulsivo predicho computacionalmente. Las pruebas farmacológicas se realizaron acorde a lo establecido por los procedimientos estándar del *Programa de Desarrollo de Fármacos Antiepilépticos del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (ADD-NIH)*<sup>30</sup>, además de respetarse las pautas internacionales para el uso de animales de laboratorio en ensayos biomédicos (CIOMS, 2012).

Para todos los ensayos se utilizaron ratones Swiss de entre 18 y 23 gramos de peso suministrados por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. Los ratones se alojan en jaulas para colonias en un cuarto con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas donde se los provee con agua y comida *ad libitum*. Las drogas testeadas fueron disueltas en solución salina o en PEG 30% dependiendo de su solubilidad acuosa.

---

<sup>30</sup> National Institute of Health, National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Anticonvulsant Screening Program. [http://www.ninds.nih.gov/research/asp/addadd\\_review.pdf](http://www.ninds.nih.gov/research/asp/addadd_review.pdf) (consultado en Septiembre de 2015)

Para evaluar protección frente al ensayo MES, se administró un volumen máximo de 10 mL de solución recientemente preparada por kilogramo de ratón mediante una inyección intra-peritoneal. EL ADD-NIH, en su primera fase, prevé la administración de tres dosis de la droga a evaluar: 30, 100 y 300 mg/Kg, evaluándose la actividad a 0.5 y 4 hs luego de la administración de la droga. Se considera promisorio a un compuesto activo que protege de la convulsión inducida a 30 o 100 mg/Kg, debiendo continuarse con las siguientes fases de evaluación en las que se determinan parámetros tales como tiempo de efecto máximo (*Time of Peak Effect*, TPE), la dosis efectiva 50 (ED<sub>50</sub>) y la dosis tóxica 50 (TD<sub>50</sub>). Posteriormente se avanza con el estudio sobre otras especies animales. La convulsión máxima por electrochoque es provocada en los ratones por medio del suministro de un estímulo eléctrico de 60 Hz/50 mA de 0.2 segundos de duración utilizando electrodos de oreja y generada por una unidad ECT 57800 de UGO Basile®. Para asegurar el contacto eléctrico se añade al ratón una gota de solución salina en cada oreja. En estas condiciones se producen convulsiones en virtualmente todos los ratones.

En el caso del ensayo scPTZ, luego de administrado el fármaco a evaluar se inyecta, a 0.5 y 4 hs, una solución de PTZ al 1.7% en solución salina 0.9% preparada en el momento, en un pliegue de piel en la línea media del cuello del ratón, en un volumen de 5 mL/Kg de peso. Tal y como se describió más arriba, los animales son observados por un lapso de 30 minutos luego de la inyección de PTZ para determinar si la sustancia ensayada como antiepiléptico es capaz de bloquear efectivamente el estímulo convulsivante del PTZ.

Se realizó además en todos los casos, el **ensayo de Rotorod**. Este ensayo evalúa el efecto neurotóxico, manifestado como sedación o ataxia, que podría provocar la droga administrada. Un ratón normal es capaz de mantener el equilibrio sobre un cilindro giratorio por largos períodos de tiempo. La inhabilidad de un ratón de mantener la caminata sobre el cilindro durante un minuto en cada uno de 3 ensayos sucesivos, se considera evidencia de que la sustancia administrada provoca sedación o ataxia. Se utiliza un equipo construido en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata a semejanza del *Rota-Rod treadmill for mice* Ugo Basile®. Este aparato consiste en un cilindro estriado de 3 cm de diámetro que gira a 6 rpm, sobre el cual se ubican los animales, separados unos de otros por paneles circulares. Los animales que caen, lo hacen sobre una bandeja situada debajo del cilindro.

## **Potencial de las sustancias seleccionadas para tratar epilepsias farmacorresistentes**

Luego de identificar cuáles de las sustancias seleccionadas presentan actividad antiepiléptica en alguno de los ensayos utilizados, debe estudiarse si las mismas poseen potencial para tratar casos refractarios en los que está involucrado una sobre-expresión de la P-gp. Para esto se utilizarán dos tipos de ensayos, uno *in vitro* utilizando mono-capas de células que sobre-expresan P-gp, y un ensayo *in vivo* utilizando un novedoso modelo de epilepsia refractaria en ratones.

### **Ensayo de transporte bidireccional en mono-capa de células MDCK II - MDR I**

Entre los distintos métodos que existen para determinar si el transporte de una sustancia a través de las barreras celulares se ve afectado por la P-gp (Schwab et al., 2003), los más utilizados por su fidelidad consisten en la medida directa de la permeabilidad de la sustancia a través de mono-capas de células. En estos ensayos se determina la relación entre el coeficiente de permeabilidad aparente para el transporte basolateral-apical (Papp B  $\rightarrow$  A) y el coeficiente de permeabilidad aparente para el transporte apical-basolateral (Papp A  $\rightarrow$  B) en presencia y ausencia de un inhibidor del transportador estudiado (Kuteykin-Teplyakov et al., 2010; Demel et al., 2008).

Para tal fin, la Administración de Drogas y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) recomienda el uso de mono-capas de células polarizadas que expresen P-gp humana (FDA, 2006). En este trabajo de tesis, se han seleccionado las *células renales caninas* Madin Darby tipo II transfectadas con el gen *MDR1* que codifica la P-gp humana (Madin-Darby canine kidney cells II, MDCK II-*MDR1*) las cuales presentan las características morfológicas y funcionales más importantes de las barreras epiteliales, entre ellas, uniones estrechas entre células adyacentes, y estructura cilíndrica polarizada con expresión de transportadores de eflujo en la superficie de su membrana apical; en este caso, las células presentan una sobre-expresión de P-gp la cual es demostrada mediante un ensayo de western blotting (Kuteykin-Teplyakov et al., 2010). El uso de células MDCK II presentan algunas ventajas operativas con respecto a otros tipos de células como las Caco-2, entre las que destaca sus menores tiempos de cultivo (Volpe, 2011).

El coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$   $10^{-6}$  cm/s) surge de medir la concentración de un compuesto que ha pasado desde una cámara dadora hacia una cámara aceptora a través de la mono-capa de células MDCK II-*MDR 1*, utilizando el tratamiento matemático del proceso de difusión pasiva, por lo que puede expresarse en términos de la ley de Fick (Rodríguez et al., 2011):



$$P_{app} = \frac{(dC/dt)}{A \cdot C_0}$$

donde  $(dC/dt)$  es el flujo de droga a través de la mono-capa celular ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}\text{s}^{-1}$ ),  $A$  es el área superficial de la mono-capa ( $\text{cm}^2$ ) y  $C_0$  es la concentración inicial de droga en la cámara apical ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). El flujo es calculado por medio de un análisis de regresión lineal múltiple basado en la pendiente obtenida de la gráfica que relaciona la cantidad de droga acumulada en la cámara basolateral con el tiempo. El parámetro  $P_{app}$  es medido para el transporte en dirección basolateral a apical (BA) y luego en la dirección opuesta, apical basolateral (AB). Una vez obtenidos los dos valores se calcula la relación entre ellos, la cual da la *tasa de eflujo* (efflux ratio, ER):

$$ER = P_{app} B \rightarrow A / P_{app} A \rightarrow B$$

valores de  $ER$  mayores a 2 sugieren que el compuesto está sujeto a transporte activo mediado por la P-gp expresada en la membrana apical de las células MDCK II (Broccatelli, 2012; Luna-Tortos et al., 2008) (debe señalarse, sin embargo, que las células epiteliales expresan otros sistemas de transporte además de P-gp, que podrían influir en el resultado observado; a fin de corroborar el aporte de la P-gp al resultado observado se repite el experimento en presencia de un inhibidor selectivo). La repetición del ensayo en presencia del inhibidor selectivo de P-gp (Clorhidrato de Amiodarona, en nuestro caso) (Palmeira et al., 2012) permite verificar que la diferencia de permeabilidad observada se debe al transporte activo mediado por dicho transportador (en caso de ser el fármaco sustrato de P-gp, el agregado del inhibidor selectivo elimina las diferencias de permeabilidad en dirección apical-basal con respecto a la dirección basal-apical) (Balayssac, 2005).

Dado que los ensayos de transporte en mono-capas de células son extremadamente sensibles a las condiciones de cultivo (Volpe, 2008), se ha utilizado un método estandarizado por el Instituto Nacional del Medicamento (INAME) que garantiza la reproducibilidad de las mediciones (Rodríguez et al., 2011). A continuación se detallan las condiciones experimentales utilizadas:

Las células MDCK II transfectadas (obtenidas del *Netherlands Cancer Institute*) se cultivan en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Culture Medium) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de glutamina y 1 % de penicilina/ estreptomina, a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad relativa, en botella de 25 cm<sup>2</sup>. Para el mantenimiento de la línea, mono-capas de aproximadamente 80 % de confluencia (ocupación de la superficie del soporte) se repican 2 veces por semana, disgregando con Tripsina-EDTA (0.25 %-0.02%). Para los experimentos se siembran 5.10<sup>4</sup> células (pasaje 23-43) sobre soportes semipermeables (membranas de policarbonato de 0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro de

poro), Snapwell® (Corning-Costar) de 1.13 cm<sup>2</sup> de superficie. Las células se cultivan durante 4 días y se cambia/renueva el medio periódicamente. El seguimiento del grado de confluencia y de la integridad de mono-capa se realiza por medición directa de la resistencia trans-epitelial (TEER) mediante el sistema Millicell ERS®. Para ensayar la permeabilidad se mide el flujo unidireccional de la droga en estudio. Los ensayos se realizan a 37 °C en solución de Hank's suplementada (HBSS) con glucosa 20 mM y NaHCO<sub>3</sub> 9 mM, pH 7,4. Los Snapwell se montan en cámaras de difusión vertical (sistema de cámaras Ussing de difusión vertical Harvard, Navicyte®). El flujo unidireccional  $dC/dt$  se mide a tiempo 20, 40, 60, 90, 100 y 120 min., dichas muestras se cuantifican mediante un equipo de HPLC equipado con un detector UV aplicando métodos analíticos que se describirán oportunamente.

### **Ensayo de las drogas en un modelo de convulsiones farmacorresistentes inducidas por ácido 3-mercaptopropiónico (3-MP)**

Ratones Swiss albinos de entre 25 y 30 mg/Kg de peso fueron administrados durante 10 días con 3-MP (30 mg/Kg; i.p.) induciendo crisis generalizadas diarias. Mediante este modelo se desarrolla resistencia adquirida frente a fenitoína (Höcht et al., 2009), la cual se encuentra asociada a la sobreexpresión de P-gp en estructuras neuronales tales como corteza cerebral, hipocampo y núcleo estriado. El día 10 se estudia el efecto protector de los candidatos seleccionados, registrando la aparición de cada fase de la crisis y su latencia según la siguiente escala: Fase 0: sin cambios – comportamiento normal; fase 1: movimientos de masticación, movimientos de orejas, nooding, guiño; fase 2: mioclonías; fase 3: crisis clónica de miembros anteriores; fase 4: crisis tónica generalizada. Posición de canguro; fase 5: crisis generalizada con pérdida de postura; fase 6: extensión tónica de miembros posteriores. La preservación de la actividad anticonvulsiva de los compuestos activos seleccionados en los ratones que han adquirido epilepsia refractaria mediada por P-gp tras administración reiterada de 3MP indicaría que los fármacos anticonvulsivos seleccionados en el cribado virtual no son sustratos de la P-gp y que son por tanto potenciales nuevos fármacos anticonvulsivos para el tratamiento de la epilepsia refractaria en humanos.

### **REFERENCIAS**

- Balayssac A., Authier N., Cayre A., Coudore F. Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug–drug interactions? *Toxicology Letters*, **156**(3): 319–329. (2005).
- Bialer M., & White H. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature Reviews on Drug Discovery*, **29**: 68–82. (2011).

Boccard J., Bajot F., Di Pietro A., Rudaz S., Boumendjel A., Nicolle E., Carrupt P. A 3D linear solvation energy model to quantify the affinity of flavonoid derivatives toward p glycoprotein. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **36**: 254–264. (2009).

Broccatelli F. QSAR Models for P-Glycoprotein Transport Based on a Highly Consistent Data Set. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **52**: 2462–2470. (2012).

Cabrera M., Gonzalez I., Fernandez C., Navarro C., Bermejo M. A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **95**: 589–606. (2006).

Cerqueira Lima P., Golbraikh A., Oloff S., Xiao Y., Tropsha A. Combinatorial QSAR modeling of P-glycoprotein substrates. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **46**: 1245–1254. (2006).

Chang C., Bahadduri P., Polli J., Swaan P., Ekins S. Rapid identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Drug Metabolism and Disposition*, **34**: 1876–1984. (2006).

Chufan E., Sim H., Ambudkar S. Molecular Basis of the Polyspecificity of P-Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies. *Advanced Cancer Research*, **125**: 71–96. (2015).

Cianchetta G., Singleton R., Zhang M., Wildgoose M., Giesing D., Fravolini A., Cruciani G., Vaz R. A pharmacophore hypothesis for P-glycoprotein substrate recognition using GRIND-based 3D-QSAR. *Journal of Medicinal Chemistry*, **48**: 2927–2935. (2005).

Claude N. Reducing the use of laboratory animals. *Bulletin d' le Academie Nationale de Medecine*, **193**: 1767–1772. (2009).

Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS) en colaboración la Organización mundial de la Salud. CIOMS International guiding principles for biomedical research involving animals. (2012).

De Long E., De Long D., Clarke-Pearson D. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*, **44**(3), 837–845. (1988).

Demel M., Schwaha R., Krämer O., Ettmayer P., Haaksma E., Ecker G. In silico prediction of substrate properties for ABC-muldrug transporters. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, **4**: 1167–1180. (2008).

Dimitrov S., Dimitrova G., Pavlov T., Dimitrova N., Patelwicz G., Niemela J., Mekenyan O. A stepwise approach for defining the applicability domain of SAR and QSAR models. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **45**: 839–849. (2005).  
Eisenhauer J. Regression through the Origin. *Teaching Statistics*, **25**: 76–80. (2003).

Ekins S., Kim R., Leake B., Dantzig A., Schuetz E., Lan L., Yasuda K., Shepard R., Winter M., Schuetz J., Wikel J., Wrigton S. Application of three-dimensional quantitative structure-activity relationships of P-glycoprotein inhibitors and substrates. *Molecular Pharmacology*, **61**: 974–981. (2002).

Everitt B., Landau S., Leese M., Stahl D. Optimization Clustering Techniques. En: Everitt (Ed.), *Cluster Analysis*, Wiley. pp. 111–142. (2011).

Food and Drug Administration (FDA) and U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for industry. Drug interaction studies – study design, data analysis, and implications for dosing and labeling. (2006).

Gasteiger J., Zupan, J. Neuronale Netze in der Chemie. *Angewandte Chemie*, **32**: 503. (1993).

Giacomini K., et al. Membrane transporters in drug development. *Nature Reviews on Drug Discovery*, **9**: 215–236. (2010).

Golbraikh A., Shen M., Xiao Z., Xiao Y., Lee K., Tropsha A. Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **17**: 241–253. (2003).

Golbraikh A., Tropsha A. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **16**: 357–369. (2002).

Gramatica P. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR & Combinatorial Sciences*, **26**: 694–701. (2007).

Gramatica P., & Papa E. QSAR Modeling of Bioconcentration Factor by theoretical molecular descriptors. *QSAR & Combinatorial Sciences*, **22**: 374–385. (2003).

Gramatica P., & Pilutti P. Evaluation of different statistical approaches for the validation of quantitative structure-activity relationships; The European

Commission - Joint Research Centre, Institute for Health & Consumer Protection - ECVAM: Ispra, Italy. (2004).

Hawkins D. The problema of overfitting. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **44**: 1–12. (2004).

Hochman J., Yamazaki M., Ohe T., Lin J. Evaluation of drug interactions with P-glycoprotein in drug discovery: in vitro assessment of the potential for drug-drug interactions with P-glycoprotein. *Current Drug Metabolism*, **3**: 257–273. (2002).

Höcht C., Lazarowski A., Gonzalez N., Mayer M., Opezzo J., Taira C., Girardi E. Differential hippocampal pharmacokinetics of phenobarbital and carbamazepine in repetitive seizures induced by 3-mercaptopropionic acid. *Neuroscience Letters*, **453**: 54–57. (2009).

Holliday J., Kanoulas E., Malim N., Willett P. Multiple search methods for similarity-based virtual screening: analysis of search overlap and precision. *Journal of Chemoinformatics*, **3**(1): 29. (2011).

Huang J., Ma G., Muhammad I., Cheng Y. Identifying P glycoprotein substrates using a support vector machine optimized by a particle swarn. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **47**: 1638–1647. (2007).

Hubbard R., & Bayarri M. Confusion over measures of evidence (p's) versus errors (alphas's) in classical statistical testing. *The American Statistician*, **57**: 171–178. (2003).

Irwin J., Sterling T., Mysinger M., Bolstad E., Coleman R. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **52**: 1757–1768. (2012).

Knox C., Law V., Jewison T., Liu P., Ly S., Frolkis A., Pon A., Banco K., Mak C., Neveu V., Djoumbou Y., Eisner R., Guo A., Wishart D. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Research*, **39**: D1035–1041. (2011).

Krall R., Penry J., White B., Kupferberg H., Swinyard E. Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening. *Epilepsia*, **19**: 409–28. (1978).

Kukol, A. Consensus virtual screening approaches to predict protein ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **46**(9): 4661–4664. (2011).

Kunal R., & Indrani M. On Various Metrics Used for Validation of Predictive QSAR Models with Applications in Virtual Screening and Focused Library Design. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **14**: 450–474. (2011).

Kunal R., Kar S. How to judge predictive quality of classification and regression based QSAR models. En: *Frontiers in Computational Chemistry*. Betham science pp. 71–120. (2014).

Kuteykin-Teplyakov K., Luna-Tortós C., Ambroziak K., & Löscher W. Differences in the expression of endogenous efflux transporters in *MDR1*-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport, *British Journal of Pharmacology*, **160**(6): 1453–1463. (2010).

Li W., Li L., Eksterowicz J., Ling X., Cardozo M. Significance analysis and multiple pharmacophore models for differentiating P-glycoprotein substrates. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **47**: 2429–2438. (2007).

Löscher W. Animal models of epilepsy and epileptic seizures. En: Eadie M., Vajda F., (eds.). *Antiepileptic drugs. Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer; pp: 19–62. (1999).

Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, **20**: 359–368. (2011).

Luna-Tortos C., Fedrowitz M., Loscher W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology*, **55**: 1364–1375. (2008).

Martin T., Harten P., Young D., Muratov E., Golbraikh A., Zhu H., Tropsha A. Does Rational Selection of Training and Test Sets Improve the Outcome of QSAR Modeling? *Journal of Chemical Information and Modeling*, **52**(10): 2570–2578. (2012).

Müller H., Pajeva I., Globisch C., Wiese M. Functional assay and structure-activity relationships of new third-generation P-glycoprotein inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **16**: 2448–2462. (2008).

Neyman J., & Pearson E. On the problem of the most efficient tests of statistical hypothesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **231**: 289–337. (1993).

Olsson I., Gottfries J., Wold S. D-Optimal Onion Designs in Statistical Molecular Design. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **73**: 37–46. (2004)

Partha Pratim R., Thomas L., Kunal R. Exploring the impact of size of training sets for the development of predictive QSAR models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **90**: 31–42. (2008).

Palmeira A., Sousa E., Vasconcelos M., Pinto M. Three Decades of P-gp Inhibitors: Skimming Through Several Generations and Scaffolds. *Current Medicinal Chemistry*, **19**: 1946-2025. (2012).

Peduzzi P., Concato J., Feinstein A., Holford T. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates. *Journal of Clinical Epidemiology*, **48**: 1503–1510. (1995).

Peduzzi P., Concato J., Kemper E., Holford T, Feinstein A.R. A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *Journal of Clinical Epidemiology*. **49**: 1373–1379. (1996).

Penzotti J., Lamb M., Evensen E., Grootenhuis P. A computational ensemble pharmacophore model for identifying substrates of P-glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**: 1737–1740. (2002).

Polli J., Wring S., Humphreys J., et al. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **299**: 620–628 (2001).

Raub T. P-glycoprotein recognition of substrates and circumvention through rational drug design. *Molecular Pharmacology*, **3**: 3–25. (2005).

Rawlings J., Pantula S., Dickey D. Regression Diagnostics, En: Rawlings J., et al. (eds.), *Applied Regression Analysis: A Research Tool*, Editorial Springer. pp. 369–377 (1998).

Rodríguez Y., Abalos I., Lozano V., Cereseto M., Silberman N., Chiale C., Gruñeiro E., Pesce G. Standardization of Caco-2 Cell Culture as *In Vitro* Model for Intestinal Permeability. *Latin American Journal of Pharmacy*, **30**(1): 33–38. (2011).

Rücker C., Rücker G., Meringe M. Y-Randomization and Its Variants in QSPR/QSAR. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **47**(6): 2345–2357. (2007).

Sastry G., Sandeep V., Sherman W. Boosting Virtual Screening Enrichments with Data Fusion: Coalescing Hits from Two-Dimensional Fingerprints, Shape, and Docking. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **53**: 1531–1542. (2013).

Schwab D., Fischer H., Tabatabaei A., Poli S., Huwyler J. Comparison of *in Vitro* P-glycoprotein screening assays: Recommendations for their use in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, **46**: 1716–1725. (2003).

Snarey, M.; Terrett, N. K.; Willet, P.; Wilton, D. J. Comparison of Algorithms for Dissimilarity-Based Compound Selection. *Journal of Molecular Graphics Modelling*, **15**: 372–385 (1997).

Srinivas E., Narashima Murthy J., Raghu Ram Rao R., Narahari Sastry G. Recent advances in molecular modeling and medicinal chemistry aspects of phosphoglycoprotein. *Current Drug Metabolism*, **7**: 205–217. (2006).

Talevi A., Bellera C., Castro E., Bruno-Blanch L. A successful virtual screening application: prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *Journal of Computed Aided Molecular Design*, **21**: 527–538. (2007).

Talevi A, Bellera C, Castro E, Bruno-Blanch L. Optimal partition of datasets of QSPR studies: a sampling problem. *MATCH Communications in Mathematical and in Computer Chemistry*, **63**: 585–599. (2010).

Talevi A., Castro E., Bruno-Blanch L. Towards Accurate Virtual Screening Technologies: Sampling of Chemical Space and Applicability Domain Estimation. En: *Chemical Information and Computational Challenges*, M. V. Putz (Ed.). Nova Science Publishers. pp. 277-297. (2012a).

Talevi A., Bellera C., Di Ianni M., Duchowicz P., Bruno-Blanch L., Castro E. An Integrated drug development approach applying topological descriptors. *Current Computer-Aided Drug Design*, **8** (3): 172–181. (2012b).

Tetko I., Sushko I., Kumar A., Zhu H., Tropsha A., Papa E., Öberg T., Todeschini R., Fourches D., Varnek A. Critical Assessment of QSAR Models of Environmental Toxicity against *Tetrahymena pyriformis*: Focusing on Applicability Domain and Overfitting by Variable Selection. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **48** (9): 1733–1746. (2008).

Todeschini R., & Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors*. Wiley-VCH: Weinheim. (2000).

Todeschini R., & Consonni V. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. (2009).



Triballeau N, Acher F, Brabet I, Pin J, Bertrand H. Virtual screening workflow development guided by the 'Receiver Operating Characteristic' Curve approach. Application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype- 4. *Journal of Medicinal Chemistry*, **48**: 2534–2547. (2005).

Tropsha A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Molecular Informatics*, **29**: 476–488. (2010).

Tropsha A., Gramatica P., Gombar K. The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models. *QSAR & Combinatorial Sciences*, **22**: 69–77. (2003).

Truchon J., & Bayly C. Evaluating virtual screening methods: good and bad metrics for the "early recognition" problem. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **47**: 488–508. (2007).

Van Waterbeemd H. Discriminant Analysis for Activity Prediction. En: V. W. H (Ed.), *Chemometric methods in molecular design* Wiley. pp. 265–282. (1995).

Volpe D. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Medicinal Chemistry*, **3**(16): 2063–2077. (2011).

Volpe D. Variability in Caco-2 and MDCK Cell-Based Intestinal Permeability Assays. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(2): 712–725. (2008).

Wang R., Kuo C., Lien L., Lien E. Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **28**: 203–228. (2003).

White H., Smith-Yockman M., Srivastava A., Wilcox K. Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. En: Pitkänen A., Schwartzkroin P., Moshe´ S., (eds.). *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier: Amsterdam; pp: 539–49. (2006).

Wiese M., Pajeva I. Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. *Current Medicinal Chemistry*, **8**: 685–713. (2001).

Xue Y., Yap C., Sun L., Cao Z., Wang J., Chen Y. Prediction of P-glycoprotein substrates by a support vector machine approach. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **44**: 1497–1505. (2002).

Yasri A., & Hartsough D. Toward an Optimal Procedure for Variable Selection and QSAR Model Building. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **41**: 1218–1227. (2001).

Yee L., & Wei Y. Current Modeling Methods Used in QSAR/QSPR, En: Dehmer M., et al. (eds.), *Statistical Modelling of Molecular Descriptors in QSAR/QSPR*. (2012).

Zalloum H., & Taha M. Development of predictive in silico model for cyclosporine- and aureobasidin-based P-glycoprotein inhibitors employing receptor surface analysis. *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, **27**: 439–451. (2008).

Zhang C., Kwan P., Zuo Z., Baum L. The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(10): 930–942. (2012).

Zhang L., Balimane P., Johnson S., Chong S. Development of an in silico model for predicting efflux substrates in Caco-2 cells. *International Journal of Pharmacy*, **343**: 98–105. (2007).

Zhang L., Zhang Y., Strong J., Reynolds K., Huang S A regulatory viewpoint on transporter-based drug interactions. *Xenobiotica*, **38**: 709–724. (2008).

Zupan J., Novic M., Ruisanchez I. Kohonen and Counter propagation Artificial Neural Networks in Analytical Chemistry. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **38**: 1–23. (1997).



“La clave está en lo que se enfatiza. O nos hacemos desdichados o nos hacemos fuertes. Cuesta el mismo trabajo lo uno que lo otro”.

*Viaje a Ixtlan.* Carlos Castaneda. 1973.

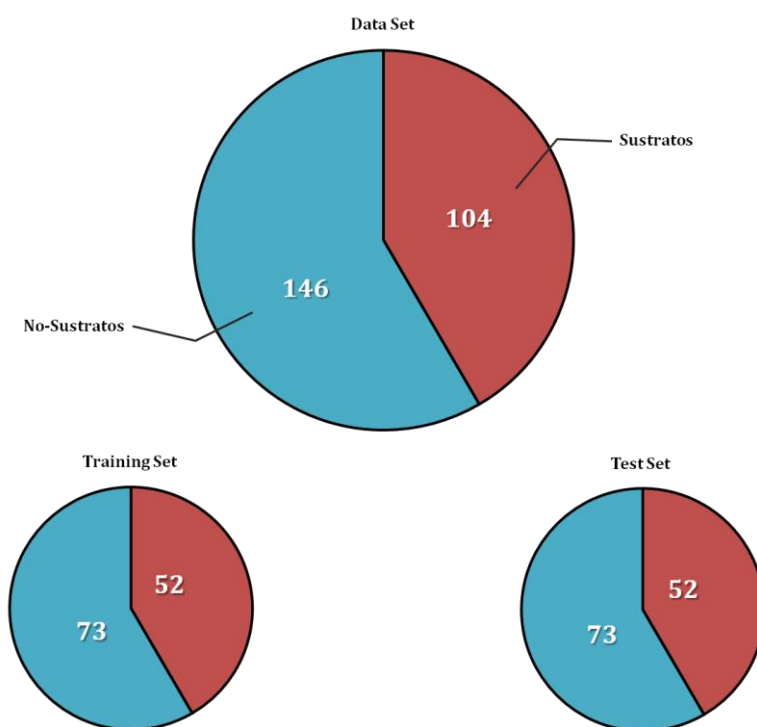


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las páginas que siguen se hará el desglose de los resultados obtenidos respetando el esquema de trabajo presentado en el capítulo anterior. Los mismos serán oportunamente apuntalados mediante las discusiones correspondientes.

### Construcción de la base de datos de sustratos y no-sustratos de P-gp

El análisis de las publicaciones científicas culminó en la obtención de un conjunto de 250 moléculas estructuralmente diversas y cubriendo un amplio espectro de categorías farmacológicas (ver Anexo) (Penzotti et al., 2002; Zhang et al., 2007; Chang et al., 2006; Mahar Doan et al., 2002). Mediante la técnica de muestreo al azar, fueron asignadas 125 estructuras al conjunto de entrenamiento y 125 al conjunto de prueba (Figura 1) (Talevi et al., 2010; Golbraikh et al., 2003; Golbraikh & Tropsha, 2002).



**Figura 1** | Composición y partición del dataset en conjuntos de entrenamiento y de prueba.

Dado que los detalles relacionados al cálculo de descriptores y digitalización de estructuras químicas ya fueron expuestos en el capítulo anterior, se avanzará directamente sobre los resultados asociados a las funciones discriminantes obtenidas.

## Generación y validación de los modelos

De cada uno de los 30 conjuntos aleatorios de descriptores se derivaron 3 modelos, uno con el nivel máximo de tolerancia de 0.5, un segundo de tolerancia intermedia de 0.35 y el tercero con tolerancia de 0.2. De estos 90 modelos generados, sólo uno presentó un desempeño estadístico acorde a los criterios de selección explicados en el capítulo anterior. A continuación el detalle del modelo:

### Modelo 1

$$FD = -4.45 + 0.63*IC3 - 0.94*nCN + 1.34*GATS4v - 0.01*T(N...Cl)$$

$$\beta = 0.5 \quad F = 12.13 \quad p < 0.00001$$

donde IC3 representa el índice de contenido de información considerando vecindades de tercer orden; nCN es el número de nitrilos alifáticos; GATS4v simboliza la auto-correlación de Geary de cuarto grado ponderada por los volúmenes atómicos de Van der Waals y; T(N...Cl) representa la distancia topológica entre los átomos de nitrógeno y cloro de las moléculas. La tasa de casos por descriptor del modelo 1 fue de 31.25 (Todeschini & Consonni, 2002; 2009).

Utilizando el cero como valor de corte, este modelo obtuvo un porcentaje global de buenas clasificaciones en el conjunto de entrenamiento de 78.4% (73.1% de sustratos bien clasificados y 82.2% de no sustratos bien clasificados) mientras que para el conjunto de prueba este porcentaje fue 77.6 (69.2% de sustratos bien clasificados y 83.6% de no sustratos bien clasificados). Durante la validación interna obtuvo un 76.6% (IC 95% = 75.6% - 77.6%)<sup>31</sup> global de buenas clasificaciones en la prueba LGO en tanto que dicho porcentaje cayó a 60.8% (IC 95% = 60.0% - 61.6%)<sup>1</sup> en la prueba de Fischer.

Como puede observarse, los porcentajes de buenas clasificaciones resultaron similares en los conjuntos de entrenamiento y de prueba, lo que sugiere ausencia de sobreajuste y adecuada capacidad de generalización, como permite anticipar la muy buena relación casos/descriptores. Tal y como se previó, el desempeño de los modelos utilizados en la prueba de aleatorización fue muy inferior y cercano al azar. Un análisis más profundo de estos modelos revela que los mismos clasifican correctamente en promedio al 89,5% de los no sustratos y sólo al 20.3% de los sustratos. En otras palabras, los modelos aleatorizados están fuertemente sesgados a asignar la categoría no sustrato a los compuestos por lo que puede inferirse que los mismos no poseen capacidad clasificatoria alguna.

---

<sup>31</sup> Intervalo de confianza del 95%

La diferencia que los modelos presentan para clasificar correctamente sustratos y no sustratos tanto en el training como en el test set ha sido observada en otros trabajos de modelado (Penzotti et al., 2002; Li et al., 2007). Esta cuestión puede atribuirse una vez más a la característica distintiva de la P-gp y de los transportadores ABC en general, su amplia especificidad de sustrato, planteándose la dificultad de encontrar predictores capaces de describir correctamente a todas las sustancias transportadas por este antiblanco molecular (Chufan et al., 2015). No obstante, la hipótesis anterior tropieza con su consecuencia recíproca, la cual suena un tanto ruidosa: si un porcentaje menor de sustratos bien clasificados se debe a la gran diversidad de los mismos transportados por la P-gp ¿entonces es más fácil encontrar predictores que describan eficientemente a todos los no sustratos a pesar de su lógica y natural diversidad estructural?

Es razonable pensar que, aun siendo la P-gp poli-específica, la probabilidad de que una sustancia sea reconocida específicamente por el transportador es menor que la probabilidad de que esta no sea reconocida, efectivamente, esto se ve reflejado en el *dataset*, donde la población de sustratos es menor con respecto a la de no sustratos (104 a 146). Sin embargo, observando la ordenada al origen del total de los modelos generados desde los conjuntos de descriptores aleatorios, se encontró que las mismas asumían valores negativos claramente alejados de cero, lo cual es consistente con el sesgo descrito. Para el modelo seleccionado la ordenada también es negativa y se aleja del origen (-4.45), lo que sugiere un posible sesgo hacia la clasificación de los no sustratos.

Con el objetivo de investigar si las observaciones anteriores responden a la naturaleza intrínseca del problema en cuestión (la poli-especificidad de sustrato) o a cuestiones asociadas a la sobre-representación de los no sustratos, se repitió el proceso de modelado utilizando los conjuntos de descriptores aleatorios pero esta vez forzando a las ecuaciones a adquirir el valor 0 cuando el valor de todos los demás términos de la misma son 0, es decir se las fuerza a pasar por el origen de coordenadas. Adicionalmente, el software permite fijar la probabilidad de clasificación *a priori* acorde a los requerimientos del usuario, para lo que en esta ocasión se configuro en la opción -igual para todos los grupos- dado que es imposible determinar a ciencia cierta si la distribución de clases en el *dataset* refleja la distribución real (por ejemplo, podría ocurrir que en la literatura se reporten más frecuentemente a los sustratos que a los no sustratos).

Esta metodología, aquí denominada “set on zero” y mencionada en los artículos especializados como “*Regression through the origin*” (regresión a través del origen) es utilizada en aquellos casos en los que la presencia de una constante en la ecuación carece absolutamente de sentido. Por ejemplo, en términos económicos, si la producción (Y) de determinado bien es una función lineal de los recursos materiales (X), la presencia de una constante en la ecuación implicaría la situación

irreal en la que es posible producir ese bien en ausencia total de recursos (Theil, 1971). En nuestro caso, la presencia de una constante introduce una tendencia hacia la clasificación de los no sustratos, por lo se justifica realizar este segundo experimento de modelado. Eisenhauer ha señalado que este método debe ser aplicado de manera cuidadosa y cotejando con el modelado original incluyendo la constante. Asimismo, sostiene que las cuestiones de estadística son tan científicas como artesanales y qué o qué no conviene hacer debe evaluarse caso por caso (Eisenhauer, 2003).

Aplicando la estrategia “set on zero”, de los 90 modelos generados, sólo 4 cumplieron con las condiciones preestablecidas. Los mismos se detallan a continuación.

### Modelo 2

$$FD = -0.40*nCl - 1.48*nTB + 2.70*MATS3p + 0.067*GGI2$$

$$\beta = 0.5 \quad F = 12.40 \quad p < 0.00001$$

donde nCl representa el número de átomos de cloro; nTB es el número de enlaces triples; MATS3p corresponde a la auto-correlación de Moran de grado 3 ponderada por la polarizabilidad atómica y; GGI2 es el índice topológico de carga de segundo orden de Gálvez. (Todeschini & Consonni, 2002; 2009). La tasa de casos por descriptor del modelo es de 31.25.

En este caso el porcentaje global de buenas clasificaciones en el conjunto de entrenamiento fue de 76.8% (71.2% de sustratos bien clasificados y 80.8% de no sustratos bien clasificados) mientras que para el conjunto de prueba fue 63.2% (67.3% de sustratos bien clasificados y 60.3% de no sustratos bien clasificados). Durante la validación interna obtuvo un 76.5% (IC 95% = 75.8% – 76.2%) global de buenas clasificaciones en la prueba LGO en tanto que dicho porcentaje cayó a 52.0% (IC 95% = 45% – 59%) en el test de aleatorización de Fischer.

### Modelo 3

$$FD = 0.41081*EEig14d - 1.38061*nCN - 1.26139*nSO2N - 0.01946.T(N...Cl) - 0.03033.T(O...Br) - 0.00000188.VRA1$$

$$\beta = 0.5 \quad F = 9.69 \quad p < 0.00001$$

donde EEig14d representa el auto-valor 14 derivado de la matriz de adyacencia ponderada por momentos dipolares; nCN es el número nitrilos alifáticos; nSO2N representa el número de grupos sulfonamida; T(N...Cl) simboliza la suma de las



distancias topológicas entre los átomos de nitrógeno y de cloro; T(O...Br) es la suma de las distancias topológicas entre los átomos de oxígeno y de bromo y; VRA1 corresponde al índice derivado de la matriz de adyacencia basado en auto-vectores de Randic (Todeschini & Consonni, 2002; 2009). La tasa de casos por descriptor del modelo 3 resultó ser 20.8.

Para el modelo 3, el porcentaje global de buenas clasificaciones en el conjunto de entrenamiento fue 76.0% (65, 4% para los sustratos y 83.6% para los no sustratos) mientras que para el conjunto de prueba el mismo fue 79.2% (76.1% para los sustratos y 83.6% para los no sustratos). Durante la validación interna este modelo obtuvo un 77.1% (IC 95% = 76.2% - 78.0%) global de buenas clasificaciones en la prueba LGO y un 54.7% (IC 95% = 48.9% - 60.5%) en la prueba de aleatorización.

#### Modelo 4

$$FD = -0.64*Y \text{ index} + 0.11*GGI2 - 0.75*S-108 - 1.28*nSO2N - 0.45*Cl-0.89 + 0.54*N-069 + 0.56*C-033 + 0.37*nRSR$$

$$\beta = 0.35 \quad F = 9.23 \quad p < 0.00001$$

donde Y index corresponde al índice Y de Balaban; S-108 representa el número de sustituyentes R=S; Cl-089 es el número de átomos de cloro unidos a carbonos sp<sup>2</sup>; N-069 indica el número aminas aromáticas primarias o el número de grupos amino unidos a átomos halógenos; C-033 simboliza el número de fragmentos X-CH...X (X=halógenos) y; nRSR es el número de sulfuros (Todeschini & Consonni, 2002; 2009). La tasa de casos por descriptor del modelo 4 fue de 15.6.

En este caso, el porcentaje global de buenas clasificaciones en el conjunto de entrenamiento fue 80.0% (73.1% para los sustratos y 84.9% para los no sustratos) mientras que para el conjunto de prueba fue 75.2% (65.4% para los sustratos y 82.1% para los no sustratos). Durante la validación interna este modelo obtuvo un 79.9% (IC 95% = 79.3% - 80.5%) global de buenas clasificaciones en la prueba LGO y un 58.3% (IC 95% = 54.0% - 62.6%) en la prueba de aleatorización.

#### Modelo 5

$$FD = -0.55*Y \text{ index} + 0.17*GGI2 - 0.61*S-108 - 1.23*nSO2N - 0.45*Cl-0.89 + 0.54*N-069 + 0.56*C-033 + 0.37*nRSR$$

$$\beta = 0.20 \quad F = 8.21 \quad p < 0.00001$$

aquí JGI2 representa el índice topológico de carga promedio de octavo orden de Gálvez y; nCONR2 corresponde al número de aminas alifáticas terciarias. El modelo 5 presenta una tasa de casos por descriptor de 12.5.

Este modelo obtuvo un porcentaje global de buenas clasificaciones en el conjunto de entrenamiento de 79.2% (82.2% para los sustratos y 75.0% para los no sustratos); para el conjunto de prueba este porcentaje fue de 72.8% (80.8% para los sustratos y 67.1% para los no sustratos). Para la validación interna el modelo 5 presentó un 79.7% (IC 95% = 79.0% – 80.4%) global de buenas clasificaciones en el test LGO mientras que los modelos aleatorizados mostraron un porcentaje global de buenas clasificaciones promedio de 60.9% (IC 95% = 57.7% – 64.1%).

Como puede observarse, dos de los modelos generados bajo esta estrategia, el modelo 2 y el modelo 5, lograron revertir la situación de sobre-clasificación de los no sustratos con respecto a los sustratos, obteniendo mayores porcentajes para estos últimos durante la validación externa. Puede decirse entonces que la metodología “set on zero” tuvo éxito en evitar el sesgo de los modelos hacia la clasificación de sustancias no transportadas por P-gp. Por otro lado, el experimento realizado refuerza el indicio de que los modelos tienden a obtener menores porcentajes de clasificaciones correctas para los sustratos a causa de la poli-especificidad del blanco molecular en estudio, ya que 3 de los 5 modelos obtenidos siguen clasificando mejor a los no sustratos.

Para el caso de los modelos derivados del conjunto racional de descriptores, la estrategia manual de remover sistemáticamente el primer descriptor incorporado por *stepwise forward* dio como resultado la obtención de 28 modelos, de los cuales sólo 2 superaron los ya mencionados criterios de selección. A continuación el detalle de los mismos.

### Modelo 6

$$FD = 14.16 + 0.0029*ATS8e - 0.9421*GATS3e + 0.3471*nCaH - 14.621*MATS2m + 0.2427*nCO - 1.3575*MATS6p$$

$$\beta = 0.50 \quad F = 7.23 \quad p < 0.00001$$

donde ATS8e corresponde a la auto-correlación de la estructura topológica de grado 8 de Broto-Moreau, ponderada por la polarizabilidad atómica; GATS3e simboliza la auto-correlación de Geary de grado 3 ponderada por electronegatividades de Sanderson; nCaH es el número de carbonos aromáticos (sp<sup>2</sup>) no sustituidos; MATS2m representa la auto-correlación de Moran de grado 2 ponderada por masas atómicas; nCO corresponde el número de grupos ceto alifáticos y; MATS6p representa la auto-correlación de Moran de grado 6

ponderada por polarizabilidades atómicas. La tasa de casos por descriptor del modelo fue de 20.8.

El modelo 6 obtuvo un porcentaje global de buenas clasificaciones en el conjunto de entrenamiento de 77.6% (67.3% para los sustratos y 84.9% para los no sustratos) y un 73.6% en el conjunto de prueba (61.5% para los sustratos y 82.2% para los no sustratos). Con respecto al desempeño durante la validación interna, este modelo sacó un 76.9% (IC 95% = 76.0% - 77.8%) global de buenas clasificaciones en la prueba LGO y un 55.4% (IC 95% = 49.5% - 61.3%) para los modelos aleatorizados.

### Modelo 7

$$FD = 20.61 + 0.12*nHAcc - 22.95*MATS2m + 0.042*mlogP^2 + 0.38*nCaH + 0.22*nCO$$

$$\beta = 0.50 \quad F = 7.77 \quad p < 0.00001$$

en este caso nHAcc corresponde al número de átomos aceptores de puentes de hidrógeno (nitrógeno, oxígeno o flúor); mlogP<sup>2</sup> representa el cuadrado del logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua de Moricguchi (Todeschini & Consonni, 2002; 2009). La tasa de casos por descriptor del modelo fue de 12.5.

Este último modelo obtuvo un porcentaje global de buenas clasificaciones en el conjunto de entrenamiento de 74.4% (65.4% para los sustratos y 80.8% para los no sustratos), en tanto que para el conjunto de prueba el mismo fue 79.2% (61.5% de los sustratos y 91.8% de los no sustratos). Durante la validación interna el modelo 7 obtuvo un 74,6% (IC 95% = 73.7% - 75.5%) global de buenas clasificaciones en la prueba LGO y un 45.8% (IC 95% = 37.5% - 54.1%) para los modelos aleatorizados.

El proceso de modelado planteado para el conjunto racional fue repetido utilizando la estrategia set on zero conduciendo a correlaciones estadísticamente no satisfactorias.

Es importante destacar que muchos de los descriptores incorporados en los modelos coinciden con los pares de átomos reportados en el trabajo de Wang y colaboradores en 2011 (Wang et al., 2011), en el cual realizan un análisis comparativo de la frecuencia de aparición de ciertos fragmentos estructurales en sustratos y no sustratos de P-gp. Por ejemplo, los fragmentos correspondientes a átomos de cloro, azufre, nitrilos alifáticos, enlaces triples carbono-carbono y grupos sulfonamida fueron identificados con mayor frecuencia en no sustratos que en sustratos, lo que concuerda con los descriptores nCl, nCN, nTB y nSO2N los

cuales aparecen restando en las FDs aquí obtenidas, en tanto que el descriptor nCO (número de grupos ceto alifáticos) que aparece sumando en las FDs, coincide con la identificación de una alta frecuencia de fragmentos conteniendo grupos ceto en los sustratos con respecto a los no sustratos.

### Valor de Corte. Combinación de modelos / Fusión de Datos

Como puede observarse en la tabla 1, con el esquema de combinación planteado en el capítulo anterior la situación más adecuada en términos de porcentaje de buenas clasificaciones se obtiene al combinar los modelos 2, 4 y 7, los cuales, juntos, obtienen el más alto porcentaje de sustratos bien clasificados, con la menor pérdida posible de no sustratos correctamente clasificados. Muy sucintamente, el esquema de combinación consiste en dos criterios:

-Si al menos uno de los modelos del par combinado asigna correctamente la categoría a un sustrato, entonces la combinación clasifica correctamente al compuesto.

- Si al menos uno de los modelos del par combinado asigna incorrectamente la categoría a un no sustrato, entonces la combinación falla en clasificar el compuesto.

Como ya se ha discutido anteriormente, y más aun en el caso de la P-gp, el modelado por ensamblado conduce a un aumento significativo de la capacidad predictiva de los modelos (Penzotti et al., 2002; Li et al., 2007; Leong et al., 2012).

|   | 1+2   | 1+3   | 1+4   | 1+5   | 2+3   | 2+4   | 2+5   | 3+4   | 3+5   | 4+5   |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 57.53 | 78.08 | 78.08 | 64.38 | 56.16 | 56.16 | 47.95 | 75.34 | 64.38 | 67.12 |
| B | 84.62 | 78.85 | 78.85 | 84.62 | 84.62 | 88.46 | 88.46 | 82.69 | 84.62 | 84.62 |
| C | 68.80 | 78.40 | 78.40 | 72.80 | 68.00 | 69.60 | 64.80 | 78.40 | 72.80 | 74.40 |

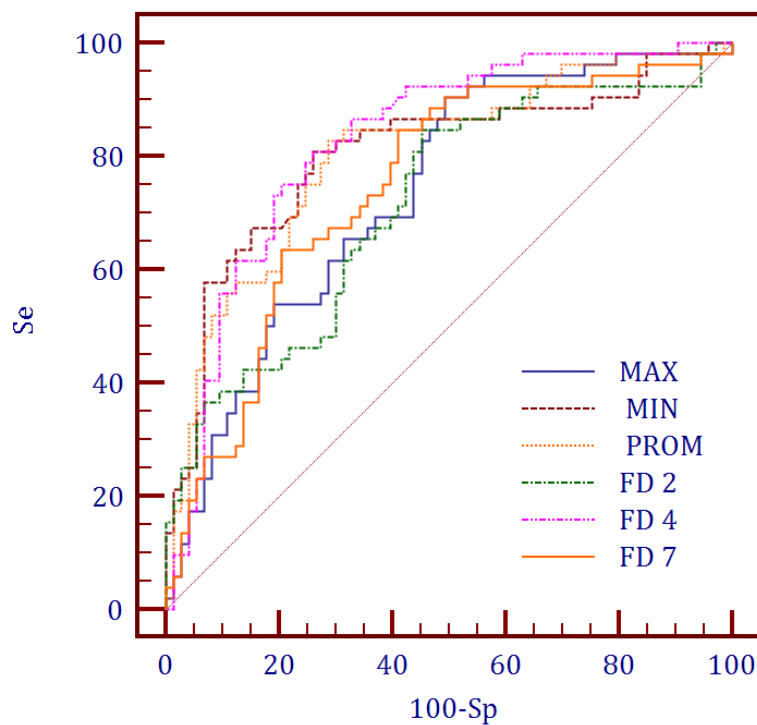
|   | 2+4+6 | 2+4+7 |
|---|-------|-------|
| A | 52.05 | 50.68 |
| B | 88.46 | 90.38 |
| C | 67.20 | 67.20 |

**Tabla 1|** Resultados de la combinación sistemática de las mejores FDs obtenidas (1–7). La tabla de arriba indica la combinación en pares de modelos derivados de los conjuntos de descriptores aleatorios. La combinación del mejor par de estos modelos con los derivados del pool racional se muestra en la tabla de abajo. La columna recuadrada indica la mejor combinación en cada caso. A = % de no sustratos correctamente clasificados; B = % de sustratos correctamente clasificados y; C = % global de buenas clasificaciones. A, B y C corresponden al desempeño obtenido utilizando los compuestos del conjunto de prueba.

La combinación de las FDs del ensamble a través de los esquemas de fusión de datos mencionados en el capítulo anterior fue estudiada mediante la construcción de las curvas ROC correspondientes, las cuales permitieron por un lado identificar el esquema de fusión más apropiado para filtrar las bases de datos, y por otro establecer el valor de corte de dicha combinación. A continuación, el detalle del análisis.

Para la construcción de las curvas ROC se utilizó el programa MedCalc 12.5 (MedCalc Software © 1993–2013), el cual compara estadísticamente las áreas bajo la curva (AUC) mediante el método de De Long (De Long et al., 1988).

El resultado de la comparación de todos los esquemas de clasificación involucrados en el ensamble se muestra en la figura 2.



**Figura 2** | Comparación del desempeño de los modelos individuales del ensamble y de los esquemas de fusión en el conjunto de prueba, mediante la construcción de curvas ROC.

En la tabla 2 se muestran los valores de las AUC de cada uno de los clasificadores y los *p-valores* asociados a las comparaciones estadísticas entre las mismas. Si bien el modelo 4 obtiene el mejor resultado (la mayor AUC), indicando que posee el mayor poder discriminante de entre todos los clasificadores comparados, no existen diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% con los esquemas de fusión promedio y mínimo. Observando que el primero de estos esquemas permite un mejor balance entre los errores tipo I y tipo II cuando se intenta minimizar la aparición de falsos positivos (aumentando Sp) (tabla 3) se ha adoptado al esquema de fusión por promedio (PROM) como herramienta para

ejecutar el cribado virtual. Mediante la inspección de la curva ROC individual para este algoritmo se ha fijado como valor de corte a  $-0.436$ . La gráfica de la curva del algoritmo PROM se muestra en la figura 3.

| <b>Clasificador</b> | <b>AUC<sup>a</sup></b> | <b>DE</b> | <b>p-valor (AUC =0.5)</b> |
|---------------------|------------------------|-----------|---------------------------|
| <b>MAX</b>          | 0.734                  | 0.501     | <0.0001                   |
| <b>MIN</b>          | 0.803                  | 0.480     | <0.0001                   |
| <b>PROM</b>         | 0.802                  | 0.458     | <0.0001                   |
| <b>FD 2</b>         | 0.715                  | 0.529     | <0.0001                   |
| <b>FD 4</b>         | 0.826                  | 0.421     | <0.0001                   |
| <b>FD 7</b>         | 0.747                  | 0.503     | <0.0001                   |

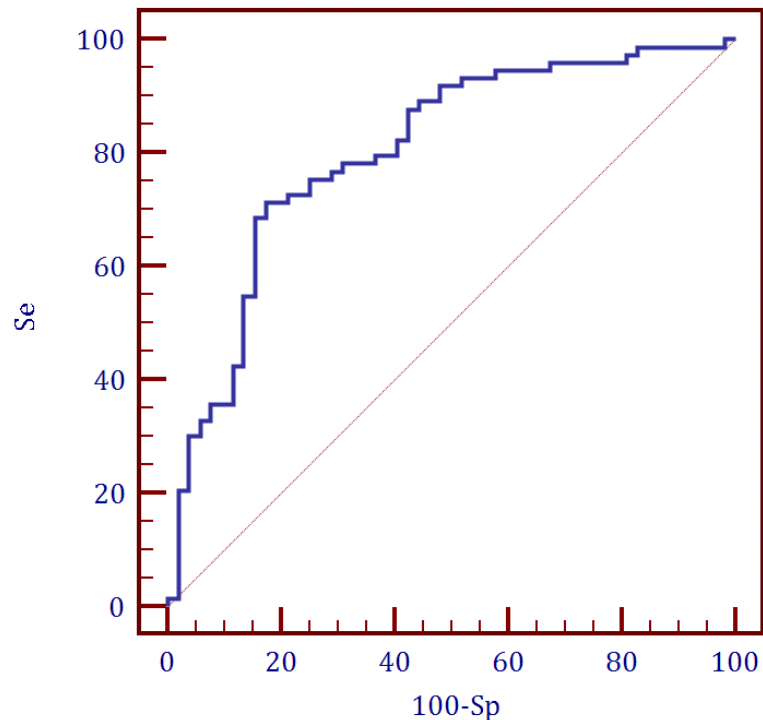
<sup>a</sup> DeLong et al., 1988.

| <i>p-valor</i> | <b>MAX</b> | <b>MIN</b> | <b>PROM</b> | <b>FD 2</b> | <b>FD 4</b> | <b>FD 7</b> |
|----------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>MAX</b>     | –          | 0.0717     | 0.0129      | 0.6351      | 0.0057      | 0.6902      |
| <b>MIN</b>     | 0.0717     | –          | 0.9646      | 0.0139      | 0.4871      | 0.0784      |
| <b>PROM</b>    | 0.0129     | 0.9646     | –           | 0.0098      | 0.3589      | 0.0477      |
| <b>FD 2</b>    | 0.6351     | 0.0139     | 0.0098      | –           | 0.0199      | 0.537       |
| <b>FD 4</b>    | 0.0057     | 0.4871     | 0.3589      | 0.0199      | –           | 0.0313      |
| <b>FD 7</b>    | 0.6902     | 0.0784     | 0.0477      | 0.537       | 0.0313      | –           |

**Tabla 2**| Arriba se muestran las áreas bajo la curva para los modelos individuales y su combinación durante la clasificación de los compuestos del test set. AUC = área bajo la curva; DE = desviación estándar; p-valor= p-valor asociado a la comparación entre el AUC de cada clasificador con la obtenida al azar (0.5). Abajo se muestran los resultados de la comparación estadística de las AUC de los clasificadores utilizando un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 bajo el método de DeLong, los valores sombreados indican un  $p < 0.05$  con la consecuente existencia de diferencias significativas entre las AUC.

| Curva ROC MIN  |       |       | Curva ROC PROM |       |       |
|----------------|-------|-------|----------------|-------|-------|
| Valor de Corte | Se    | Sp    | Valor de Corte | Se    | Sp    |
| <-5.033        | 0     | 100   | <-1.9799       | 0     | 100   |
| ≤-1.9905       | 4.11  | 100   | ≤-1.9799       | 1.37  | 100   |
| ≤-1.8238       | 4.11  | 98.08 | ≤-1.5162       | 1.37  | 98.08 |
| ≤-1.3792       | 15.07 | 98.08 | ≤-0.6831       | 20.55 | 98.08 |
| ≤-1.2334       | 15.07 | 94.23 | ≤-0.6796       | 20.55 | 96.15 |
| ≤-1.1995       | 16.44 | 94.23 | ≤-0.5565       | 30.14 | 96.15 |
| ≤-1.173        | 16.44 | 90.38 | ≤-0.5418       | 30.14 | 94.23 |
| ≤-0.9619       | 24.66 | 90.38 | ≤-0.4798       | 32.88 | 94.23 |
| ≤-0.9572       | 24.66 | 88.46 | ≤-0.4576       | 32.88 | 92.31 |
| ≤-0.7379       | 41.1  | 88.46 | ≤-0.436        | 35.62 | 92.31 |
| ≤-0.7379       | 41.1  | 86.54 | ≤-0.4182       | 35.62 | 88.46 |
| ≤-0.48         | 60.27 | 86.54 | ≤-0.3501       | 42.47 | 88.46 |
| ≤-0.477        | 60.27 | 84.62 | ≤-0.3481       | 42.47 | 86.54 |
| ≤-0.4481       | 65.75 | 84.62 | ≤-0.2675       | 54.79 | 86.54 |
| ≤-0.44         | 65.75 | 82.69 | ≤-0.258        | 54.79 | 84.62 |
| ≤-0.3884       | 69.86 | 82.69 | ≤-0.1738       | 68.49 | 84.62 |
| ≤-0.3756       | 69.86 | 80.77 | ≤-0.1685       | 68.49 | 82.69 |
| ≤-0.3374       | 73.97 | 80.77 | ≤-0.1625       | 71.23 | 82.69 |
| ≤-0.3182       | 73.97 | 76.92 | ≤-0.1319       | 71.23 | 78.85 |
| ≤-0.3153       | 75.34 | 76.92 | ≤-0.1245       | 72.6  | 78.85 |
| ≤-0.3141       | 75.34 | 75    | ≤-0.1016       | 72.6  | 75    |
| ≤-0.3054       | 76.71 | 75    | ≤-0.1005       | 75.34 | 75    |
| ≤-0.2875       | 76.71 | 69.23 | ≤-0.0956       | 75.34 | 71.15 |
| ≤-0.2848       | 78.08 | 69.23 | ≤-0.0824       | 76.71 | 71.15 |
| ≤-0.2842       | 79.45 | 67.31 | ≤-0.0718       | 76.71 | 69.23 |
| ≤-0.253        | 84.93 | 67.31 | ≤-0.0704       | 78.08 | 69.23 |
| ≤-0.2332       | 84.93 | 63.46 | ≤-0.0368       | 78.08 | 63.46 |
| ≤-0.2155       | 87.67 | 63.46 | ≤-0.0323       | 79.45 | 63.46 |
| ≤-0.2106       | 87.67 | 61.54 | ≤-0.0247       | 79.45 | 59.62 |
| ≤-0.2044       | 89.04 | 61.54 | ≤-0.0215       | 82.19 | 59.62 |
| ≤-0.1653       | 89.04 | 57.69 | ≤-0.0179       | 82.19 | 57.69 |
| ≤-0.1172       | 93.15 | 57.69 | ≤0.0606        | 87.67 | 57.69 |
| ≤0.0081        | 93.15 | 34.62 | ≤0.0696        | 87.67 | 55.77 |
| ≤0.0375        | 94.52 | 34.62 | ≤0.0734        | 89.04 | 55.77 |
| ≤0.1324        | 94.52 | 25    | ≤0.1166        | 89.04 | 51.92 |
| ≤0.1382        | 95.89 | 25    | ≤0.1324        | 91.78 | 51.92 |

**Tabla 3|** Valores de Se y Sp de las curvas ROC de los algoritmos MIN y PROM. Como puede observarse, fijando un valor alto de Sp (> 90% por ejemplo), el algoritmo PROM ofrece un mejor balance entre ambos parámetros. En base a esto, se ha fijado el valor -0.436 como criterio de corte.



**Figura 3** | Gráfica de la curva ROC del esquema de fusión PROM. AUC = 0.802

Como puede observarse en la tabla 3, el valor de corte seleccionado corresponde a una Se de 35,62% y a una Sp de 92.31%. Los compuestos de las bases de datos tamizadas posteriormente serán entonces examinados observando el valor que asumen para las FDs 2, 4 y 7. Si tras promediar estos valores, el resultado fue menor a -0.436, el compuesto se clasificará como no sustrato, si resulta mayor, como sustrato.

Antes de continuar hacia la presentación de los resultados obtenidos al aplicar el ensamble de FDs formulado, es adecuado realizar una pequeña revisión crítica con respecto a los modelos obtenidos.

Los resultados indican que los modelos individuales presentan un desempeño similar a los modelos previamente reportados para reconocer sustratos de P-gp (Penzotti et al., 2002; Xue et al., 2002; Cerqueira Lima et al., 2006; Cianchetta et al., 2005; Zhang et al., 2007; Li et al., 2007; Chang et al., 2006; Ekins et al., 2002; Wang et al., 2003; Boccard et al., 2009; Zalloum & Taha, 2008; Müller et al., 2008; Cabrera et al., 2006).

Como puede observarse en la sección anterior, el porcentaje global de buenas clasificaciones de todos los modelos, cuando se utiliza como valor de corte 0, ronda el 80%. Además, la mayoría de ellos muestran desempeños similares en el conjunto de entrenamiento y en el de prueba, hecho que refleja que el poder explicativo de las FDs es similar a su poder predictivo, por lo que los modelos están exentos de sobre-ajuste.



La tabla 4 muestra los p-valores resultantes de comparar las AUC que los modelos obtienen en el conjunto de entrenamiento y en el de prueba. Salvo para el modelo 5, no existen diferencias significativas entre los desempeños en el training y test set utilizando un nivel de significancia del 95%.

| <b>Modelo</b> | <b><i>p</i>-valor</b> |
|---------------|-----------------------|
| <b>1</b>      | 0.7521                |
| <b>2</b>      | 0.0612                |
| <b>3</b>      | 0.2809                |
| <b>4</b>      | 0.3462                |
| <b>5</b>      | 0.0319                |
| <b>6</b>      | 0.8932                |
| <b>7</b>      | 0.5502                |

**Tabla 4|** Comparación modelo a modelo entre las AUC obtenidas para el conjunto de entrenamiento y conjunto de prueba.  $p < 0.05$  indica diferencias significativas. Para el modelo 5 el sobre-ajuste es evidente.

Mediante la prueba de validación interna LGO se pudo demostrar la robustez de las FDs en tanto que el desempeño promedio de los modelos aleatorizados, el cual fue malo en todos los casos, comprueba que las correlaciones halladas no se deben al azar, es más, en algunos casos el desempeño de estos modelos aumenta a causa de que presentan un fuerte sesgo hacia la clasificación de los no-sustratos (estando los mismos sobrerrepresentados en el *dataset*) indicando ausencia total de capacidad clasificatoria.

La estrategia set on zero parece ser eficiente cuando se derivan modelos de los conjuntos de descriptores aleatorios: se encontró mayor cantidad de modelos relevantes y, dos de ellos, lograron revertir el sesgo hacia la identificación de los no sustratos en el test set. El experimento set on zero demuestra que parte del sesgo hacia la clasificación de los no sustratos puede ser explicada por la composición desigual del dataset, en tanto que la diferencia en el éxito clasificatorio entre ambas categorías puede ser atribuida a la poli-especificidad de P-gp.

Todos los modelos presentan buenos valores de tolerancia (seis de los siete presentaron valores por encima de 0.35), lo que indica una muy baja redundancia entre los aportes de los descriptores incorporados a los modelos, lo que puede observarse en las matrices de correlación mostradas a continuación donde los valores contenidos en las mismas representan los coeficientes de correlación entre los descriptores de los distintos modelos. El desempeño de los modelos es similar al límite superior de 85% calculado por Zhang en base a la gran variabilidad experimental en los datos asociados a ensayos de transporte por P-gp (Zhang et al., 2007).

Matriz de correlación **modelo 1**

|                  | <b>IC3</b> | <b>nCN</b> | <b>GATS4v</b> | <b>T(N...Cl)</b> |
|------------------|------------|------------|---------------|------------------|
| <b>IC3</b>       | 1.0000     | 0.0781     | 0.1028        | -0.0989          |
| <b>nCN</b>       | 0.0781     | 1.0000     | -0.1198       | -0.0105          |
| <b>GATS4v</b>    | 0.1028     | -0.1198    | 1.0000        | -0.0298          |
| <b>T(N...Cl)</b> | -0.0989    | -0.0105    | -0.0298       | 1.0000           |

Matriz de correlación **modelo 2**

|               | <b>nCL</b> | <b>GGI2</b> | <b>MATS3p</b> | <b>nTB</b> |
|---------------|------------|-------------|---------------|------------|
| <b>nCL</b>    | 1.0000     | -0.1849     | 0.0913        | -0.0505    |
| <b>GGI2</b>   | -0.1849    | 1.0000      | 0.1862        | -0.0162    |
| <b>MATS3p</b> | 0.0913     | 0.1862      | 1.0000        | 0.3883     |
| <b>nTB</b>    | -0.0505    | -0.0162     | 0.3883        | 1.0000     |

Matriz de correlación **modelo 3**

|                 | <b>nCN</b> | <b>nSO2N</b> | <b>T(O..Br)</b> | <b>VRA1</b> | <b>T(N..Cl)</b> | <b>EEig14d</b> |
|-----------------|------------|--------------|-----------------|-------------|-----------------|----------------|
| <b>nCN</b>      | 1.0000     | -0.0410      | -0.0277         | -0.0296     | -0.0105         | 0.1914         |
| <b>nSO2N</b>    | -0.0410    | 1.0000       | -0.0166         | -0.0129     | -0.0457         | 0.0616         |
| <b>T(O..Br)</b> | -0.0277    | -0.0166      | 1.0000          | -0.0111     | -0.0308         | 0.1147         |
| <b>VRA1</b>     | -0.0296    | -0.0129      | -0.0111         | 1.0000      | -0.0334         | 0.1288         |
| <b>T(N..Cl)</b> | -0.0105    | -0.0457      | -0.0308         | -0.0334     | 1.0000          | -0.1873        |
| <b>EEig14d</b>  | 0.1914     | 0.0616       | 0.1147          | 0.1288      | -0.1873         | 1.0000         |

Matriz de correlación **modelo 4**

|               | <b>Yindex</b> | <b>GGI2</b> | <b>S-108</b> | <b>nSO2N</b> | <b>Cl-089</b> | <b>N-069</b> | <b>C-033</b> | <b>nRSR</b> |
|---------------|---------------|-------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|-------------|
| <b>Yindex</b> | 1.0000        | -0.5250     | 0.0164       | -0.1126      | 0.0648        | 0.1635       | -0.0863      | -0.0975     |
| <b>GGI2</b>   | -0.5250       | 1.0000      | 0.0163       | 0.0046       | -0.1515       | -0.0327      | -0.1192      | -0.0244     |
| <b>S-108</b>  | 0.0164        | 0.0163      | 1.0000       | -0.0462      | 0.1135        | -0.0775      | -0.0623      | -0.0774     |
| <b>nSO2N</b>  | -0.1126       | 0.0046      | -0.0462      | 1.0000       | -0.0501       | -0.0412      | 0.1393       | -0.0411     |
| <b>Cl-089</b> | 0.0648        | -0.1515     | 0.1135       | -0.0501      | 1.0000        | 0.1403       | -0.0055      | -0.0364     |
| <b>N-069</b>  | 0.1635        | -0.0327     | -0.0775      | -0.0412      | 0.1403        | 1.0000       | -0.0554      | -0.0689     |
| <b>C-033</b>  | -0.0863       | -0.1192     | -0.0623      | 0.1393       | -0.0055       | -0.0554      | 1.0000       | -0.0554     |
| <b>nRSR</b>   | -0.0975       | -0.0244     | -0.0774      | -0.0411      | -0.0364       | -0.0689      | -0.0554      | 1.0000      |

Matriz de correlación **modelo 5**

|               | <b>Yindex</b> | <b>GGI2</b> | <b>JGI8</b> | <b>nCONR2</b> | <b>nRSR</b> | <b>nSO2N</b> | <b>C-033</b> | <b>N-069</b> | <b>CI-089</b> | <b>S-108</b> |
|---------------|---------------|-------------|-------------|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| <b>Yindex</b> | 1.0000        | -0.5250     | -0.3921     | -0.1124       | -0.0975     | -0.1126      | -0.0863      | 0.1635       | 0.0648        | 0.0164       |
| <b>GGI2</b>   | -0.5250       | 1.0000      | 0.2624      | 0.0278        | -0.0244     | 0.0046       | -0.1192      | -0.0327      | -0.1515       | 0.0163       |
| <b>JGI8</b>   | -0.3921       | 0.2624      | 1.0000      | -0.0224       | 0.0815      | 0.0259       | -0.0401      | 0.0886       | 0.0385        | 0.0654       |
| <b>nCONR2</b> | -0.1124       | 0.0278      | -0.0224     | 1.0000        | 0.1706      | -0.0584      | -0.0786      | -0.0977      | 0.0476        | 0.1516       |
| <b>nRSR</b>   | -0.0975       | -0.0244     | 0.0815      | 0.1706        | 1.0000      | -0.0411      | -0.0554      | -0.0689      | -0.0364       | -0.0774      |
| <b>nSO2N</b>  | -0.1126       | 0.0046      | 0.0259      | -0.0584       | -0.0411     | 1.0000       | 0.1393       | -0.0412      | -0.0501       | -0.0462      |
| <b>C-033</b>  | -0.0863       | -0.1192     | -0.0401     | -0.0786       | -0.0554     | 0.1393       | 1.0000       | -0.0554      | -0.0055       | -0.0623      |
| <b>N-069</b>  | 0.1635        | -0.0327     | 0.0886      | -0.0977       | -0.0689     | -0.0412      | -0.0554      | 1.0000       | 0.1403        | -0.0775      |
| <b>CI-089</b> | 0.0648        | -0.1515     | 0.0385      | 0.0476        | -0.0364     | -0.0501      | -0.0055      | 0.1403       | 1.0000        | 0.1135       |
| <b>S-108</b>  | 0.0164        | 0.0163      | 0.0654      | 0.1516        | -0.0774     | -0.0462      | -0.0623      | -0.0775      | 0.1135        | 1.0000       |

Matriz de correlación **modelo 6**

|               | <b>nCO</b> | <b>nCaH</b> | <b>ATS8e</b> | <b>MATS2m</b> | <b>MATS6p</b> | <b>GATS3e</b> |
|---------------|------------|-------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>nCO</b>    | 1.0000     | 0.0555      | 0.1403       | -0.0673       | 0.1005        | -0.0166       |
| <b>nCaH</b>   | 0.0555     | 1.0000      | -0.0925      | 0.0666        | -0.2094       | 0.0630        |
| <b>ATS8e</b>  | 0.1403     | -0.0925     | 1.0000       | -0.1627       | 0.1943        | 0.1509        |
| <b>MATS2m</b> | -0.0673    | 0.0666      | -0.1627      | 1.0000        | -0.1117       | 0.1007        |
| <b>MATS6p</b> | 0.1005     | -0.2094     | 0.1943       | -0.1117       | 1.0000        | 0.0046        |
| <b>GATS3e</b> | -0.0166    | 0.0630      | 0.1509       | 0.1007        | 0.0046        | 1.0000        |

Matriz de correlación **modelo 7**

|               | <b>nHAcc</b> | <b>nCO</b> | <b>nCaH</b> | <b>MLOGP2</b> | <b>MATS2m</b> |
|---------------|--------------|------------|-------------|---------------|---------------|
| <b>nHAcc</b>  | 1.0000       | 0.0869     | 0.0433      | -0.4502       | 0.1873        |
| <b>nCO</b>    | 0.0869       | 1.0000     | 0.0555      | -0.1613       | -0.0673       |
| <b>nCaH</b>   | 0.0433       | 0.0555     | 1.0000      | -0.1650       | 0.0666        |
| <b>MLOGP2</b> | -0.4502      | -0.1613    | -0.1650     | 1.0000        | -0.0888       |
| <b>MATS2m</b> | 0.1873       | -0.0673    | 0.0666      | -0.0888       | 1.0000        |

La combinación de tres modelos planteada incluye a uno de los modelos derivados del pool racional. La especificidad de los modelos fue incrementada a expensas de su sensibilidad. Se encontró que el algoritmo de fusión por promedio fue el más adecuado para llevar a cabo el cribado virtual. Finalmente, mediante la observación de las curvas ROC, fue determinado el criterio de corte del ensamble.

A continuación se presentan los resultados correspondientes a la ejecución del cribado virtual propiamente dicho.

## Cribado virtual

Además de las bases de datos ZINC 5.0 (Irwin et al., 2012) y DrugBank 3.0 (Knox et al., 2011), se construyó una pequeña base de datos con todas aquellas sustancias obtenidas por síntesis orgánica o por cribado virtual en nuestro laboratorio que hayan demostrado resultados positivos en los ensayos farmacológicos realizados para detectar actividad antiepiléptica. Entre otras moléculas incorporadas, se encuentran edulcorantes artificiales y conservantes químicos (Talevi et al., 2007; Talevi et al., 2012).

Entre las tres bases de datos seleccionadas (>20 millones de estructuras), el número de compuestos químicos clasificados como activos frente al ensayo MES fue de 3383. Tras aplicar el ensamble de modelos desarrollados en este trabajo, fueron retenidas 1363 estructuras químicas, las cuales fueron sometidas al análisis de ámbito de aplicabilidad por el método de la palanca (Tropsha et al., 2003).

Primero fueron separadas las moléculas que entran en el ámbito de aplicabilidad de la FD de MES (quedando 998 estructuras) y luego, se realizó el análisis para los 3 modelos del ensamble de P-gp. El resultado fue la aparición de cuatro categorías de candidatos:

**Categoría A:** el candidato antoconvulsivo es clasificado como no sustrato de P-gp por los 3 modelos del ensamble y además entra en el ámbito de aplicabilidad de cada uno de ellos, en consecuencia, la predicción posee la máxima confiabilidad.

**Categoría B:** el candidato es clasificado como no sustrato de P-gp por al menos 2 de los modelos y además entra en el ámbito de aplicabilidad de dos de los modelos que lo clasifican como no sustrato.

**Categoría C:** el candidato es clasificado como no sustrato de P-gp por al menos uno de los modelos y además entra en el ámbito de aplicabilidad del o los modelo/s que lo clasifica/n como sustrato.

**Categoría D:** el candidato no entra en el ámbito de aplicabilidad de ningún modelo a pesar de ser clasificado como no sustrato por uno o más de ellos.

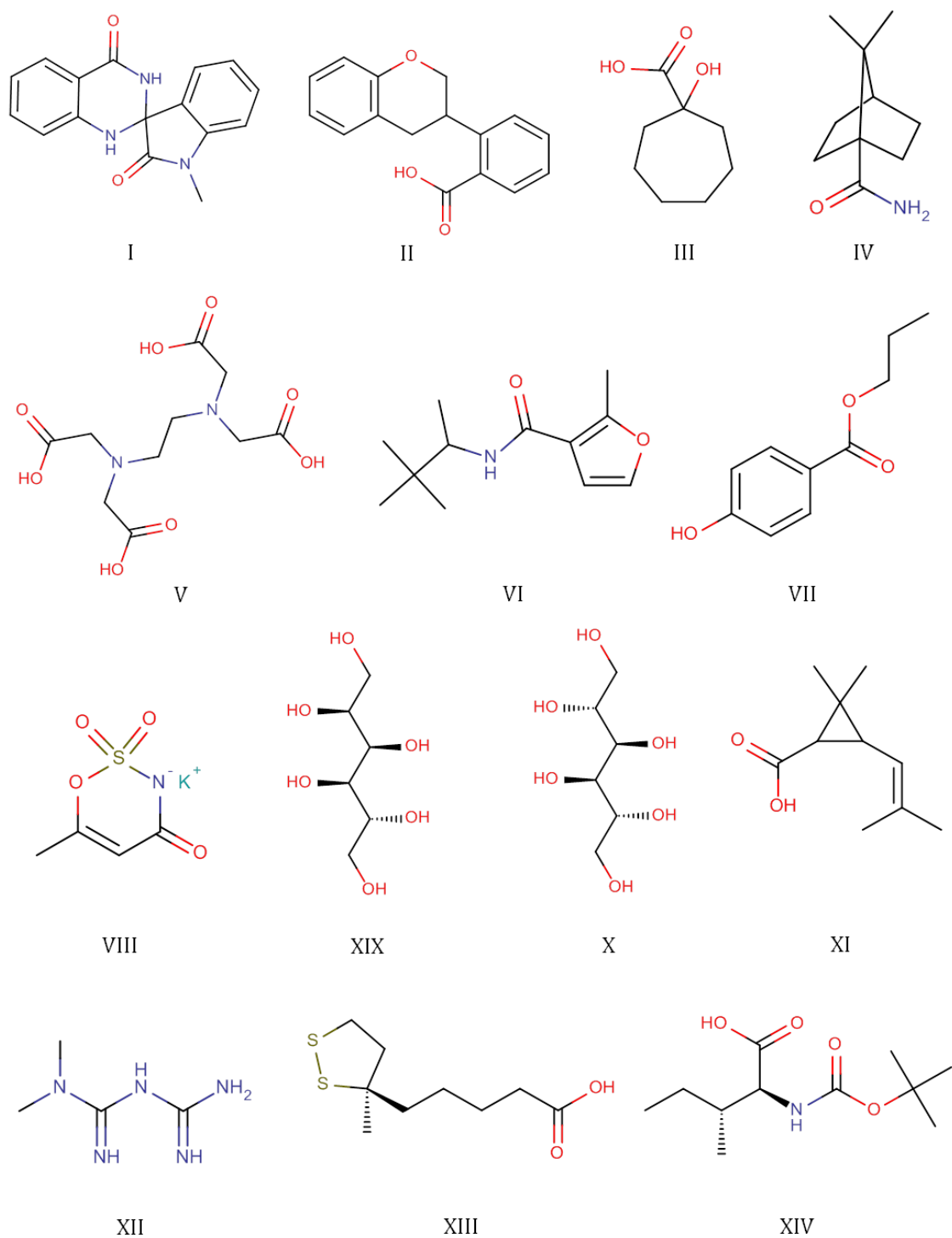
Tras descartar los compuestos de las categorías C y D, el listado de candidatos que podrían ser adquiridos y evaluados farmacológicamente quedó conformado por 380 entidades químicas.

Una de las funciones básicas de la cognición humana es la de reducir la complejidad del mundo a dimensiones manejables. Cotidianamente, ignoramos grandes volúmenes de información presente en nuestro entorno con la finalidad de

poder centrarnos en lo que creemos más importante. En ciertos contextos profesionales, este proceso alcanza una forma de arte que funciona como herramienta para reducir la complejidad de los problemas. Por ejemplo, en el área farmacéutica, los investigadores deben examinar rutinariamente largas listas de estructuras químicas con información específica asociada, con el objetivo de priorizar unas pocas para estudios posteriores. Pese a los métodos computacionales disponibles, los científicos permanecen íntimamente conectados con la inspección visual de las estructuras químicas, observando por ejemplo cuales poseen propiedades fisicoquímicas favorables (solubilidad), cuales son sintéticamente accesibles, químicamente manipulables etc. (Kutchukian et al., 2012).

En consecuencia, y considerando además los aspectos económicos y la accesibilidad de las drogas, se realizó una inspección visual de las 380 estructuras resultantes del cribado virtual seleccionando a 14 de las mismas para ser adquiridas y evaluadas como nuevos fármacos antiepilépticos potencialmente útiles para el tratamiento de la epilepsia refractaria mediada por P-gp. Las estructuras de los candidatos se muestran en la figura 4.

1-metil-1,2,3,4'-tetrahidro-1'H-espiro[indol-3,2'-quinazolina]-2,4'-diona (**I**, OSSK 784104) y ácido 2,2-Dimetil-3-(2-metilpropil-1-enil)-ciclopropano-1-oico (**XI**, ácido crisantémico) fueron adquiridos de Princeton Biomolecular Research; ácido 2-(2-oxo-2H-cromen-3-il)benzoico (**II**, BB\_NC-1569) fue adquirido de InterBioScreen Ltd; ácido 1-hidroxi-cicloheptanoico (**III**) y 7,7-dimetilbicyclo[2.2.1]heptano-1-carboxamida (**IV**) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Argentina; EDTA (**V**) fue donado por el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Exactas de esta Universidad; N-(3,3-Dimetilbutan-2-il)-2-metilfuran-3-carboxamida (**VI**) fue adquirido de UkrOrgSyntez (UORSY) Ltd; 4-hidroxibenzoato de propilo (**VII**, propilparabeno) y 6-metil-2,2-dioxo-2H-1,2λ<sup>6</sup>,3-oxatiazin-4-olato de potasio (**VIII**, acesulfame potásico) se encontraban disponibles en nuestro droguero, y fueron adquiridos respectivamente del laboratorio de Farmacotecnia I de esta Facultad y de Sigma-Aldrich; sorbitol (**XIX**) y manitol (**X**) fueron adquiridos de droguería Anedra; 3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina (**XII**, metformina) fue donado por la Unidad Productora de Medicamentos (UPM) de esta facultad; ácido tióctico (**XIII**, ácido α-lipóico) fue donado por Laboratorios Bagó S.A y; N-(tert-butoxicarbonil)-L-isoleucine (**XIV**, boc-isoleucina) fue adquirido de Otava Ltd.



**Figura 4|** Candidatos seleccionados en la campaña de cribado virtual adquiridos y evaluados farmacológicamente.

## **Evaluación Biológica. Determinación de la actividad antiepiléptica de los candidatos seleccionados en modelos animales**

Los 14 candidatos fueron evaluados acorde a los lineamientos detallados en el capítulo anterior. Los resultados de los ensayos MES, scPTZ (este último, cuando hubiera sido realizado) y Rotorod se presentan en la tabla 5.

Todos los candidatos mostraron actividad anticonvulsiva frente al ensayo MES. Ninguno de los ratones ensayados mostró signos de ataxia durante el ensayo rotorod. En todos los casos fueron utilizados controles a los que se administró solución salina por vía intra peritoneal y ninguno de ellos resultó protegido contra las convulsiones.

La actividad anticonvulsiva de compuestos similares al ácido crisantémico ha sido demostrada por Bialer y colaboradores (Isoherranen et al., 2004).

Vale la pena mencionar que la actividad anticonvulsiva de manitol y sorbitol está en sintonía con los reportes del efecto anticonvulsivo de otros edulcorantes artificiales y encaja en la hipótesis de los edulcorantes: habiéndose verificado que ciertos edulcorantes artificiales poseen efecto anticonvulsivo, es dado suponer que existe algún tipo de similitud entre el receptor que dispara la sensación dulce y algún blanco molecular de fármacos anticonvulsivos (en este caso, hipotéticamente, los receptores de glutamato metabotrópicos) (Di Ianni et al., 2015; Talevi et al., 2012). Luego, otros edulcorantes podrían compartir este efecto potencialmente medicinal. Tanto manitol como sorbitol son aditivos alimenticios permitidos en América y Europa (Kroger et al., 2006; Mortensen, 2006).

Asimismo, EDTA es un aditivo ampliamente utilizado en cosmética y alimentos que ha sido sometido a extensos estudios de seguridad (Larigan & Yamank, 2002).

| Compuesto | Dosis (mg/kg) | MES Test <sup>a</sup> |     | scPTZ <sup>a</sup> |          | Rotorod <sup>b</sup> |     |
|-----------|---------------|-----------------------|-----|--------------------|----------|----------------------|-----|
| I         | 30            | 2/3                   | 1/3 | 0/2                | 1/2      | 0/5                  | 0/5 |
|           | 100           | 0/2                   | 2/3 | 0/1                | 1/2      | 0/3                  | 0/5 |
| II        | 30            | 0/3                   | 0/3 | 0/1                | 0/2      | 0/3                  | 0/3 |
|           | 100           | 1/3                   | 1/3 | 0/2                | 0/2      | 0/3                  | 0/3 |
| III       | 30            | 1/3                   | 1/3 | 0/2                | 0/2      | 0/5                  | 0/5 |
|           | 100           | 0/3                   | 2/3 | 0/2                | 0/2      | 0/5                  | 0/5 |
| IV        | 30            | 1/3                   | 0/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
|           | 100           | 3/3                   | 0/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
| V         | 30            | 2/3                   | 0/3 | 0/1                | 0/1      | 0/3                  | 0/3 |
|           | 100           | 0/3                   | 1/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
| VI        | 20            | 1/3                   | 1/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
|           | 30            | 1/3                   | 0/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
|           | 100           | 0/3                   | 0/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
|           | 300           | 0/3                   | 1/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
| VII*      | 30            | 2/3                   | 1/3 | 0/3                | 0/3      | 0/6                  | 0/6 |
|           | 100           | 2/3                   | 1/3 | 0/3                | 0/3      | 0/6                  | 0/6 |
|           | 300           | 1/3                   | 3/3 | 0/3                | 0/3      | 0/6                  | 0/6 |
| VIII*     | 30            | 0/3                   | 1/3 | 0/2                | 0/2      | 0/5                  | 0/5 |
|           | 100           | 0/3                   | 1/3 | 0/2                | 0/2      | 0/5                  | 0/5 |
|           | 300           | 2/3                   | 2/3 | 0/2                | 0/2      | 0/5                  | 0/5 |
| XIX       | 30            | 0/3                   | 2/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
|           | 100           | 0/3                   | 0/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
| X         | 30            | 0/3                   | 1/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
|           | 100           | 1/3                   | 1/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
| XI        | 30            | 0/3                   | 1/3 | 0/2                | 0/2      | 0/5                  | 0/5 |
|           | 100           | 1/3                   | 1/3 | 1/1                | 0/2      | 0/4                  | 0/5 |
| XII       | 30            | 0/3                   | 0/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
|           | 100           | 0/3                   | 1/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
| XIII      | 30            | 0/3                   | 1/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
|           | 100           | 0/3                   | 0/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
| XIV       | 30            | 0/3                   | 2/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |
|           | 100           | 0/3                   | 2/3 | <i>c</i>           | <i>c</i> | 0/3                  | 0/3 |

**Tabla 5|** Resultado de los ensayos realizados para detectar actividad antiepiléptica de los candidatos seleccionados. <sup>a</sup> Número de animales protegidos / número de animales ensayados. <sup>b</sup> Número de animales con trastornos motores / número de animales ensayados. <sup>c</sup> El compuesto no fue ensayado. \*Actividad anticonvulsiva demostrada previamente, no ensayada para esta tesis.

El ácido tióctico es un suplemento dietario usualmente utilizado a dosis de 100–200 mg/día que también ha sido objeto de estudios de seguridad a largo plazo (Cremer et al., 2006) y, metformina es una agente hipo-glucemiante oral de uso actual en la práctica clínica.



Cabe aclarar que acesulfame potásico (un edulcorante artificial) y propilparabeno (un conservante alimenticio, cosmético y farmacéutico) ya habían sido evaluados como fármacos anticonvulsivos en trabajos anteriores en nuestro laboratorio (Talevi et al., 2007; Talevi et al., 2012). En vista de que han superado los filtros de P-gp, se los seleccionó para someterlos a pruebas adicionales a fin de determinar su utilidad para tratar la epilepsia refractaria mediada por P-gp. En particular, el propilparabeno ha tenido un notable éxito en la carrera para ser un nuevo fármaco llegando a ser parte de una patente internacional fruto de un proyecto de cooperación binacional (Argentina-México) donde se propone su uso como agente neuro-protector en el daño neuronal inducido por estado epiléptico (Rocha et al., 2015).

Con varios de los casos mencionados arriba, se evidencia el potencial que posee el uso de la base de datos DrugBank en campañas de cribado virtual para identificar nuevos usos a sustancias conocidas con perfiles farmacológicos y de seguridad bien caracterizados, en otras palabras, afrontar campañas de reposicionamiento de drogas basadas en criterios racionales (Deftereos et al., 2011; Lussier & Chen, 2011; Ekins et al., 2011).

### **Potencial de las sustancias seleccionadas para tratar epilepsias fármaco-resistentes. Ensayo de transporte bidireccional en mono-capa de células MDCK II - MDR 1**

Luego de terminar la primera tanda de ensayos biológicos, se observó que muchos de los candidatos ensayados no poseen características favorables para ser detectados por espectrometría ultravioleta. Dado que el equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizado dispone de un detector UV con arreglo de diodos, y en función del presupuesto disponible para afrontar estos ensayos, se han seleccionado 4 de las 14 sustancias para ser sometidas a estudios de permeabilidad en células MDCK II – MDR 1. Las condiciones y modo operativo utilizados en los mismos fueron las detalladas en el capítulo anterior, en tanto que los aspectos relacionados al método analítico utilizado se presentan a continuación:

Todas las muestras fueron cuantificadas por HPLC utilizando un equipo Dionex Ultimate 3000 ® (Thermo Scientific, Dionex, Sunnyvale, California, USA) equipado con un detector con arreglo de diodos. La fase estacionaria consistió en una columna Luna® C-18 (5 µm, 150 × 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), operada a temperatura ambiente.

En todos los casos la fase móvil estuvo compuesta por: **A** = Buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM, ajustado a pH 2,5 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y, **B** = Metanol. Las condiciones particulares se muestran en la tabla 6. Los métodos analíticos empleados fueron previamente validados en términos de especificidad, linealidad, precisión y exactitud.

Se utilizó trimetoprima (Park et al., 2011) como sustrato y clorhidrato de amiodarona como inhibidor específico de P-gp (Balayssac et al., 2005).

| Droga          | Modo       | A:B   | Flujo (mL/min) | $\lambda$ (nm) |
|----------------|------------|-------|----------------|----------------|
| Propilparabeno | Isocrático | 35:65 | 1.2–1.4        | 230 / 250      |
| Acesulfame K   | Isocrático | 80:20 | 1              | 230 / 240      |
| OSSK_784104    | Isocrático | 30:70 | 1              | 297            |
| BB_NC_1569     | Isocrático | 35:65 | 1              | 220            |
| Trimetoprima   | Isocrático | 65:35 | 1.3            | 230 / 270      |

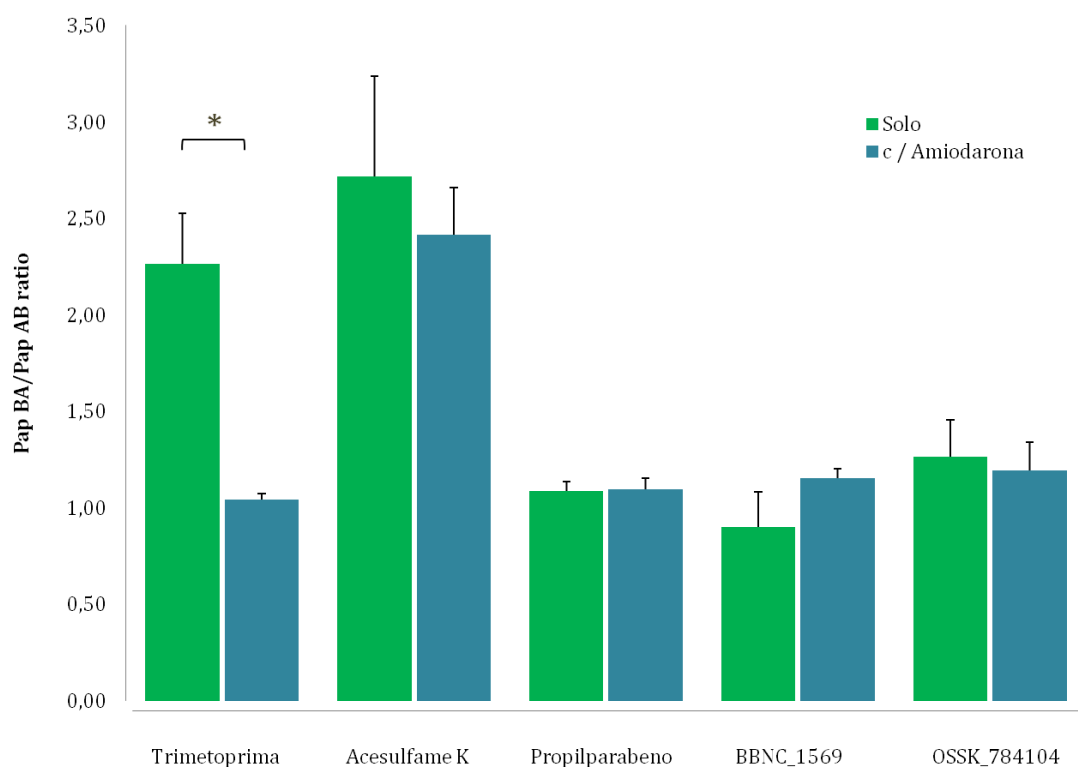
**Tabla 6** | Condiciones cromatográficas particulares de cada sustancia.  $\lambda$  = longitud de onda de detección; **A:B** = proporción de **A** y de **B** en la fase móvil.

En la tabla 7 se muestran los coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app}$   $10^{-6}$  cm/s) obtenidos para cada sustancia utilizando el tratamiento matemático ya explicado. Los datos obtenidos en presencia y ausencia de amiodarona fueron comparados estadísticamente con una prueba T de Student para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

| Droga          | Concentración ( $\mu\text{M}$ ) | $P_{app}$ $10^{-6}$ cm/s |                | Test T a 2 colas |              |
|----------------|---------------------------------|--------------------------|----------------|------------------|--------------|
|                |                                 | Solo                     | c / Amiodarona | T                | t crítico    |
| Trimetoprima   | 100                             | 2.264                    | 1.043          | <b>4.632</b>     | <b>4.303</b> |
| Acesulfame K   | 50                              | 2.716                    | 2.414          | 0.523            | 2.776        |
| Propilparabeno | 100                             | 1.088                    | 1.097          | -0.129           | 4.303        |
| BB_NC_1569     | 1                               | 0.900                    | 1.155          | -1.374           | 4.303        |
| OSSK_784104    | 2.5                             | 1.263                    | 1.194          | 0.288            | 4.303        |

**Tabla 7** | Resultado de la comparación estadística ( $\alpha=0.05$ ) de los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos en presencia y ausencia de amiodarona.

Como puede observarse, excepto en el caso de trimetoprima (el sustrato conocido de P-gp), ninguno de los  $P_{app}$  de los compuestos ensayados solos, difiere significativamente del  $P_{app}$  cuando son ensayados en presencia de un inhibidor de P-gp (amiodarona), lo que indica que el transporte de estas sustancias no se ve afectado por la presencia de la P-gp (figura 5) en las condiciones experimentales utilizadas.



**Figura 5|** Comparación estadística de los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos en presencia y ausencia de amiodarona

Los resultados obtenidos hasta aquí, emergen de la aplicación sucesiva de modelos (primero modelos *in silico*, luego modelos animales, y por último una validación en un modelo celular); es alentador el hecho de haber hallado consistencia entre las pruebas *in vivo* e *in vitro* y las predicciones realizadas *in silico* permitiendo pensar la posibilidad de avanzar hacia la evaluación de los candidatos en modelos más complejos. Sin embargo, como ya se ha mencionado en varias ocasiones en esta tesis, los modelos *in vitro* tienden a representar los sistemas *in vivo* de manera incompleta (Chunbo et al., 2012).

No obstante lo anterior, el ensayo de permeabilidad en células aporta evidencia que sugiere el éxito de la aplicación de modelos basados en descriptores topológicos para identificar sustancias potencialmente útiles para el tratamiento de la epilepsia refractaria.

Queda pendiente el ensayo de las drogas en el modelo de convulsiones farmacorresistentes inducidas por ácido 3-mercaptopropiónico (3-MP). Se trata de un modelo murino en el que la administración reiterada de 3-MP conduce a la sobreexpresión de P-gp, dando lugar a animales resistentes a fármacos sustrato de tal transportador. Este modelo es objeto de una tesis de doctorado de este mismo laboratorio y se encuentra ya en las fases últimas de validación, por lo que en un

corto lapso de tiempo los resultados obtenidos aquí podrán complementarse con los de este ensayo.

## REFERENCIAS

Balayssac A., Authier N., Cayre A., Coudore F. Does inhibition of P-glycoprotein lead to drug–drug interactions? *Toxicology Letters*, **156**(3): 319–329. (2005).

Boccard J., Bajot F., Di Pietro A., Rudaz S., Boumendjel A., Nicolle E., Carrupt P. A 3D linear solvation energy model to quantify the affinity of flavonoid derivatives toward p glycoprotein. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **36**: 254–264. (2009).

Cerqueira Lima P., Golbraikh A., Oloff S., Xiao Y., Tropsha A. Combinatorial QSAR modeling of P–glycoprotein substrates. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **46**: 1245–1254. (2006).

Chang C, Bahadduri P, Polli J, Swaan P, Ekins S. Rapid identification of P glycoprotein substrates and inhibitors. *Drug Metabolism and Disposition*, **34**: 1876–1984. (2006).

Chufan E., Sim H., Ambudkar S. Molecular Basis of the Polyspecificity of P Glycoprotein (ABCB1): Recent Biochemical and Structural Studies. *Advanced Cancer Research*, **125**: 71–96. (2015).

Chunbo Z., Kwan P., Zuo Z., Baum L. The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**: 930–942. (2012).

Cianchetta G., Singleton R., Zhang M., Wildgoose M., Giesing D., Fravolini A., Cruciani G., Vaz R. A pharmacophore hypothesis for P-glycoprotein substrate recognition using GRIND-based 3D-QSAR. *Journal of Medicinal Chemistry*, **48**: 2927–2935. (2005).

Cremer D., Rabeler R., Roberts A., Lynch B. Long-term safety of  $\alpha$ -lipoic acid (ALA) consumption: a 2-year study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **46**: 196–201. (2006).

De Long E., De Long D., Clarke Pearson D. Comparing the Areas Under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach. *Biometrics*, **44**(3): 837–845. (1988).

Deftereos S., Andronis C., Friedla E., Persidis A., Persidis A. Drug repurposing and adverse event prediction using high throughput literature analysis. *Wiley Interdiscip. Reviews: Systems Biology and Medicine*, **3**: 323–334. (2011).

Di Ianni M., Enrique A., Del Valle M., Aldana B., Rosella M., Rocha L., Castro E., Bruno-Blanch L., Talev, A. Is there a relationship between sweet taste and seizures? Anticonvulsant and proconvulsant effects of non-nutritive sweeteners. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, **18**(4): 335–345. (2015).

Eisenhauer J. Regression through the Origin. *Teaching Statistics*, **25**: 76–80. (2003).

Ekins S., Kim R., Leake B., Dantzig A., Schuetz E., Lan L., Yasuda K., Shepard R., Winter M., Schuetz J., Wikel .J, Wrigton S. Application of three-dimensional quantitative structure-activity relationships of P-glycoprotein inhibitors and substrates. *Molecular Pharmacology*, **61**: 974–981. (2002).

Ekins S., Williams A., Krasowski M., Freundlich J. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discovery Today*, **16**: 298–310. (2011).

Golbraikh A., Shen M., Xiao Z., Xiao Y., Lee K., Tropsha A. Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **17**: 241–253. (2003).

Golbraikh A., Tropsha A. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **16**: 357–369. (2002).

Irwin J., Sterling T., Mysinger M., Bolstad E., Coleman R. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **52**: 1757–1768. (2012).

Isoherranen N., Levy R., Yagen B., Woodhead J., White H., Bialer M. Metabolism of a new antiepileptic drug, Nmethyl- tetramethylcyclopanecarboxamide, and anticonvulsant activity of its metabolites. *Epilepsy Research*, **58**: 1–12. (2004).

Knox C., Law V., Jewison T., Liu P., Ly S., Frolkis A., Pon A., Banco K., Mak C., Neveu V., Djoumbou Y., Eisner R., Guo A., Wishart D. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Research*, **39**: D1035–1041. (2011).

Kroger M., Meister K., Kava R. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **5**: 35–47. (2006).

Kutchukian P., Vasilyeva N., Xu J., Lindvall M., Dillon M., Glick M., Brooijmans N. Inside the Mind of a Medicinal Chemist: The Role of Human Bias in Compound Prioritization during Drug Discovery. *PLoS ONE*, **7**(11): e48476. (2012).

Larigan, R. S.; Yamank, T. A. Final report on the safety assessment of EDTA, calcium disodium EDTA, diammonium EDTA, dipotassium EDTA, disodium EDTA, TEA-EDTA, tetrasodium EDTA, tripotassium EDTA, trisodium EDTA, HEDTA, and trisodium HEDTA. *International Journal of Toxicology*, 2002, **21**(2): 95–142. (2002).

Li W, Li L, Eksterowicz J, Ling X, Cardozo M. Significance analysis and multiple pharmacophore models for differentiating P-glycoprotein substrates. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **47**: 2429–2438. (2007).

Lussier Y., Chen J. The emergence of genome-based drug repositioning. *Science Translational Medicine*, **3**: 96ps35. (2011).

Mahar Doan K, Humphreys J, Webster L, Wring S, Shampine L, Serabjit- Singh C, Adkison K, Polli J. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **303**: 1029–1037. (2002).

Mortensen A. Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects. *Scandinavian Journal of Food & Nutrition*, **50**: 104–116. (2006).

Müller H., Pajeva I., Globisch C., Wiese M. Functional assay and structure-activity relationships of new third-generation P-glycoprotein inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **16**: 2448–2462. (2008).

Park M., Okochi H., Benet L. Is Ciprofloxacin a Substrate of P-glycoprotein? *Archives of Drug Information*, **4**(1): 1–9. (2011).

Penzotti J, Lamb M, Evensen E, Grootenhuis P. A computational ensemble pharmacophore model for identifying substrates of P glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**: 1737–1740. (2002).

Rocha L., Orozco S., Santana C., Bruno-Blanch L., Talevi A., Bellera C. Use of propylparaben as neuroprotective agent to attenuate brain damage produced by status epilepticus. WO2015049608 A1. (2015).

Talevi A, Bellera C, Castro E, Bruno-Blanch L. Optimal partition of datasets of QSPR studies: a sampling problem. *MATCH Communications in Mathematical and in Computer Chemistry*, **63**: 585–599. (2010).

Talevi A., Bellera C., Castro E., Bruno-Blanch L. A successful virtual screening application: prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *Journal of Computed Aided Molecular Design*, **21**: 527–538. (2007).

Talevi A., Enrique A., Bruno-Blanch L. Anticonvulsant activity of artificial sweeteners: A structural link between sweet-taste receptor T1R3 and brain glutamate receptors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**(12): 4072–4074. (2012).

Theil H. *Principles of Econometrics*. New York: John Wiley. (1971).

Todeschini R., & Consonni V. *Handbook of Molecular Descriptors*. Wiley-VCH: Weinheim. (2000).

Todeschini R., & Consonni V. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. (2009).

Tropsha A., Gramatica P., Gombar K. The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models. *QSAR & Combinatorial Sciences*, **22**: 69–77. (2003).

Wang R., Kuo C., Lien L., Lien E. Structure-activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **28**: 203–228. (2003).

Wang Z., Chen Y., Liang H., Bender A., Glen R., Yan A. P-glycoprotein Substrate Models Using Support Vector Machines Based on a Comprehensive Data set. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **51**(6): 1447–1456. (2011).

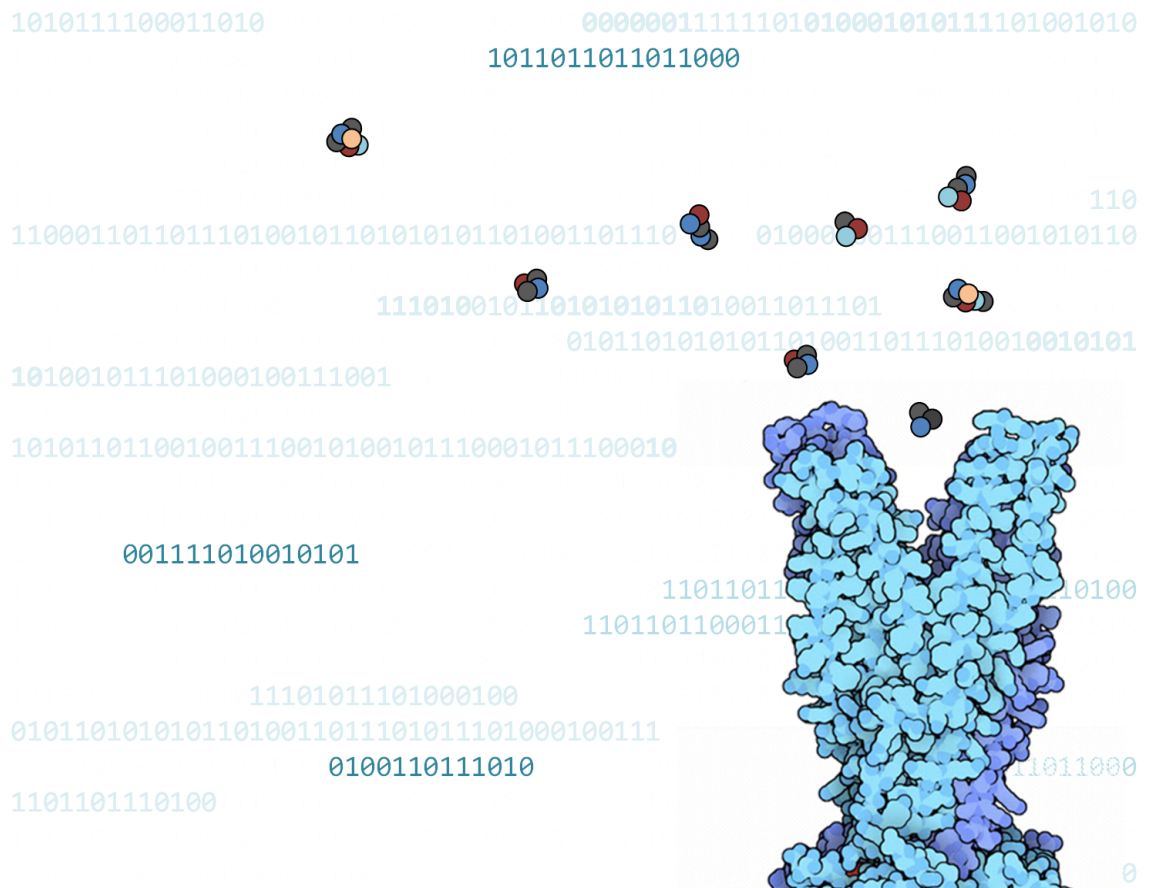
Xue Y., Yap C., Sun L., Cao Z., Wang J., Chen Y. Prediction of P-glycoprotein substrates by a support vector machine approach. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **44**: 1497–1505. (2002).

Zalloum H., & Taha M. Development of predictive in silico model for cyclosporine- and aureobasidin-based P-glycoprotein inhibitors employing receptor surface analysis. *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, **27**: 439–451. (2008).

Zhang L, Balimane P, Johnson S, Chong S. Development of an in silico model for predicting efflux substrates in Caco-2 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, **343**: 98–105. (2007).







“El *intento* no es un pensamiento, ni un objeto, ni un deseo. El *intento* es lo que puede hacer triunfar a un hombre cuando sus pensamientos le dicen que está derrotado. Actúa aún a pesar de que el guerrero se haya entregado. El *intento* es lo que lo hace invulnerable. El *intento* es lo que envía a un chamán a través de una pared, a través del espacio, al infinito.... El espíritu de un guerrero no está hecho a la entrega y a la queja, ni está hecho a ganar o perder. El espíritu de un guerrero está hecho sólo a la lucha, y cada lucha es la última batalla del guerrero sobre la Tierra. Por eso el resultado le importa muy poco. En su última batalla sobre la tierra, el guerrero deja fluir su espíritu libre y claro. Y mientras se entrega a su batalla, sabiendo que su *intento* es impecable, un guerrero ríe y ríe”. Fragmento de *Una Realidad Aparte*. Carlos Castaneda. 1971.



## CONCLUSIONES

La identificación temprana de sustratos de los transportadores de eflujo constituye una tarea fundamental en los proyectos de desarrollo de nuevas drogas ya que de esta manera se evitan los trastornos asociados al fenómeno de resistencia múltiple a fármacos, especialmente cuando las drogas en desarrollo tienen como objetivo el tratamiento de enfermedades con alta tasa de farmacoresistencia como por ejemplo la epilepsia; por otro lado, pueden predecirse posibles interacciones medicamentosas relacionadas mecanísticamente con estos transportadores.

En este escenario el cribado virtual aparece como una técnica eficiente en términos de tiempo y recursos materiales, permitiendo descartar aquellas sustancias que tienen una mayor probabilidad de fracasar en estadios avanzados del proceso de desarrollo. Además, su aplicación es sumamente interesante para afrontar campañas de reposicionamiento de fármacos ya que provee un criterio racional para identificar segundos usos.

En el presente trabajo de tesis se ha desarrollado un ensamble de tres funciones discriminantes capaces de identificar sustratos de la P-gp. El desempeño de los modelos aquí desarrollados es comparable al obtenido por la mayoría de los reportados anteriormente con la característica distintiva de que sólo incluyen descriptores independientes de la conformación, los cuales son particularmente aptos para la exploración eficiente de repositorios virtuales de fármacos mediante campañas de cribado virtual, ya que no se requiere un análisis conformacional previo de las estructuras almacenadas en las bases de datos.

Salvo unos pocos reportes, la mayoría de los modelos publicados consisten en aproximaciones farmacofóricas que por su fácil interpretabilidad, son más apropiados a los fines de diseñar estructuras, pero no para explorar grandes bases de datos, tarea para la que los modelos basados en descriptores independientes de la conformación, como los desarrollados aquí, se imponen con gran ventaja.

Como principal obstáculo de esta tesis, se presentó el hecho de que aún está en vías de discusión la manera de determinar experimentalmente y sin ambigüedades si una sustancia es efectivamente transportada por la P-gp. Mientras que muchos autores defienden los ensayos de transporte bidireccionales, otros sostienen que los mismos no son eficientes para detectar sustratos débiles del transportador porque la difusión pasiva de los mismos (cuando son altamente permeables) puede enmascarar el transporte por la P-gp, situación despreciable *in-vitro* pero a tener en cuenta *in-vivo*, donde la sobre-expresión del transportador puede llegar a comprometer aún la biodisponibilidad de sustratos débiles

altamente permeables. Para suplir tal limitación, han propuesto el uso de ensayos de transporte utilizando concentraciones en equilibrio (CETA). Esta situación coyuntural actualmente se presenta como la mayor debilidad de los proyectos de modelado computacional relacionados a transportadores ABC, complicando la tarea de seleccionar el parámetro biológico a modelar: el número de compuestos que han sido evaluados en el ensayo CETA es todavía limitado para realizar una inferencia estadística con buena capacidad de generalización (ver Anexo).

El uso de una combinación de modelos apunta al aumento de la capacidad predictiva, dado que frente a la poli-especificidad de sustrato de la P-gp, no es esperable que un único modelo sea capaz de describir eficientemente la gran diversidad de estructuras reconocidas por el transportador. El ensamble de tres funciones discriminantes permitió aumentar considerablemente la especificidad acorde a nuestras necesidades: minimizar las probabilidades de adquirir y evaluar falsos positivos y evitar de esta manera la pérdida de tiempo y fundamentalmente de recursos materiales, y optimizando el uso de animales de laboratorio.

La aplicación conjunta de las funciones discriminantes aquí desarrolladas (fusionadas por el esquema promedio) y la reportada por Talevi et al. para identificar sustancias activas al ensayo MES, derivó finalmente en la compra y evaluación de 14 sustancias, de las cuales 4 fueron seleccionadas para los ensayos de transporte en células, habiendo presentado todas ellas, actividad antiepiléptica en los ensayos utilizados.

Ninguna de las 4 sustancias seleccionadas (Propilparabeno, Acesulfame K, OSSK\_784104 y BB\_NC 1569) se mostró afectada por el transporte de P-gp en el ensayo de permeabilidad en células MDCK II-*MDR1* concluyendo que no hay evidencia *en las condiciones experimentales utilizadas* de que las mismas sean sustratos del transportador.

Estos resultados permitieron validar experimentalmente los modelos planteados y poner en evidencia el potencial de las aproximaciones computacionales utilizadas para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia refractaria.

# **ANEXO**



## ANEXO

El modelado QSAR, entre otros tantos logros, ha permitido disponer de una herramienta rápida y económica para discriminar entre sustancias que son afectadas por el transporte de P-gp y aquellas que no lo son. En este sentido, se han realizado muchos esfuerzos científicos. Uno de los casos emblemáticos es el de Penzotti y col. (Penzotti et al., 2002) quienes construyeron una base de datos de 195 sustratos y no sustratos de P-gp colectando los datos de varias fuentes bibliográficas (Seelig, 1998) y reportando una capacidad clasificatoria del ensamble de modelos farmacofóricos obtenidos del 80% en el conjunto de entrenamiento y 63% en el conjunto de prueba. La base de datos de Penzotti fue posteriormente reutilizada en estudios posteriores sirviendo como punto de partida para la colección de datos (Wang et al., 2011).

A pesar de que existe un alto grado de concordancia entre las colecciones (por usar las mismas citas bibliográficas), es importante destacar que existe una amplia diversidad de ensayos para determinar si una sustancia es o no sustrato de P-gp, siendo esta la principal causa de la variabilidad y discordancia en los resultados (Levatic et al., 2013).

Excelentes revisiones y discusiones sobre las colecciones de datos de transporte de sustancias por P-gp pueden encontrarse en los trabajos de Bikadi y col de 2011, Broccatelli de 2012 y Levatic y col de 2013 (Bikadi et al., 2011; Broccatelli, 2012; Levatic et al., 2013).

Una solución definitiva pero a la vez utópica, es desarrollar parámetros de caracterización del transporte que sean independientes de los modelos o ensayos utilizados (Sjöstedt et al., 2014). Otros autores han comenzado a trabajar con grupos de fármacos específicos y han propuesto que, en el caso de fármacos antiepilépticos, el uso de ensayos de transporte utilizando concentraciones en equilibrio (CETA) resuelve al menos en parte esta cuestión, planteando que las sustancias altamente permeables que sean sustratos débiles del transportador no pueden ser detectadas por los ensayos convencionales dado que el proceso de difusión pasiva enmascara el accionar de la P-gp. Esta cuestión es eliminada utilizando concentraciones equivalentes del fármaco a ambos lados de la membrana y por ende eliminando el gradiente de concentración que impulsa la difusión pasiva, por lo que sólo se observa el transporte neto por P-gp con el consecuente aumento de la sensibilidad del ensayo (Löscher et al., 2011).

Si bien el uso de de esquemas de clasificación binarios como el análisis lineal discriminante es una muy buen estrategia para poder lidiar con esta variabilidad

experimental, es necesario un consenso en los esfuerzos por determinar la interacción de las sustancias con los transportadores de eflujo. Tal consenso por un lado permitirá generar modelos QSAR mucho más confiables, pero lo que es más importante aún, permitirá disponer de un criterio consistente para abordar clínicamente el problema de la farmacorresistencia mediada por transportadores ABC.

En la tabla a continuación se muestran los nombres de los 250 compuestos químicos utilizados en este trabajo de tesis indicando su condición de sustrato, categoría farmacológica/química a la que pertenece y las referencias bibliográficas correspondientes. Asimismo se indica la línea celular y tipo de ensayos utilizados en la determinación del transporte de la sustancia por la P-gp.

| Compuesto             | Clase | Ensayo        | Línea celular | Grupo farmacológico / químico        | Conjunto asignado | Ref.         |
|-----------------------|-------|---------------|---------------|--------------------------------------|-------------------|--------------|
| Acitretin             | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Agente Queratolítico                 | E                 | 1,2          |
| Aldosterone           | NS    | Bidireccional | LLC-PK1-MDR1  | Hormona esteroidea                   | E                 | 3,4          |
| Alprenolol            | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Anti-hipertensivo/<br>Anti-arrítmico | E                 | 5,6          |
| Aminocarb             | NS    | Bidireccional | B16-hMDR      | Insecticida                          | E                 | 7, 8         |
| Atenolol              | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Anti-hipertensivo                    | E                 | 5,9, 80      |
| BIBW22BS              | NS    | Bidireccional | CEM-MDR       | Experimental                         | E                 | 10, 11       |
| Bromocriptine         | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Agente Anti-Parkinson                | E                 | 5, 12,<br>80 |
| Buspirone             | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Ansiolítico                          | E                 | 5,9,12       |
| Carbaryl              | NS    | Bidireccional | B16-hMDR      | Insecticida                          | E                 | 8, 11        |
| Chaps                 | NS    | Bidireccional | HEL           | Antimicrobiano                       | E                 | 13, 14       |
| Chlorpheniramine      | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Anti-Histamínico                     | E                 | 5, 9         |
| Chlorprothixene       | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Antipsicótico                        | E                 | 5, 9         |
| Clomipramine          | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Antidepresivo                        | E                 | 5,12, 80     |
| Cortexolone           | NS    | Bidireccional | J77           | Hormona esteroidea                   | E                 | 15,16        |
| Cyclophosphamide      | NS    | Bidireccional | NIH3T3-MDR1   | Antineoplásico                       | E                 | 17, 18       |
| Cytarabine            | NS    | Bidireccional | NIH3T3-G186   | Antineoplásico                       | E                 | 17, 18       |
| Deoxy podophyllotoxin | NS    | Bidireccional | P388/ADR      | Antineoplásico                       | E                 | 19, 20       |
| Dialifos              | NS    | Bidireccional | B16-hMDR      | Insecticida                          | E                 | 8, 11        |
| Diphenhydramine       | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Anti-Histamínico                     | E                 | 5,21, 80     |
| Doxepin               | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Antidepresivo                        | E                 | 5, 22        |
| Epinephrine           | NS    | Bidireccional | CEM/VLB100    | Simpaticomimético                    | E                 | 11, 23       |
| Farnesol              | NS    | Bidireccional | MCF7-MDR1     | Experimental                         | E                 | 11, 24       |
| Flumazenil            | NS    | Bidireccional | MDCK II-MDR1  | Modulador GABA-érgico, Antídoto      | E                 | 5,12         |



|              |    |               |              |                                    |   |            |
|--------------|----|---------------|--------------|------------------------------------|---|------------|
| Fluoxetine   | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antidepresivo                      | E | 5,9,12     |
| Fluvoxamine  | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antidepresivo                      | E | 5, 12, 25  |
| Guanabenz    | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antidepresivo                      | E | 5, 26, 80  |
| Imipramine   | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antidepresivo                      | E | 5, 26, 80  |
| Ketamine     | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Anestésico Disociativo             | E | 5,27, 80   |
| Leptophos    | NS | Bidireccional | B16-hMDR     | Insecticida                        | E | 7, 11      |
| Lindane      | NS | Bidireccional | B16-hMDR     | Plaguicida                         | E | 7, 11      |
| Mannitol     | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Diurético Osmótico,<br>Edulcorante | E | 5, 28, 80  |
| Melphalan    | NS | Bidireccional | NIH3T3-MDR1  | Antineoplásico                     | E | 11, 17     |
| Meprobamate  | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Ansiolítico                        | E | 5, 22, 80  |
| Methoxychlor | NS | Bidireccional | B16-hMDR     | Insecticida                        | E | 7, 11      |
| Mevinphos    | NS | Bidireccional | B16-hMDR     | Insecticida                        | E | 7, 11      |
| Midazolam    | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Ansiolítico                        | E | 5, 22, 28  |
| Naloxone     | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antagonista Opioide                | E | 5, 9, 80   |
| Nelfinavir   | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiviral                          | E | 5, 22, 80  |
| Nitrazepam   | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiepiléptico                     | E | 5, 29      |
| Noscapine    | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antitusivo                         | E | 5, 30      |
| NSC268251    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC314622    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC606532    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC617286    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC630148    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC630721    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC639677    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC653278    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC666331    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC667533    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC667558    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |
| NSC668354    | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                       | E | 31, 32, 33 |

|                           |    |                         |               |                                      |   |               |
|---------------------------|----|-------------------------|---------------|--------------------------------------|---|---------------|
| NSC674508                 | NS | Bidireccional           | SLC           | Experimental                         | E | 31, 32, 33    |
| NSC676593                 | NS | Bidireccional           | SLC           | Experimental                         | E | 31, 32, 33    |
| NSC676610                 | NS | Bidireccional           | SLC           | Experimental                         | E | 31, 32, 33    |
| NSC676616                 | NS | Bidireccional           | SLC           | Experimental                         | E | 31, 32, 33    |
| NSC676618                 | NS | Bidireccional           | SLC           | Experimental                         | E | 31, 32, 33    |
| NSC686028                 | NS | Bidireccional           | SLC           | Experimental                         | E | 31, 32, 33    |
| Paraquat                  | NS | Bidireccional           | B16-hMDR      | Insecticida                          | E | 7, 11         |
| Phosmet                   | NS | Bidireccional           | B16-hMDR      | Insecticida                          | E | 7, 11         |
| Prednisolone              | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Corticoesteroide                     | E | 34, 35        |
| Procyclidine              | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Agente Anti-Parkinson                | E | 5, 36         |
| Promazine                 | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Antipsicótico                        | E | 5, 37         |
| Propiconazole             | NS | Bidireccional           | B16-hMDR      | Antifúngico/<br>Antimicótico         | E | 7, 11         |
| Reserpinic acid           | NS | Bidireccional           | CEM/VLB100    | Antipsicótico /<br>Antihipertensivo  | E | 38, 39        |
| Selegiline                | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Agente Anti-Parkinson                | E | 5, 22         |
| Sumatriptan               | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Agente Anti-Migrañoso                | E | 5, 22, 28     |
| Tamoxifene                | NS | Bidireccional           | LLC-PK1-MDR1  | Modulador Estrogénico<br>Selectivo   | E | 11, 40        |
| Trazodone                 | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Antidepresivo                        | E | 5, 12, 22, 25 |
| Trimipramine              | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Antidepresivo                        | E | 5, 80         |
| Valproic acid             | NS | Bidireccional<br>/ CETA | MDCK II-MDR1  | Antiepiléptico                       | E | 43, 44, 81    |
| Vinclozolin               | NS | Bidireccional           | B16-hMDR      | Plaguicida                           | E | 7, 11         |
| Zimelidine                | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Antidepresivo                        | E | 5, 44         |
| Acebutolol                | S  | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Anti-hipertensivo/<br>Anti-arritmico | E | 45, 46        |
| Amiodarone                | S  | Bidireccional           | LLC-PK1-MDR1  | Anti-arritmico                       | E | 40, 46        |
| Saquinavir                | S  | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Antiviral                            | E | 5, 9, 28, 34  |
| Azidopine                 | S  | Bidireccional           | DC-3F/VCRd-5L | Experimental                         | E | 47, 48        |
| Bisantrene                | S  | Bidireccional           | LS 174T- MDR1 | Antineoplásico                       | E | 11, 49        |
| Cefazolin                 | S  | Bidireccional           | MES-SA-Dx5    | Antimicrobiano                       | E | 11, 50        |
| Cefotetan                 | S  | Bidireccional           | MES-SA-Dx6    | Antimicrobiano                       | E | 11, 50        |
| Cepharanthine             | S  | Bidireccional           | KB-MDR1       | Antimicrobiano                       | E | 11, 51        |
| Cis-(Z)-<br>Fluphenthizol | S  | Bidireccional           | MCF-7/DOX     | Antipsicótico                        | E | 11, 52        |
| Colchicine                | S  | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Antimitótico                         | E | 28, 45, 53    |
| Daunorubicin              | S  | Bidireccional           | MDCK II-MDR1  | Antineoplásico                       | E | 28, 53        |

|                         |   |               |              |                                    |   |                   |
|-------------------------|---|---------------|--------------|------------------------------------|---|-------------------|
| Dexniguldipine          | S | Bidireccional | MCF-7 ADR    | Experimental                       | E | 46, 54            |
| Digitoxigenin           | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Agente Cardiotónico                | E | 1, 31,<br>34, 55  |
| Digoxigenin             | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Agente Cardiotónico                | E | 1, 31,<br>34, 55  |
| Diltiazem               | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Agente Cardiotónico                | E | 5, 28,<br>53      |
| Docetaxel               | S | Bidireccional | NIH3T3-MDR1  | Antineoplásico                     | E | 17, 56            |
| Doxorubicin             | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antineoplásico                     | E | 28, 45,<br>53     |
| Emetine                 | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihelmíntico                     | E | 28, 57            |
| Epothilone A            | S | Bidireccional | MCF-7/ADR    | Antineoplásico                     | E | 11, 58            |
| Estriol                 | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Hormona sexual                     | E | 41, 60            |
| Fluphenazine            | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antipsicótico                      | E | 22, 46,<br>52     |
| GF120918<br>(Elacridar) | S | Bidireccional | MCF7/ADR     | Adyuvante de<br>Quimioterapia      | E | 46, 61            |
| Hydrocortisone          | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiinflamatorio<br>Esteroido      | E | 4, 35,<br>40      |
| Idarubicin              | S | Bidireccional | NIH3T3-MDR1  | Antineoplásico                     | E | 17, 62            |
| Isosafrole              | S | Bidireccional | LS180/AD50   | Experimental                       | E | 31, 63            |
| K02                     | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Peptidomimético<br>antineoplásico  | E | 64, 65            |
| Leupeptin               | S | Bidireccional | CHrC5-MDR1   | Experimental                       | E | 66, 67,<br>68     |
| Loperamide              | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antidiarreico                      | E | 5, 28,<br>53, 69  |
| LY335979                | S | Bidireccional | CHrC5-MDR1   | Experimental                       | E | 66, 67,<br>68     |
| Methadone               | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Analgesico opioide                 | E | 27, 70            |
| Methylprednisol<br>one  | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiinflamatorio<br>Esteroido      | E | 34, 35            |
| Methysergide            | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antimigrañoso                      | E | 5, 9              |
| Mitomycin C             | S | Bidireccional | NIH3T3-MDR1  | Antineoplásico                     | E | 17, 71            |
| Monensin                | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antibiótico                        | E | 28, 72            |
| Morphine                | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Analgesico opioide                 | E | 25, 45            |
| Nifedipine              | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Cardiotónico /<br>Antihipertensivo | E | 28, 53,<br>70     |
| Ondansetron             | S | Bidireccional | LLC-PK1-MDR1 | Antihemético                       | E | 11, 73            |
| Pafenolol               | S | Bidireccional | Caco-2       | Antihipertensivo                   | E | 46, 74            |
| Phenoxazine             | S | Bidireccional | GC3/C1       | Antipsicótico                      | E | 11, 59            |
| Prazosin                | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihipertensivo                   | E | 25, 28,<br>53, 73 |
| Progesterone            | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Hormona sexual /<br>Progestágeno   | E | 4, 41,<br>71      |
| Quinidine               | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiarrítmico /<br>Antimalárico    | E | 9, 25,<br>28, 34, |

|                                 |    |                         |              |                                     |   | 69                      |
|---------------------------------|----|-------------------------|--------------|-------------------------------------|---|-------------------------|
| Reserpine                       | S  | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antipsicótico /<br>Antihipertensivo | E | 28, 53                  |
| Rifampicin                      | S  | Bidireccional           | Caco-2       | Antimicrobiano                      | E | 64, 75                  |
| FarnesylCysteine<br>Methylester | S  | Bidireccional           | MCF7-MDR1    | Experimental                        | E | 11, 24                  |
| Telmisartan                     | S  | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antihipertensivo                    | E | 1, 76                   |
| Terfenadine                     | S  | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antihistamínico                     | E | 5, 28,<br>53            |
| Topotecan                       | S  | Bidireccional           | Caco-2       | Antineoplásico                      | E | 68, 75                  |
| Triflupromazine                 | S  | Bidireccional           | NIH3T3-MDR1  | Antipsicótico                       | E | 11, 77                  |
| Vinblastine                     | S  | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antineoplásico                      | E | 9, 28,<br>34, 53,<br>69 |
| Vindoline                       | S  | Bidireccional           | CEM/VLB100   | Antineoplásico                      | E | 11, 78                  |
| Zolmitriptan                    | S  | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antimigrañoso                       | E | 5, 79                   |
| Aldicarb                        | NS | Bidireccional           | B16-hMDR     | Insecticida                         | P | 8, 11                   |
| Aldoxycarb                      | NS | Bidireccional           | B16-hMDR     | Insecticida                         | P | 8, 11                   |
| Amantadine                      | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antiviral                           | P | 5, 22,<br>28, 53        |
| Antipyrine                      | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antiinflamatorio No<br>Esteroido    | P | 5, 9, 69                |
| Atrazine                        | NS | Bidireccional           | B16-hMDR     | Insecticida                         | P | 8, 11                   |
| Biperiden                       | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Agente Anti-Parkinson               | P | 5, 80                   |
| Bufuralol                       | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antihipertensivo                    | P | 5, 80                   |
| Carbamazepine                   | NS | Bidireccional<br>/ CETA | MDCK II-MDR1 | Antiepiléptico                      | P | 5, 22,<br>25, 69,<br>81 |
| Carmustine                      | NS | Bidireccional           | NIH3T3-MDR1  | Antineoplásico                      | P | 17, 31                  |
| Chlorambucil                    | NS | Bidireccional           | NIH3T3-MDR1  | Antineoplásico                      | P | 17, 31                  |
| Chlorpromazine                  | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antipsicótico                       | P | 5, 12,<br>22, 25,<br>53 |
| Clemastine<br>fumarate          | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antihistamínico                     | P | 5, 80                   |
| Clonidine                       | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antihipertensivo                    | P | 5, 69,<br>80            |
| Cyclobenzaprine                 | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Relajante muscular                  | P | 5, 12,<br>25            |
| Cysteine Methyl<br>ester        | NS | Bidireccional           | MCF7-MDR1    | Experimental                        | P | 11, 24                  |
| Deoxycorticoster<br>one         | NS | Bidireccional           | J77          | Hormona esteroidea                  | P | 15, 16                  |
| Desipramine                     | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Antidepresivo                       | P | 5, 9, 69,<br>80         |
| Dieldrin                        | NS | Bidireccional           | B16-hMDR     | Insecticida                         | P | 8, 11                   |
| Doxapram                        | NS | Bidireccional           | MDCK II-MDR1 | Estimulante<br>Respiratorio         | P | 5, 80                   |

|                    |    |               |              |                                 |   |                  |
|--------------------|----|---------------|--------------|---------------------------------|---|------------------|
| Doxylamine         | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihistamínico                 | P | 5, 69, 80        |
| Epipodophyllotoxin | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antineoplásico                  | P | 28, 45, 53, 69   |
| Fluazifop-Butyl    | NS | Bidireccional | B16-hMDR     | Insecticida                     | P | 8, 11            |
| Fluorouracil       | NS | Bidireccional | NIH3T3-MDR1  | Antineoplásico / Inmunosupresor | P | 17, 31           |
| Flurazepam         | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Ansiolítico                     | P | 5, 80            |
| Gabapentin         | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiepiléptico                  | P | 5, 22, 43        |
| Haloperidol        | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antipsicótico                   | P | 5, 9, 22, 25, 80 |
| Indomethacin       | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiinflamatorio No Esteroideo  | P | 5, 9, 69, 80     |
| Lamotrigine        | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiepiléptico                  | P | 12, 25, 43       |
| Lidocaine          | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Anestésico Local                | P | 5, 9, 28, 53     |
| Lorcainide         | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiarrítmico                   | P | 5, 80            |
| Maprotiline        | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antidepresivo                   | P | 5, 22, 80        |
| Mephentermine      | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Vasopresor                      | P | 5, 80            |
| Metergoline        | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Analgésico / Antipirético       | P | 5, 80            |
| Metoprolol         | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihipertensivo                | P | 5, 80, 82        |
| Mexilitene         | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiarrítmico                   | P | 5, 80            |
| Mirex              | NS | Bidireccional | B16-hMDR     | Plaguicida                      | P | 8, 11            |
| Naltrexone         | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antagonista Opiode              | P | 5, 9, 12, 80     |
| Nigericin          | NS | Bidireccional | CHrC5-MDR1   | Antimicrobiano                  | P | 31, 72           |
| Nordazepam         | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Ansiolítico                     | P | 5, 80            |
| NSC309132          | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                    | P | 31, 32, 33       |
| NSC364080          | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                    | P | 31, 32, 33       |
| NSC49899           | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                    | P | 31, 32, 33       |
| NSC615985          | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                    | P | 31, 32, 33       |
| NSC623083          | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                    | P | 31, 32, 33       |
| NSC630357          | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                    | P | 31, 32, 33       |
| NSC633528          | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                    | P | 31, 32, 33       |
| NSC648403          | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                    | P | 31, 32, 33       |

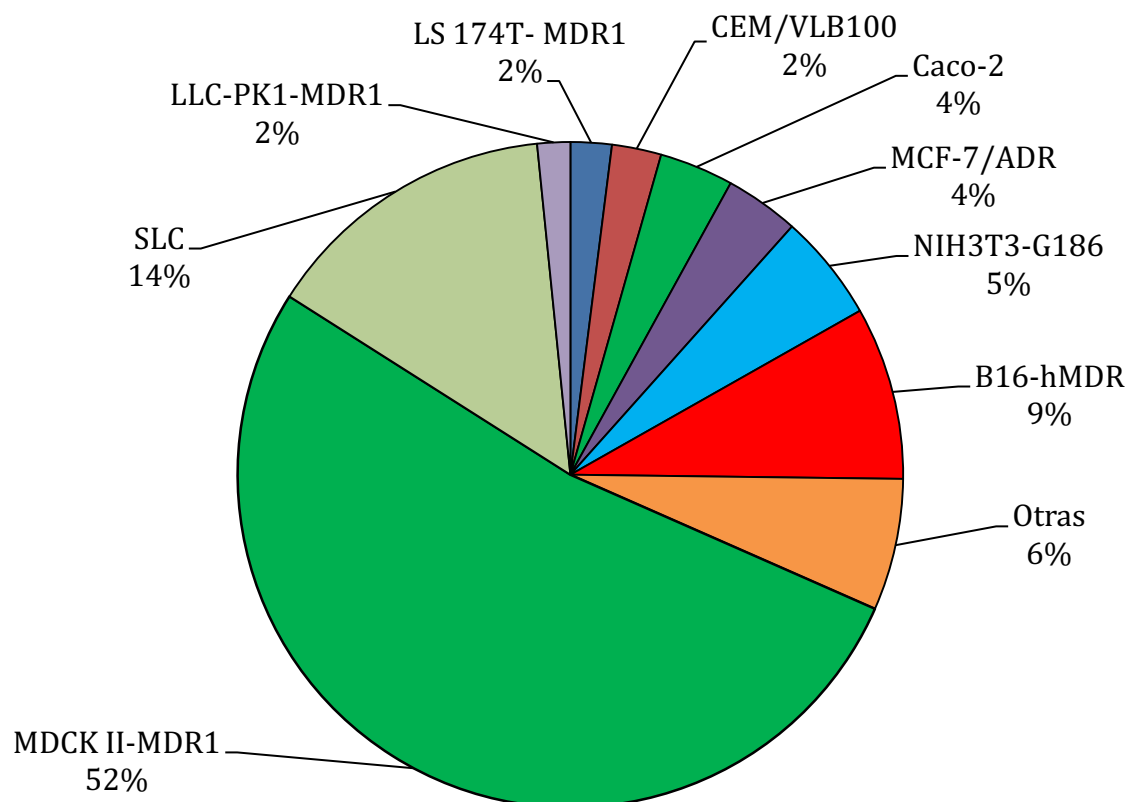
|                  |    |               |              |                                  |   |                |
|------------------|----|---------------|--------------|----------------------------------|---|----------------|
| NSC664565        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| NSC667532        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| NSC667551        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| NSC667560        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| NSC674100        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| NSC674570        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| NSC676602        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| NSC676615        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| NSC676617        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| NSC678047        | NS | Bidireccional | SLC          | Experimental                     | P | 31, 32, 33     |
| Oxprenolol       | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihipertensivo                 | P | 5, 80          |
| Pheniramine      | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihistamínico                  | P | 5, 80          |
| Podophyllotoxin  | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antineoplásico                   | P | 28, 45, 53, 69 |
| Probenecid       | NS | Bidireccional | Caco-2       | Uricosúrico                      | P | 83, 84         |
| Progabide        | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiepiléptico                   | P | 5, 80          |
| Promethazine     | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihistamínico                  | P | 5, 80, 85      |
| Propranolol      | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihipertensivo                 | P | 5, 28, 53, 80  |
| Scopolamine      | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiemético                      | P | 5, 9, 80       |
| Farnesylcysteine | NS | Bidireccional | MCF7-MDR1    | Experimental                     | P | 11, 24         |
| Tacrine          | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Agente Nootrópico                | P | 5, 12, 22, 80  |
| Topiramate       | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiepiléptico                   | P | 12, 76         |
| Triforine        | NS | Bidireccional | B16-hMDR     | Pesticida                        | P | 8, 11          |
| Trypan Blue      | NS | Bidireccional | CEM/VLB100   | Colorante de tinción             | P | 11, 23         |
| Vigabatrin       | NS | Bidireccional | Caco-2       | Antiepiléptico                   | P | 76, 86         |
| Warfarine        | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Anticoagulante Oral              | P | 5, 80          |
| Zolpidem         | NS | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Sedante                          | P | 5, 12, 25, 70  |
| Acrivastine      | S  | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihistamínico                  | P | 5, 80          |
| Amitriptyline    | S  | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antidepresivo                    | P | 5, 22, 69, 80  |
| Astemizole       | S  | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihistamínico                  | P | 5, 9           |
| Bepredil         | S  | Bidireccional | NIH3T3-MDR1  | Antihipertensivo / Antiarrítmico | P | 46, 85         |
| Catharanthine    | S  | Bidireccional | CEM/VLB100   | Antineoplásico                   | P | 11, 78         |

|                               |   |               |              |                                     |   |                   |
|-------------------------------|---|---------------|--------------|-------------------------------------|---|-------------------|
| Cefoperazone                  | S | Bidireccional | K562/ADM     | Antimicrobiano                      | P | 11, 87            |
| Celiprolol                    | S | Bidireccional | Caco-2       | Antihipertensivo                    | P | 46, 74            |
| Cinchonidine                  | S | Bidireccional | K562/ADM     | Antineoplásico                      | P | 11, 88            |
| Clotrimazole                  | S | Bidireccional | B16-hMDR     | Antifúngico                         | P | 8, 11,<br>63      |
| CP100356                      | S | Bidireccional | CHrC5-MDR1   | Experimental                        | P | 66, 67,<br>68     |
| Dexamethazone                 | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiinflamatorio<br>Esteroido       | P | 28, 53,<br>83     |
| Dibucaine                     | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Agente Cardiotónico                 | P | 1, 31,<br>34, 55  |
| Digitoxin                     | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Agente Cardiotónico                 | P | 1, 31,<br>34, 55  |
| Digoxine                      | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Agente Cardiotónico                 | P | 1, 34,<br>69      |
| Dipyridamole                  | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiagregante<br>plaquetario        | P | 28, 53,<br>69     |
| Domperidone                   | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiemético                         | P | 5, 9, 73          |
| Eletriptan                    | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antimigrañoso                       | P | 5, 12,<br>28, 53  |
| Endosulfan                    | S | Bidireccional | B16-hMDR     | Pesticida                           | P | 8, 11             |
| Erythromycin                  | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antimicrobiano                      | P | 28, 40,<br>53, 63 |
| Etoposide                     | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antineoplásico                      | P | 28, 45,<br>53, 69 |
| Gallopamil                    | S | Bidireccional | MCF7/ADR     | Experimental                        | P | 11, 46            |
| Guanfacine                    | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihipertensivo                    | P | 69, 80            |
| Hydroxyrubicin                | S | Bidireccional | B16-hMDR     | Experimental                        | P | 8, 11             |
| Indinavir                     | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiviral                           | P | 5, 28,<br>53, 70  |
| Ivermectin                    | S | Bidireccional | B16-hMDR     | Antiparasitario                     | P | 8, 11             |
| L767679                       | S | Bidireccional | Caco-2       | Experimental                        | P | 31, 89            |
| Levomoprazine                 | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antipsicótico                       | P | 5, 90             |
| Lovastatin                    | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Hipocoleterolemiante                | P | 40, 70,<br>77     |
| Mequitazine                   | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihistamínico                     | P | 5, 91             |
| Methotrexate                  | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antineoplásico /<br>Antimetabolito  | P | 28, 53,<br>69     |
| Methylreserpate               | S | Bidireccional | CEM/VLB100   | Experimental                        | P | 11, 38            |
| Mithramycin A<br>(Plicamycin) | S | Bidireccional | NIH3T3-MDR1  | Antineoplásico /<br>Inmunosupresor  | P | 17, 31            |
| Mitoxantrone                  | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antineoplásico                      | P | 26, 28,<br>53     |
| Morphine-6-<br>Glucuronide    | S | Bidireccional | PBCEC        | Experimental                        | P | 11, 92            |
| Nalbuphine                    | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Analgésico Opioide                  | P | 5, 9              |
| Nicardipine                   | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antihipertensivo /<br>Antiarrítmico | P | 28, 53,<br>77, 85 |

|                  |   |               |              |                           |   |                                |
|------------------|---|---------------|--------------|---------------------------|---|--------------------------------|
| Nimodipine       | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Vasodilatador             | P | 12, 93                         |
| Paclitaxel       | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antineoplásico            | P | 28, 34,<br>53, 71,<br>77       |
| Phenobarbital    | S | CETA          | MDCK II-MDR1 | Antiepiléptico            | P | 43, 81,<br>86                  |
| Phenytoin        | S | CETA          | MDCK II-MDR1 | Antiepiléptico            | P | 43, 81,<br>86                  |
| Pristinamycin IA | S | Bidireccional | NIH3T3-MDR1  | Experimental              | P | 17, 31                         |
| Puromycin        | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Experimental              | P | 11, 28                         |
| Quinine          | S | Bidireccional | Caco-2       | Antimalárico              | P | 46, 71,<br>77                  |
| Rhodamine 123    | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Colorante<br>Fluorescente | P | 94, 95                         |
| Risperidone      | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antipsicótico             | P | 5, 12,<br>22, 25               |
| Spiperone        | S | Bidireccional | SH-SY5Y/VCR  | Antipsicótico             | P | 11, 31,<br>96                  |
| Teniposide       | S | Bidireccional | Caco-2       | Antineoplásico            | P | 31, 97                         |
| Thioridazine     | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antipsicótico             | P | 22, 51                         |
| Trifluoperazine  | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antipsicótico             | P | 22, 52,<br>77                  |
| Verapamil        | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antiarrítmico             | P | 5, 9, 12,<br>25, 28,<br>34, 70 |
| Vincristine      | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Antineoplásico            | P | 28, 53,<br>71, 94              |
| Yohimbine        | S | Bidireccional | MDCK II-MDR1 | Agente Midriático         | P | 28, 38,<br>39, 78,<br>80       |

**Tabla 1** | Base de datos de sustratos y no sustratos de P-gp extraída de bibliografía. **S**: Sustrato; **NS**: no sustratos; **E**: conjunto de entrenamiento; **P**: conjunto de prueba; **Ref.**: referencia; **SLC**: screening de líneas celulares.





**Figura 1** | Distribución de las líneas celulares utilizadas en los diferentes artículos consultados.

## REFERENCIAS

Bikadi Z., Hazai I., Malik D., Jemnitz K., Veres Z., Hari P., Mao Q. Predicting P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport Based On Support Vector Machine and Three-Dimensional Crystal Structure of P-glycoprotein. *PLoS ONE*, **6**(10): e25815. (2011).

Broccatelli F. QSAR Models for P-Glycoprotein Transport Based on a Highly Consistent Data Set. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **52**: 2462–2470. (2012).

Levatic J., Ćurak J., Kralj M., Šmuc T., Osmak M., Supek F. Accurate Models for P-gp Drug Recognition Induced from a Cancer Cell Line Cytotoxicity Screen. *Journal of Medicinal Chemistry*, **56** (14), 5691–5708. (2013).

Löscher W., Luna-Tortos C., Romermann K., Fedrowitz M. Do ATP-Binding Cassette Transporters Cause Pharmacoresistance in Epilepsy? Problems and Approaches in Determining which Antiepileptic Drugs are Affected, *Current Pharmaceutical Design*, **17**(26): 2808–2828. (2011).

Penzotti J, Lamb M, Evensen E, Grootenhuis P. A computational ensemble pharmacophore model for identifying substrates of P glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**: 1737–1740. (2002).

Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *European Journal of Biochemistry*, **251**: 252–261. (1998).

Sjöstedt N., Kortejärvi H., Kidron H., Vellonen K., Urtti A., Yliperttula M. Challenges of Using In Vitro Data for Modeling P-Glycoprotein Efflux in the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutical Research*, **31**: 1–19. (2014).

Wang Z., Chen Y., Liang H., Bender A, Glen R., Yan A. P-glycoprotein substrate models using support vector machines based on a comprehensive data set. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **51**: 1447–456. (2011).

## REFERENCIAS TABLA

1. Chang et al. Rapid identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Drug Metabolism and Disposition*, **34**(12): 1976–1984. (2006).

2. Holthoewer, D. Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood-brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegenerative Diseases*, **10**(1-4): 224–228. (2012).

3. Qian X. & Beck W. Progesterone photoaffinity labels P-glycoprotein in multidrug-resistant human leukemic lymphoblasts, *Journal of Biological Chemistry*, **265**: 187532–18756. (1990).

4. Ueda K., Okamura N., Hirai M., Tanigawara Y., Saeki T., Kioka, N. Human P-glycoprotein Transports Cortisol, Aldosterone, and Dexamethasone, but Not Progesterone. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 24248–24252. (1992).

5. Mahar D. et al. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **303**(3): 1029–1037. (2002).

6. Broccatelli F, et al. A Novel Approach for Predicting P-glycoprotein (ABCB1) Inhibition Using Molecular Interaction Fields. *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**(6): 1740–1751. (2011).

7. Bain L., LeBlanc G. Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein. *Toxicology and Apply Pharmacology*, **141**: 288–298. (1996).
8. Bain L., Mc Lachlan J., LeBlanc G. Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein. *Environmental Health Perspectives*, **105**: 812–818. (1997).
9. Carrara S., Reali V., Misiano P., Dondio G., Bigogno C. Evaluation of in vitro brain penetration: optimized PAMPA and MDCKII-MDR1 assay comparison. *International Journal of Pharmaceutics*, **345**(1-2): 125–133. (2007).
10. Liu Z., Lheureux F., Pouliot J. F., Heckel A., Bamberger U., Georges E. BIBW22 BS, potent multidrug resistance-reversing agent, binds directly to P-glycoprotein and accumulates in drug resistant cells, *Molecular Pharmacology*, **50**: 482–492. (1996).
11. Seelig, A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *European Journal of Biochemistry*, **251**: 252–261. (1998).
12. Wager T., Chandrasekaran R., Hou X., Troutman M., Verhoest P., Villalobos A., Will Y. Defining Desirable Central Nervous System Drug Space through the Alignment of Molecular Properties, in Vitro ADME, and Safety Attributes. *ACS Chemical Neuroscience*, **1**(6): 420–434. (2010).
13. Board P. Inhibition of erythrocyte glutathione conjugate transport by polyethoxylated surfactants. *FEBS Letters*, **315**: 298–300. (1993).
14. Marks C., Su M., Davey R., Davey M. Extended multidrug resistance in haemopoietic cells, *British Journal of Haematology*, **95**: 587–595. (1996).
15. Ueda K.; Taguchi Y.; Morishima M. How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Seminars in Cancer Biology*, **8**: 151–159. (1997).
16. Horwitz S., et al. Progesterone Interacts with P-Glycoprotein in Multidrug-resistant Cells and in the Endometrium of Gravid Uteru. *The Journal of biological chemistry*, **264**(2): 782–788. (1989).
17. Sikic B. Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance. *Seminars on Hematology*, **34**: 40–47. (1997).
18. Wang, et al. Quantitative Distinctions of Active Site Molecular Recognition by P-Glycoprotein and Cytochrome P450 3A4. *Chemical Research in Toxicology*, **14**(12): 1596–1603. (2001).

19. Etievant C., Schambel P., Guminski Y., Barret J., Imbert T., Hill B. Requirements for P-glycoprotein recognition based on structure-activity relationships in the podophyllotoxin series. *Anticancer Drug Design*, **13**: 317–336. (1998).
20. Yang J., et al. A novel podophyllotoxin derivative (YB-1EPN) induces apoptosis and down-regulates express of P-glycoprotein in multidrug resistance cell line KBV200. *European Journal of Pharmacology*, **627**(1–3): 69–74. (2010).
21. Chen C., Hanson E., Watson J., & Lee J. P-glycoprotein limits the brain penetration of nonsedating but not sedating H1-antagonists. *Drug Metabolism and Disposition*, **31**(3), 312–318. (2003).
22. Summerfield S., Read K., Begley D. J., Obradovic T., Hidalgo I., Coggon S., Lewis A. V., et al. Central nervous system drug disposition: the relationship between in situ brain permeability and brain free fraction. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **322**(1): 205–213. (2007).
23. Zamora J., Pearce H., Beck W. Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells. *Molecular Pharmacology*, **33**: 454–462. (1988).
24. Zhang L., et al. Characterization of prenylcysteines that interact with P-glycoprotein and inhibit drug transport in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(39): 22859–22865. (1995).
25. Feng B., Mills J., Davidson R., Mireles R., Janiszewski J., Troutman M., & De Morais S. In Vitro P-glycoprotein Assays to Predict the in Vivo Interactions of P-glycoprotein with Drugs in the Central Nervous System. *Drug Metabolism and Disposition*, **36**(2): 268–275. (2008).
26. von Richter O., et al. A novel screening strategy to identify ABCB1 substrates and inhibitors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **379**(1): 11–26. (2009).
27. Tournier N., et al. Interaction of drugs of abuse and maintenance treatments with human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2). *International Journal of Neuropsychopharmacology*, **13**: 905–915. (2010).
28. Gombar V., Polli J., Humphreys J., Wring S., & Serabjit-Singh C. Predicting P-glycoprotein substrates by a quantitative structure-activity relationship model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **93**(4): 957–968. (2004).

29. Broccatelli F. QSAR Models for P-Glycoprotein Transport Based on a Highly Consistent Data Set. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **52**: 2462–2470. (2012).
30. Chougule M., Patel A., Patlolla R., Jackson T., Singh M. Epithelial transport of nospapine across cell monolayer and influence of absorption enhancers on in vitro permeation and bioavailability: implications for intestinal absorption. *Journal of Drug Targeting*, **22**(6): 498–508. (2014).
31. Penzotti J., Lamb M., Evensen E., Grootenhuis P. A computational ensemble pharmacophore model for identifying substrates of P-glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**: 1737–1740. (2002).
32. <http://cactus.nci.nih.gov/ncidb2.2/>
33. Levatic J., Ćurak J., Kralj M., Šmuc T., Osmak M., Supek F. Accurate Models for P-gp Drug Recognition Induced from a Cancer Cell Line Cytotoxicity Screen. *Journal of Medicinal Chemistry*, **56** (14): 5691–5708. (2013).
34. Troutman M., Thakker D. Novel experimental parameters to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium. *Pharmaceutical Research*, **20**(8): 1210–1224. (2003).
35. Saitoh H., Hatakeyama M., Eguchi O., Oda M., Takada M. Involvement of intestinal p-glycoprotein in the restricted absorption of methylprednisolone from rat small intestine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **87**: 73–75. (1998).
36. Matsson P., Pedersen J., Norinder U., Bergström C., Artursson P. Identification of Novel Specific and General Inhibitors of the Three Major Human ATP-Binding Cassette Transporters P-gp, BCRP and MRP2 Among Registered Drugs. *Pharmaceutical Research*, **26**(8): 1916–1831. (2009).
37. Äänismaa P., Gatlik-Landwojtowicz E., Seelig A. P-Glycoprotein Senses Its Substrates and the Lateral Membrane Packing Density: Consequences for the Catalytic Cycle. *Biochemistry*, **47**(38): 10197–10207. (2008).
38. Pearce H., Safa A., Bach N., Winzer A., Cirtain C., Beck T. Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs modulate multidrug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**: 5128–5132. (1989).

39. Bhat U., Winter M., Pearce H., Beck W. A structure-function relationship among reserpine and yohimbine analogues in their ability to increase expression of mdr1 and P-glycoprotein in a human colon carcinoma cell line. *Molecular Pharmacology*, **48**(4): 682–689. (1995).
40. Kim R., Wandel C., Leake B., Cvetkovic M., Fromm M., Dempsey P., Roden MM., Belas F., Chaudhary A., Roden D., Wood A., Wilkinson G. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharmaceutical Research*, **16**(3): 408–414. (1999).
41. Kim W., Benet L. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. *Pharmaceutical Research*, **21**(7): 1284–1293. (2004).
42. Baltes S, Fedrowitz M, Tortós C, Potschka H, Löscher W. Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **320**(1): 331–343. (2007).
43. Weiss J., Kerpen C., Lindenmaier H., Dormann S., Haefeli W. Interaction of antiepileptic drugs with human P-glycoprotein in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **307**: 262–267. (2003).
44. Bachmeier C., Miller D. A Fluorometric Screening Assay for Drug Efflux Transporter Activity in the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutical Research*, **22**(1): 113–121. (2005).
45. Troutman M., Thakker D. Novel experimental parameters to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium. *Pharmaceutical Research*, **20**(8): 1210–1224. (2003).
46. Preiss R. P-glycoprotein and related transporters. *International Journal of Pharmacology and Therapeutics*, **36**: 3–8. (1998).
47. Tamai I., Safa A. Azidopine noncompetitively interacts with vinblastine and cyclosporin A binding to P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *Journal of Biological Chemistry*, **266**: 16796–16800. (1991).
48. Pascaud C., Garrigos M., Orlowski S. Multidrug resistance transporter P glycoprotein has distinct but interacting binding sites for cytotoxic drugs and reversing agents. *Biochemistry*, **333**: 351–358. (1998).

49. Zhang X., Ritke M., Yalowich J., Slovak M., Ho J., Collins K., Annable T., Arceci R., Durr F., Greenberger L. P-glycoprotein mediates profound resistance to bisantrene. *Oncology Research*, **6**(7): 291–301. (1994).
50. Gosland P., Lum B., Sikic B. Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin, and vinblastine in multidrug-resistant human sarcoma cells. *Cancer Research*, **49**: 6901–6905. (1989).
51. Akiyama S., Cornwell M., Kuwano M., Pastan I., Gottesman M. Most drugs that reverse multidrug resistance also inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein by a vinblastine analog. *Molecular Pharmacology*, **33**(2): 144–147. (1988).
52. Ford J., Prozialeck W., Hait W. Structural features determining activity of phenothiazines and related drugs for inhibition of cell growth and reversal of multidrug resistance. *Molecular Pharmacology*, **35**(1): 105–115. (1988).
53. Polli J., Wring S., Humphreys J., Huang, L., Morgan J., Webster L., Serabjit-Singh C. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **299**(2): 620–628 (2001).
54. Ferry D., Malkhandi J., Russell M., Kerr D. Dexniguldipine-HCl is a potent allosteric modulator of [3H]-vinblastine binding to P-glycoprotein of MCF-7 ADR breast cancer cell membranes. *Biochem l' pharmacol*, **76**: 112–119. (1995).
55. Tanigawara Y., Okamura N., Hirai M., Yasuhara M., Ueda K, Kioka N., Komano T., Hori R. Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **263**(2): 840–845. (1992).
56. Wils P., Phung-Ba V., Warnery A., Lechardeur D., Raeissi S., Hidalgo I., Scherman D. Polarized transport of docetaxel and vinblastine mediated by P-glycoprotein in human intestinal epithelial cell monolayers. *Biochemical Pharmacology*, **48**(7):1528–1530. (1994).
57. Germann U. Predicting P-glycoprotein substrates by a quantitative structure–activity relationship model. *European Journal of Cancer*, **32**(6): 927–944. (1996).
58. Wartmann M., Altmann K. The Biology and Medicinal Chemistry of Epothilones. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*, **2**: 123–148. (2002).
59. Thimmaiah K., Horton J., Qian X., Beck W., Houghton J., Houghton P. Structural determinants of phenoxazine type compounds required to modulate the

accumulation of vinblastine and vincristine in multidrug-resistant cell lines. *Cancer Communication*, **2**(7): 249–259. (1990).

60. Saitoh H., Hatakeyama M., Eguchi O., Oda M., Takada M. Involvement of intestinal P-glycoprotein in the restricted absorption of methylprednisolone from rat small intestine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **87**: 73–75. (1998).

61. Hyafil F., Vergely C., Du Vignaud P., Grand-Perret T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Research*, **53**(19): 4595–4602. (1993).

62. Heijn M., Hooijberg J., Scheffer G., Szabo G., Westerhoff H., Lankelma J. Anthracyclines modulate multidrug resistance protein (MRP) mediated organic anion transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1326**(1): 12–22. (1997).

63. Schuetz E., Beck W., Schuetz J. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Molecular Pharmacology*, **49**(2): 311–318. (1996).

64. Wachter V., Silverman J., Zhang Y., Benet L. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **87**: 1322–1330. (1998).

65. Zhang Y., Guo X., Lin E., Benet L. Overlapping substrate specificities of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein for a novel cysteine protease inhibitor. *Drug Metabolism and Disposition*, **26**(4): 360–366. (1998).

66. Sharom F., Yu X., Di Diodato G., Chu J. Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport. *Biochemical Journal*, **320**(2): 421–428. (1996).

67. Di Diodato G., Sharom F. Interaction of combinations of drugs, chemosensitizers, and peptides with the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemical Pharmacology*, **53**(12): 1789–1797. (1997).

68. Sharom F., Liu R., Romsicki Y., Lu P. Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1461**: 327–345. (1999).

69. Wang Q., Rager J., Weinstein K., Kardos P., Dobson G., Li J., Hidalgo I. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, **288**(2): 349–359. (2005).



70. Gertz M., Harrison A., Houston J., Galetin A. Prediction of Human Intestinal First-Pass Metabolism of 25 CYP3A Substrates from In Vitro Clearance and Permeability. *Pharmacology*, **38**(7): 1147–1158. (2010).
71. Nagy H., Goda K., Fenyvesi F., Bacsó Z., Szilasi M., Kappelmayer J., Lustyik G., Cianfriglia M., Szabó G Jr. Distinct groups of multidrug resistance modulating agents are distinguished by competition of P-glycoprotein-specific antibodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **315**(4): 942–949. (2004).
72. Sharom F., Lu P., Liu R., Yu X. Linear and cyclic peptides as substrates and modulators of P-glycoprotein: peptide binding and effects on drug transport and accumulation. *Biochemistry*, **333**: 621–630. (1998).
73. Schinkel A., Wagenaar E., Mol C., van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *Journal of Clinical Investigation*, **97**(11): 2517–2524. (1996).
74. Spahn-Langguth H., Baktir G., Radschuweit A., Okyar A., Terhaag B., Ader P., Hanafy A., Langguth P. P-glycoprotein transporters and the gastrointestinal tract: Evaluation of the potential in vivo relevance of in vitro data employing talinolol as model compound. *International Journal of Pharmacology and Therapeutics*, **36**: 16–24. (1998).
75. Collett A., Tanianis-Hughes J., Hallifax D., Warhurst G. Predicting P-glycoprotein effects on oral absorption: correlation of transport in Caco-2 with drug pharmacokinetics in wild-type and *mdr1a*(-/-) mice in vivo. *Pharmaceutical Research*, **21**(5): 819–826. (2004).
76. Weiss J., Sauer A., Divac N., Herzog M., Schwedhelm E., Boger R., Haefeli W., Benndorf R. Interaction of angiotensin receptor type 1 blockers with ATP-binding cassette transporters. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, **31**(2-3):150–161. (2010).
77. Wang E., Casciano C., Clement R., Johnson W. Active transport of fluorescent P-glycoprotein substrates: evaluation as markers and interaction with inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **289**(2): 580–585. (2001).
78. Beck W., Cirtain M., Glover C., Felsted R., Safa R. Effects of indole alkaloids on multidrug resistance and labeling of P-glycoprotein by a photoaffinity analog of vinblastine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **153**(3): 959–966. (1988).

79. Liu H., et al. Solute Carrier Family of the Organic Anion-Transporting Polypeptides 1A2- Madin-Darby Canine Kidney II: A Promising In Vitro System to Understand the Role of Organic Anion-Transporting Polypeptide 1A2 in Blood-Brain Barrier Drug Penetration. *Drug Metabolism and Disposition*, **43**(7): 1008–10018. (2015).
80. Varma M., Sateesh K., Panchagnula R. Functional Role of P-Glycoprotein in Limiting Intestinal Absorption of Drugs: Contribution of Passive Permeability to P-Glycoprotein Mediated Efflux Transport. *Molecular Pharmaceutics*, **2**(1):12–21. (2005).
81. Löscher W., Luna-Tortós C., Römermann K., Fedrowitz M. Do ATP-binding cassette transporters cause pharmacoresistance in epilepsy? Problems and approaches in determining which antiepileptic drugs are affected. *Current Pharmaceutical Design*, **17**: 2808–2828. (2011).
82. Takara K., Kakumoto M., Tanigawara Y., Funakoshi J., Sakaeda T., Okumura K. Interaction of digoxin with antihypertensive drugs via MDR1. *Life Sciences*, **70**(13): 1491–500. (2002).
83. Zhang L., Balimane P., Johnson S., Chong S. Development of an in silico model for predicting efflux substrates in Caco-2 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, **343**: 98–105. (2007).
84. Gao J., Murase O., Schowen R., Aube J., Borchardt R. A functional assay for quantitation of the apparent affinities of ligands of P-glycoprotein in Caco-2 cells. *Pharmaceutical Research*, **18**(2): 171–176. (2001).
85. Ibrahim S., Peggins J., Knapton A., Licht T., Aszalos A. Influence of antipsychotic, antiemetic, and Ca(2+) channel blocker drugs on the cellular accumulation of the anticancer drug daunorubicin: P-glycoprotein modulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **295**(3): 1276–1283. (2000).
86. Crowe A., Teoh Y. Limited P-glycoprotein mediated efflux for anti-epileptic drugs. *Journal of Drug Targeting*, **14**: 291–300. (2006).
87. Yusa K., Tsuruo T. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Research*, **49**(18): 5002–5006. (1989).

88. Genne P., Dimanche-Boitrel M., Mauvernay R., Gutierrez G., Duchamp O., Petit J., Martin F., Chauffert B. Cinchonine, a potent efflux inhibitor to circumvent anthracycline resistance in vivo. *Cancer Research*, **52**(10): 2797–2801. (1992).
89. Prueksaritanont T., DeLuna P., Gorham L., Ma B., Cohn D., Pang J., Xu X., Leung K., Lin J. In vitro and in vivo evaluations of intestinal barriers for the zwitterion L-767,679 and its carboxyl ester prodrug L-775,318. Roles of efflux and metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, **26**(6): 520–527. (1998).
90. Pajak B., Molnar J., Engi H., Orzechowski A. Preliminary studies on phenothiazine-mediated reversal of multidrug resistance in mouse lymphoma and COLO 320 cells. *In Vivo*. **19**(6): 1101–1104. (2005).
91. Seeling A. The Role of Size and Charge for Blood–Brain Barrier Permeation of Drugs and Fatty Acids. *Journal of Molecular Neurosciences*, **33**: 32–41. (2007).
92. Huwyler J., Drewe J., Klusemann C., Fricker G. Evidence for P-glycoprotein-modulated penetration of morphine-6-glucuronide into brain capillary endothelium. *British Journal of Pharmacology*, **118**(8): 1879–1885. (1996).
93. Höcht C., Lazarowski A., Gonzalez N., Auzmendi J., Opezso J., Bramuglia G., Taira C., Girardi E. Nimodipine restores the altered hippocampal phenytoin pharmacokinetics in a refractory epileptic model. *Neuroscience Letters*, **413**: 168 – 172. (2007).
94. Tang F., Ouyang H., Yang J. Z., Borchardt R. Bidirectional transport of rhodamine 123 and Hoechst 33342, fluorescence probes of the binding sites on P-glycoprotein, across MDCK-MDR1 cell monolayers. *Journal of pharmaceutical sciences*, **93**(5): 1185–1194. (2004).
95. Saengkhae C., Loetchutinat C., Garnier-Suillerot A. Kinetic analysis of rhodamines efflux mediated by the multidrug resistance protein (MRP1). *Biophysical Journal*, **85**(3): 2006–2014. (2003).
96. Safa A., Agresti M., Bryk D., Tamai I. N-(p-azido-3-[125I]iodophenethyl)piperone binds to specific regions of P-glycoprotein and another multidrug binding protein, spiperophilin, in human neuroblastoma cells. *Biochemistry*, **33**(1): 256–265. (1994).
97. Zhang Z., Ma L., Jiang S., Liu Z., Huang J., Chen L., Yu H., Li Y. A self-assembled nanocarrier loading teniposide improves the oral delivery and drug concentration in tumor. *Journal of Controlled Release*, **166**(1): 30–37. (2013).

\* Durante el transcurso de esta tesis se han realizado 12 presentaciones a congresos (3 nacionales y 9 internacionales), 10 publicaciones en revistas científicas con referato, y 1 capítulo de libro.

En el año 2012 se ha obtenido una beca de la Bibliotheca Alexandrina (BA) y de The Academy of Sciences for the Developing Countries (TWAS) para asistir a TWAS/BioVisionAlexandria.NXT 2012 y BioVision Alexandria Conference (Alejandría, Egipto). En 2013 la Sociedad Iberoamericana de Bioinformática otorgó una beca para asistir al 4to. Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional (4CAB2C) y 4ta. Conferencia Internacional de la Sociedad Iberoamericana de Bioinformática (SolBio). Finalmente, en el año 2014, la Liga Internacional Contra la epilepsia (ILAE) junto con la Universidad Federal de Sao Paulo otorgó una beca para asistir a la XIII Escuela Latinoamericana de Epilepsia de Verano (LASSE) llevada a cabo en Sao Paulo, Brasil.

A continuación se detallan las publicaciones realizadas en el marco de la tesis doctoral:

#### **Artículos:**

Autores: M. Di Ianni, A. Talevi, E.A. Castro, L.E. Bruno-Blanch.

Título del trabajo: Development of a high sensitive ensemble of topological models for early identification of P-glycoprotein substrates

Con referato: Sí

Tipo de trabajo: Trabajo Completo

Publicación: Journal of Chemometrics, 2011, **25**, 313–322.

Autores: A. Talevi, C. Bellera, M. Di Ianni, M. Gantner, L.E. Bruno-Blanch, E.A. Castro.

Título del trabajo: CNS Drug Development – Lost in Translation?

Con referato: Sí

Tipo de trabajo: Trabajo Completo

Publicación: Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2012, **12**, 959-970.

Autores: A. Talevi, C. Bellera, M. Di Ianni, P.R. Duchowicz, L.E. Bruno-Blanch, E.A. Castro.

Título del trabajo: An integrated drug development approach applying topological descriptors

Con referato: Sí

Tipo de trabajo: Trabajo Completo

Publicación: Current Computer-Aided Drug Design, 2012, **8**, 172-181.

Autores: Mauricio E. Di Ianni, Andrea Enrique, Pablo Palestro, Luciana Gavernet, Alan Talevi and Luis E. Bruno-Blanch

Título del trabajo: Several new diverse anticonvulsant agents discovered in a virtual screening campaign aimed at novel antiepileptic drugs to treat refractory epilepsy

Con referato: Sí

Tipo de trabajo: Trabajo Completo

Publicación: Journal of Chemical Information and Modeling, 2012, **52**, 3325-3330.

Autores: Melisa Edith Gartner, Mauricio Di Ianni, María Esperanza Ruiz, Alan Talevi and Luis E. Bruno-Blanch.

Título del trabajo: Development of Conformation Independent Computational Models for the Early Recognition of Breast Cancer Resistance Protein substrates.

Con referato: Sí

Tipo de trabajo: Trabajo Completo Publicación: Biomed Research International (hasta 2013, Journal of Biomedicine and Biotechnology), Volumen 2013, 1-12, artículo 863592.

Autores: Mauricio Di Ianni, Alan Talevi

Título del trabajo: How Can Network-Pharmacology Contribute to Antiepileptic Drug Development?

Con referato: Sí

Tipo de trabajo: Trabajo Completo

Publicación: Molecular & Cellular Epilepsy, 2014, **1**, 19-25.

Título: "Computer-aided identification of anticonvulsant effect of natural non-nutritive sweeteners Stevioside and Rebaudioside A"

Publicación: Drug Repurposing, Rescue, and Repositioning – Aceptado para publicar.

Autores: Mauricio E. Di Ianni, María E. Del Valle, Andrea V. Enrique, María A. Rosella, Fiorella Bruno, Luis E. Bruno-Blanch, Alan Talevi.

Con referato: Si

Publicacion: Drug Repurposing, Rescue, and Repositioning doi: 10.1089/drrr.2014.0008

Autores: Mauricio E. Di Ianni, Melisa E. Gantner, María E. Ruiz, Eduardo A. Castro, Luis E. Bruno-Blanch, Alan Talevi

Título del trabajo: Systematic comparison of the performance of different 2D and 3D ligand based virtual screening methodologies to discover anticonvulsant drugs

Con referato: Sí

Tipo de trabajo: Trabajo Completo

Publicación: Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 2015, **18**(4), 387-398.

Autores: Mauricio E. Di Ianni, Andrea V. Enrique, María E. Del Valle, Blanca Aldana, María A. Rosella, Luisa L. Rocha-Arrieta, Eduardo A. Castro, Luis E. Bruno-Blanch, Alan Talevi

Título del trabajo: Is there a relationship between sweet taste and seizures? Anticonvulsant and proconvulsant effects of non-nutritive sweeteners

Con referato: Sí

Tipo de trabajo: Trabajo Completo

Publicación: Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 2015, **18**(4), 335–345.

Autores: Manuel Couyoupetrou, Melisa E. Gantner, Mauricio E. Di Ianni, Pablo H. Palestro, Andrea V. Enrique, Luciana Gavernet, María E. Ruiz, Guido Pesce, Luis E. Bruno-Blanch, Alan Talevi.

Título del trabajo: Computer-Aided Recognition of ABC Transporters Substrates and Its Application to the Development of New Drugs for Refractory Epilepsy

Con referato: Sí

Tipo de trabajo: Trabajo Completo

Publicación: Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. En Prensa.

### **Capítulo de libro:**

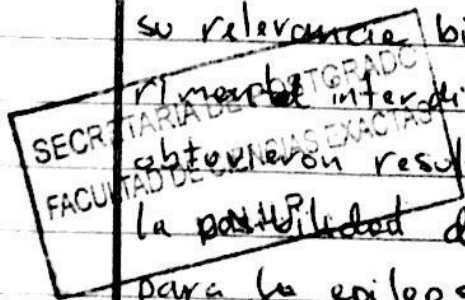
Título del capítulo: Knowledge-Based Drug Repurposing: A Rational Approach Towards the Identification of Novel Medical Applications of Known Drugs

Autores: Carolina L. Bellera, Mauricio E. Di Ianni, María L. Sbaraglini, Eduardo A. Castro, Luis E. Bruno-Blanch and Alan Talevi.

Libro: Frontiers in Computational Chemistry (2014), Capítulo 2, páginas 44-81. Bentham Science Publishers, 2014. ISBN: 978-1-60805-865-5.

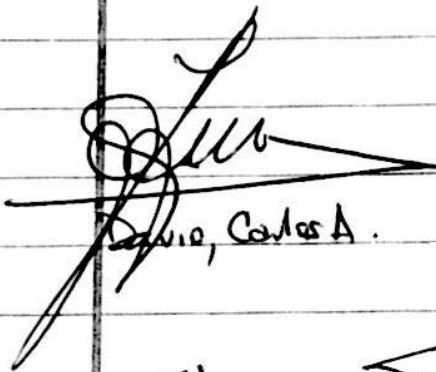
Acta N° 1668 En el día de la fecha se reúne el Jurado designado por el Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP (Expte 700-8744/11-04) constituido por los Drs. Carlos Davio, Ernesto G. Matay y Gustavo Parisi para evaluar el trabajo de Tesis "Topología molecular aplicada a la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia refractaria", realizado por el Farm. Mauricio Emiliano Di Ianni, bajo la Dirección del Dr. Luis Enrique Bruno Blanch y la Co-dirección del Dr. Alan Talevi, para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, Área Ciencias Biológicas.


Habiendo analizado el trabajo presentado por el doctorando el Jurado considera que el tema de tesis así como los objetivos formulados son originales y relevantes en el campo de la Química Medicinal. El trabajo se centró en la proposición y testeo de posibles candidatos químicos para ser usados como fármacos útiles para el tratamiento de la epilepsia refractaria. En relación al manuscrito, luego de una exhaustiva construcción teórica avalada por literatura científica de nivel y actualizada, definió claramente los objetivos específicos de estudio y su relevancia biomédica. Mediante un abordaje experimental interdisciplinar, robusto y coherente, se obtuvieron resultados experimentales que postulan la posibilidad de una nueva estrategia terapéutica para la epilepsia refractaria.



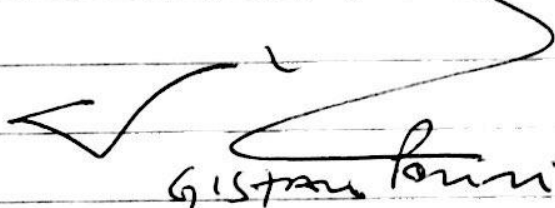
La presentación oral fue clara y organizada, de muy buena calidad. El tesista respondió con solvencia las preguntas del jurado demostrando su nivel de conocimiento y espíritu crítico. Por todo lo expuesto el jurado decide aprobar el presente trabajo y calificarlo como sobresaliente (10, diez).

La Plata, 14 de diciembre de 2015

  
Davio, Carlos A.

  
Ernesto MATA

COPIA FIEL

  
Gustavo Luzzi

SECRETARIA DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
U.N.L.P.





Prof. Dr. Daniel C. CABRA  
Secretario de Posgrado